

# Caractérisation des Transporteurs Vésiculaires du Glutamate dans le Système Nerveux Central

Odile Poirel

► **To cite this version:**

Odile Poirel. Caractérisation des Transporteurs Vésiculaires du Glutamate dans le Système Nerveux Central. *Neurons and Cognition* [q-bio.NC]. 2009. <hal-01361203>

**HAL Id: hal-01361203**

**<https://hal-ephe.archives-ouvertes.fr/hal-01361203>**

Submitted on 6 Sep 2016

**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.

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

**Mémoire**

présenté

par

**Odile POIREL**

Pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

**Caractérisation des Transporteurs Vésiculaires du  
Glutamate dans le Système Nerveux Central**

Soutenu le 17 novembre 2009

Devant le jury suivant :

Dr Jean-Michel Verdier, DE EPHE	Président
Dr Denis Hervé, DR INSERM	Rapporteur
Dr Bertrand Lambolez, DR INSERM	Examinateur
Pr. Salah El Mestikawy, DR INSERM	Examinateur
Pr. Marie-Christine Lombard, DE EPHE	Examinateur

**Mémoire préparé sous la direction de :**

**Pr. Salah El Mestikawy**

Laboratoire d'accueil : Physiopathologie des Maladies du Système Nerveux Central,  
*INSERM UMRS 952 – CNRS UMR 7224 – Université Paris VI*  
*Université Pierre et Marie Curie, Bat B 4<sup>ème</sup> étage (case courrier 37)*  
*9 quai Saint Bernard - 75252 Paris Cedex 05*      *salah.elmestikawy@snv.jussieu.fr*  
Directeur : Pr Bruno Giros

et de

**Pr. Marie-Christine Lombard**

Laboratoire EPHE de : *Physiologie Intégrée des Systèmes Neuroendocrines*  
*EPHE/INSERM U 862 - Neurocentre Magendie*  
*146, rue Léo Saignat - 33077 Bordeaux cedex*      *marie-christine.lombard@inserm.fr*  
Directeur EPHE : Pr Marie-Christine Lombard

**ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES  
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE**

**CARACTÉRISATION DES TRANSPORTEURS  
VÉSICULAIRES DU GLUTAMATE DANS LE SYSTÈME  
NERVEUX CENTRAL**

POIREL Odile

Date de soutenance :

Le glutamate est le principal neurotransmetteur exciteur dans le système nerveux central. Les transporteurs vésiculaires du glutamate (VGLUTs) permettent l'accumulation du glutamate dans les vésicules synaptiques et sont les seuls marqueurs spécifiques des terminaisons glutamatergiques dont nous disposons à l'heure actuelle. Trois transporteurs vésiculaires du glutamate ont été identifiés : VGLUT1-3. Les VGLUTs sont très conservés aux niveaux structural et fonctionnel, mais ils sont répartis anatomiquement de façon quasi complémentaire. VGLUT1 et VGLUT2 sont exprimés par les neurones glutamatergiques classiques aux niveaux corticaux et sous-corticaux (respectivement). VGLUT3, quant à lui, est présent au niveau de neurones utilisant d'autres neurotransmetteurs que le glutamate : les interneurones cholinergiques du striatum et de l'accumbens, certaines sous-populations d'interneurones GABAergiques de l'hippocampe et du cortex et l'ensemble des neurones sérotoninergiques. VGLUT1-3 définissent donc trois sous-systèmes glutamatergiques distincts. La question centrale que je me suis posée au cours de cette thèse a été : quelles sont les implications fonctionnelles de chacun des VGLUTs ?

Dans un premier temps, nous avons cherché à comprendre le rôle de VGLUT3 dans les neurones cholinergiques et sérotoninergiques. Pour aborder cette question, nous avons utilisé un modèle de souris génétiquement modifiées où le gène codant pour VGLUT3 a été invalidé par recombinaison homologe (souris *vglut3<sup>-/-</sup>*). Ma contribution à ce travail a été de déterminer si l'absence de ce gène entraînait (ou pas) des modifications d'expression d'enzymes intervenant dans la synthèse de neurotransmetteurs, des récepteurs et transporteurs des différents systèmes de neurotransmission. Pour mener à bien cette tâche j'ai appris à maîtriser les techniques d'élevage, de génotypage et d'anatomie semi-quantitatives des ARNm, des protéines et des sites de liaisons. L'ensemble de ce travail a permis de mettre en évidence la relative absence de processus d'adaptation neuronale suite à la délétion de VGLUT3. Ces données ont joué un rôle clef pour l'interprétation du phénotypage des souris *vglut3<sup>-/-</sup>*.

Dans un deuxième temps, j'ai voulu déterminer si différentes pathologies humaines neurologiques ou psychiatriques s'accompagnaient de modifications de la transmission glutamatergique et par voie de conséquences de modulations de l'expression des VGLUTs. Dans ce but, j'ai utilisé d'une part des antisérums spécifiques des isoformes humaines de VGLUT1 et de VGLUT2 et d'autre part des échantillons de tissus post mortem humains de sujets contrôles ou de patients atteints par la maladie d'Alzheimer ou l'autisme. Ce projet m'a permis de mettre en évidence des modifications assez profondes et insoupçonnées de systèmes glutamatergiques dans la maladie d'Alzheimer. Enfin, j'ai récemment développé un antisérum qui permettra de quantifier VGLUT3 dans des échantillons cérébraux humains.

Mots clés : Transporteurs vésiculaires du glutamate VGLUT1, VGLUT2 et VGLUT3, souris, humains, hybridation in situ, immunoradiographie, western blot, maladie d'Alzheimer, syndrome autistique.

# TABLE DES MATIÈRES

---

---

<b>ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>4</b>
<b>-I- Structure des cellules nerveuses .....</b>	<b>4</b>
<b>-II- Les neurotransmetteurs .....</b>	<b>5</b>
<b>-III- Les transporteurs .....</b>	<b>7</b>
-III-1- Les transporteurs vésiculaires.....	7
-III-2 Les transporteurs plasmiques.....	9
<b>-IV- La neurotransmission glutamatergique .....</b>	<b>10</b>
-IV-1 Rappels historiques.....	10
-IV-2 Voies anatomiques glutamatergiques .....	11
-IV-3 Description histologique des structures d'intérêt .....	12
-IV-4 Métabolisme du glutamate.....	16
<b>-V- Les transporteurs vésiculaires du glutamate .....</b>	<b>21</b>
-V-1 Le transport vésiculaire du glutamate et ses inhibiteurs .....	21
-V-2 Découverte des transporteurs vésiculaires du glutamate .....	22
-V-3 Structure tridimensionnelle des VGLUTs .....	23
-V-4 Localisation anatomique des VGLUTs.....	24
-V-5 Expression de VGLUT3 dans des neurones hétérologues.....	25
<b>-VI- Deux pathologies liées au glutamate.....</b>	<b>30</b>
-VI-1 La maladie d'Alzheimer .....	31
-VI-2 L'autisme .....	35
<b>Bibliographie.....</b>	<b>38</b>

## ABRÉVIATIONS

---

---

A	Adrénaline
Ac	Commissure
Acb	Accumbens
AcbC	Cœur de l'accumbens
AcbSh	Partie ventrale de l'accumbens
ACh	Acétylcholine
AChE	Acétylcholinestérase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AMPA	Acide $\alpha$ -amino-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionique
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
Amy	Amygdale
APP	Protéine précurseur $\beta$ amyloïde
ARNm	Acide ribonucléique messenger
Asp	Aspartate
ATP	Adénosine triphosphate
BSA	Sérum albumine bovine
CA1-3	Champs 1 à 3 de la corne d'Ammon de l'hippocampe
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
cb	Cervelet
Cc	Corps calleux
CCK	Cholécystokinine
CDR	Taux de démence clinique
CFtal	Cortex frontal
ChT	Transporteur de la choline
Cl	Chlore
CO	Monoxyde de carbone
CO <sup>2</sup>	dioxyde de carbone
Cpal	Cortex pariétal
CPu	Caudé-putamen
5-CT	Carboxamido-tryptamine
CTpal	Cortex temporal
DA	Dopamine
DAT	Transporteur de la dopamine
DG	Gyrus Dentelé
DIDS	Acide 4,4'-diisothiocyano-2,2'-disulphonique
DMEM	Eagle modifié de Dulbecco Medium
$\Delta\mu\text{H}^+$	Gradient électrochimique
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNF	Dégénérescence neurofibrillaire
DOPAC	Acide 3,4-dihydroxyphenylacétique
DPCPX	8-cyclopentyl 1,3-dipropylxanthine
$\Delta\text{pH}$	Gradient de pH
DSM	Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux
DTT	Dithiothreitol
$\Delta\psi$	Gradient électrique
EAAC1	Transporteur des acides aminés excitateurs

EAAT	Transporteur des acides aminés excitateurs
ECL	Chemiluminescence
EDTA	acide éthylène diamine tetra acétique
EGTA	Acide éthylène glycol tetraacétique
Fi	Fimbria de l'hippocampe
GABA	Acide gamma aminobutyrique
GABAT	GABA transaminase
GAD	Acide glutamique décarboxylase
GAP	Glyceraldéhyde phosphate
GAPDH	Glyceraldéhyde phosphate déshydrogénase
GAT	Transporteur de l'acide gamma aminobutyrique
GDP	Guanosine diphosphate
GLAST	Transporteur du glutamate 2
GLT1	Transporteur du glutamate 1
Glu	Glutamate
Gly	Glycine
GlyT	Transporteur de la glycine
GP	Globus pallidus
GTP	Guanosine triphosphate
H	Hypothalamus
H <sup>+</sup>	Proton
H <sub>2</sub> S	Hydrogène sulfuré
HDB	Partie horizontale de la bande diagonale de Broca
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonique
Hil	Hile du gyrus dentelé
HIS	Histamine
HIS	Hybridation in situ
5-HT	Sérotonine
IAR	Immunoautoradiographie
ICS	Institut Clinique de la Souris
IF	Immunofluorescence
INPES	Institut National de Prévention et d'Education pour la Santé
INSERM	Institut National Scientifique et de Recherche Médicale
IP3	Inositol triphosphate
IPF	Protéine du facteur d'inhibition
K <sup>+</sup>	Potassium
KCl	Chlorure de potassium
KDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Dihydrogénophosphate de potassium
KLM	Hémocyanine de patelle
KO-VGLUT3	Souris mutante ou le gène murin vglut3 a été invalidé
LTD	Dépression à long terme
LTP	Potentialisation à long terme
MA	Maladie d'Alzheimer
Mg <sup>2+</sup>	Magnésium
MgCl <sub>2</sub>	Chlorure de magnésium hexahydraté
mGluR	Récepteur du glutamate métabotropiques
Min	minute
MSN	Neurone épineux de taille moyenne
NA	Noradrénaline
Na <sup>+</sup>	Sodium
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sodium hydrogénophosphate
NaCl	Chlorure de sodium
NEO	Néomycine
NET	Transporteur de la noradrénaline

NLG	Neurologine
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NO	Monoxyde d'azote
NRXN	Neurexine
OI	Olive inférieure
OT	Tubercule olfactif
PAF	Paraformaldéhyde
PBS	Tampon phosphate salin
PCP	Phencyclidine
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
3-PGK	3-Phospho-Glycerate-kinase
PGT	PBS, gélatine, triton
PHF	Filaments hélicoïdaux appariés
Pir	Cortex piriforme
Pn	Noyau pontin
PROT	Transporteur de la proline
PV	Parvalbumine
R	Noyau rouge
S	Subiculum
SC	Collicule supérieur
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SERT	Transporteur de la sérotonine
SLC	Transporteur de molécules solubles « <i>Solute Carriers</i> »
SNC	Substance noire compacte
SNC	Système nerveux central
SNr	Substance noire réticulée
SSC	Chlorure de sodium et citrate
SSRI	Inhibiteurs spécifiques de la recapture de la sérotonine
STh	Noyau subthalamique
SVF	Sérum de veau fœtal
TA	Température ambiante
TED	Troubles envahissants du développement
TH	Tyrosine hydroxylase
TRIS	trishydroxyméthylaminométhane
TRIS-HCl	hydroxyméthylaminométhane hydrochloride
Tu	Tubercule olfactif
VAcHT	Transporteur vésiculaire de l'acétylcholine
V-ATPase	ATPase vacuolaire
VEAAT	Transporteur vésiculaire des acides aminés excitateurs
VGLUT	Transporteur vésiculaire du glutamate
VIAAT ou VGAT	Transporteur des acides aminés inhibiteurs
VMAT	Transporteur vésiculaire des monoamines
VNUT	Transporteur vésiculaire des nucléotides
WB	Western Blot
Zn <sup>2+</sup>	Zinc

## INTRODUCTION

---

---

### **-I- STRUCTURE DES CELLULES NERVEUSES**

Le cerveau est composé de différents types cellulaires dont les neurones et les cellules gliales. Les neurones sont des cellules ultra-spécialisées pour la communication et très fortement polarisées. Pour communiquer, les neurones transmettent des informations par influx nerveux (ou potentiel d'action) ou par des messagers chimiques (les neurotransmetteurs). Le neurone est formé d'un corps cellulaire (ou soma) et plusieurs prolongements qui s'arborescent plus ou moins abondamment. Ces structures spécialisées sont de deux types : les dendrites et l'axone.

Il existe un très grand nombre de morphotype neuronaux : les neurones en étoile, en corbeille, en chandelier, granulaires, pyramidaux ou ovoïdes etc ... Le nombre de prolongations axonales et dendritiques est un élément de classement des neurones. Les neurones présentent une (unipolaires, pseudo-unipolaires) ou deux (bipolaires) ou plusieurs (multipolaires) prolongations (ou neurites). Il existe deux types de neurones :

- Les neurones dits de projection (neurones de Golgi type I), dont les axones projettent vers une ou plusieurs autres structures du système nerveux central situées elles-mêmes à des distances plus ou moins éloignées de leurs somas (exemple : les cellules pyramidales du cortex, les cellules de Purkinje du cervelet).

- Les neurones des circuits locaux (neurones de Golgi type II), dont l'axone est très court, ne quittent pas les limites de la structure où se trouvent leurs somas (exemple : les cellules à panier du cortex de l'hippocampe ou du cervelet).

Les dendrites et le soma neuronaux reçoivent de très nombreux contacts synaptiques venant d'autres neurones et constituent la principale surface de réception du neurone. Les dendrites reçoivent des messages afférents. En réponse à ces messages, le neurone récepteur génère à son tour des potentiels d'action qui se propagent le long de l'axone. Le message électrique ne circule pas d'un neurone à l'autre. Au niveau de l'espace synaptique, qui sépare deux neurones (20-50nm), l'information se propage grâce à une transmission chimique. Quand l'influx nerveux atteint la terminaison synaptique, il y provoque l'entrée d'ions

calciques et induit le déplacement vers les terminaisons nerveuses de petites vésicules synaptiques contenant les neurotransmetteurs. La membrane de ces vésicules fusionne alors avec la membrane présynaptique permettant la libération du neurotransmetteur par exocytose dans l'espace synaptique. Une fois libérés, les neurotransmetteurs se fixent sur des récepteurs spécifiques et engendrent la réponse postsynaptique. Le cycle se termine par l'arrêt du message selon 3 modes : 1) diffusion hors de l'espace synaptique, 2) dégradation enzymatique en produits inactifs et/ou 3) recapture par des transporteurs plasmiques.

## **-II- LES NEUROTRANSMETTEURS**

Une molécule peut être qualifiée comme neurotransmetteur à condition qu'elle remplisse différents critères (Schwartz 2000). Elle doit :

- Être synthétisée dans certains neurones car aucun des neurotransmetteurs classiques ne passe la barrière hémato-encéphalique d'où la nécessité de la présence de ses précurseurs et de ses enzymes de biosynthèse.
- Être présente et stockée au niveau des terminaisons présynaptiques.
- Être libérée dans l'espace synaptique : 1) en réponse à un potentiel d'action présynaptique, 2) de façon dépendante des ions calcium, et 3) en quantité suffisante pour induire une réponse de l'élément pré - et/ou postsynaptique.
- Posséder des récepteurs spécifiques postsynaptiques (le contact direct de la molécule sur la membrane postsynaptique doit pouvoir reproduire l'effet d'une stimulation présynaptique).
- Être inactivée rapidement.

Cependant, cette définition est remise en cause par l'existence de substances endogènes qui ne sont pas synthétisées par les neurones ou qui ne sont pas stockées dans les vésicules synaptiques tels que le monoxyde d'azote, le monoxyde de carbone, l'anandamide (Boehning & Snyder 2003).

On distingue trois principales classes de neurotransmetteurs : les neurotransmetteurs classiques, les neuropeptides et les neurotransmetteurs atypiques.

- Les **neurotransmetteurs classiques** (Fonnum 1984), de petite taille, restent les mieux connus. Ils sont en général synthétisés dans le neurone à partir de précurseurs exogènes. Ils

sont stockés dans les petites vésicules synaptiques en attendant leur libération. Les neurotransmetteurs classiques appartiennent à différentes familles dont les plus connus sont :

*Les catécholamines:*

- La dopamine (DA), la noradrénaline (NA), l'adrénaline (A)

*Les autres monoamines biogènes :*

- La sérotonine (5-HT), l'histamine (HIS)

*L'acétylcholine (ACh)*

*Les acides aminés*

- *Excitateurs* : glutamate (Glu), l'aspartate (Asp)
- *Inhibiteurs* : l'acide gamma aminobutyrique (GABA) et la glycine (Gly).

- Les **neuropeptides et neurohormones** sont des polypeptides de longueurs variables. En général, ils coexistent avec des transmetteurs classiques à l'intérieur des mêmes terminaisons. Leur libération calcium-dépendante se fait par exocytose (Merighi 2002, Rupprecht *et al.* 2001, Salio *et al.* 2006).

- Les **neuropeptides** : très nombreux comme par exemple les enképhalines, la substance P, la somatostatine, ...
- Les neurohormones, dont de nombreux peptides pouvant également avoir un rôle de neuropeptide par exemple :-ocytocine, vasopressine, ...

- Les **neurotransmetteurs atypiques** ainsi appelés car ils ne répondent pas à tous les critères des neurotransmetteurs. Contrairement à ces derniers, ils ne sont pas stockés dans des vésicules et ils ne sont pas libérés par les terminaisons présynaptiques par exocytose. Ils sont souvent associés aux signaux que les cellules postsynaptiques renvoient sur les cellules présynaptiques (Baranano *et al.* 2001, Boehning & Snyder 2003). On distingue par exemple:

- le monoxyde d'azote (NO), l'oxyde de carbone (CO) et l'hydrogène sulfuré (H<sub>2</sub>S), la D-sérine, le zinc, l'adénosine.

On peut également classer les neurotransmetteurs en fonction de leur rôle : en neurotransmetteurs effecteurs ou modulateurs.

Les *neuromédiateurs* ou *neurotransmetteurs effecteurs* : le glutamate et l'aspartate (excitateur) - le GABA et la glycine (inhibiteur). Ils sont présents dans un grand nombre de neurones du SNC. Ils délivrent une information spécifique (point à point) pendant un temps bref avec une action via des récepteurs canaux ionotropiques.

Les *neuromodulateurs* : dopamine, noradrénaline, sérotonine, histamine, peptides. Ils sont généralement synthétisés par un nombre restreint de neurones. Ils délivrent une information volumique et agissent le plus souvent sur des récepteurs couplés à des protéines G.

Les neurones utilisent : 1) un ou plusieurs neuropeptides, 2) un ou deux neurotransmetteurs de petite taille 3) un neurotransmetteur et un neuropeptide. Dans ce cas, ces molécules sont appelées *cotransmetteurs*. Généralement, elles sont stockées dans des vésicules synaptiques distinctes, mais on peut retrouver deux cotransmetteurs qui cohabitent dans la même vésicule.

### **-III- LES TRANSPORTEURS**

Il existe deux types de transporteurs : vésiculaires et plasmiques. Ces transporteurs appartiennent à la grande famille des « SoLute Carriers » ou SLC. Cette famille regroupent des transporteurs aux propriétés structurales et fonctionnelles similaires. Les neurotransmetteurs classiques, après synthèse, sont accumulés dans des vésicules synaptiques par des transporteurs vésiculaires. À l'arrivée d'un potentiel d'action, les vésicules libèrent leur contenu dans la fente synaptique par exocytose. Une fois libérés, les neurotransmetteurs se fixent sur des récepteurs qui leur sont spécifiques et induisent une réponse postsynaptique. La réaction se termine par l'arrêt du message de trois façons différentes : 1) diffusion hors de l'espace synaptique, 2) dégradation enzymatique en produits inactifs et/ou 3) recapture par des transporteurs plasmiques.

#### **-III-1- Les transporteurs vésiculaires**

Le dynamisme de ces transporteurs dépend du gradient de protons ( $H^+$ ) généré par l'ATPase vacuolaire (V-ATPase) présente sur les vésicules synaptiques (Beyenbach &

Wieczorek 2006, Gasnier 2000, Ozkan & Ueda 1998). La V-ATPase utilise l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP en ADP pour accumuler les ions  $H^+$  dans les vésicules synaptiques, créant un fort gradient transmembranaire ( $\Delta\mu H^+$ ). Ce gradient de protons entre le cytoplasme et la lumière vésiculaire peut être divisé en deux composantes : 1) le gradient de pH (ou  $\Delta pH$ ), dû à l'acidité importante de l'intérieur de la vésicule, et 2) le gradient électrique (ou  $\Delta\Psi$ ) rattaché aux charges positives dans la vésicule. Ces deux composantes sont également modulées par la perméabilité aux ions chlore de la vésicule. Pour un ( $\Delta\mu H^+$ ) constant, plus la perméabilité au  $Cl^-$  est élevée, plus la composante  $\Delta pH$  sera importante. L'amoncellement de charges négatives dans la lumière vésiculaire réduit le  $\Delta\Psi$  sans nuancer le gradient de pH et détermine donc les proportions de  $\Delta\Psi$  et de  $\Delta pH$  (Figure 3b) (Reimer *et al.* 2001).

Trois familles de transporteurs vésiculaires des neurotransmetteurs classiques ont été identifiées biochimiquement dans le cerveau puis caractérisées d'un point de vue moléculaire.

1) Une famille comprend les transporteurs vésiculaires des amines dont ceux des monoamines (VMAT1 et VMAT2) et celui de l'acétylcholine (VACHT). Ces neurotransmetteurs se présentent sous forme cationique au pH cytoplasmique. L'activité de ces transporteurs dépend principalement de la composante  $\Delta pH$ . Elle permet l'échange d'une molécule de neurotransmetteur contre deux protons (Eiden 2000, Parsons 2000).

2) La deuxième famille est constituée d'un seul membre, le transporteur vésiculaire des acides aminés inhibiteurs (VIAAT ou VGAT) qui a pour substrats le GABA et la glycine (Sagne *et al.* 1997). Au pH cytoplasmique, le GABA et la glycine sont neutres. L'activité de VIAAT ou VGAT dépend à la fois du  $\Delta\Psi$  et du  $\Delta pH$  et permet l'échange d'une molécule de neurotransmetteur contre un proton (Gasnier 2000, Hell *et al.* 1990).

3) La dernière famille regroupe les trois transporteurs vésiculaires du glutamate (VGLUT1-3). Le glutamate est sous forme anionique au pH cytoplasmique. L'activité des VGLUTs dépend principalement du  $\Delta\Psi$  ((Maycox *et al.* 1988). Cependant, on ignore si les VGLUTs transportent seulement le glutamate dans la vésicule ou s'il y a un échange du glutamate avec un proton (Maycox & Jahn 1990, Tabb *et al.* 1992). Ce sont ces trois transporteurs que nous avons plus particulièrement étudiés et je les présenterai de manière plus détaillée dans le paragraphe V de ce chapitre.

Deux autres transporteurs vésiculaires ont été récemment identifiés. Tout d'abord, la sialine qui transporte l'acide sialique lysosomal et qui véhiculerait également le glutamate et l'aspartate (Miyaji *et al.* 2008). La sialine a été rebaptisée « Vesicular Excitatory Amino Acid Transporter ou VEAT » (Miyaji *et al.* 2008). Le deuxième transporteur récemment identifié permet d'accumuler l'ATP dans des vésicules synaptiques et porte le nom de VNUT pour Vesicular NUCleotide Transporter (Sawada *et al.* 2008). Ces découvertes, suggèrent que l'aspartate et l'ATP seraient des neurotransmetteurs.

### **-III-2 Les transporteurs plasmiques**

Ce sont des transporteurs secondaires qui utilisent l'énergie générée par l'existence de gradients ioniques. Par exemple, les sites de recaptures plasmiques des neurotransmetteurs utilisent le gradient de sodium ( $\text{Na}^+$ ) ou de potassium ( $\text{K}^+$ ) créé par l'activité d'une pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (Masson *et al.* 1999). Ces transporteurs sont chargés de l'élimination du neurotransmetteur de la fente synaptique après sa libération. Ils régulent l'intensité et la durée des messages neuronaux. Ils sont également la cible de différentes substances psychotropes comme la cocaïne ou de médicaments comme les antidépresseurs.

Il existe deux grandes familles de transporteurs plasmiques des neurotransmetteurs :

1- Les transporteurs dont l'activité est couplée à un cotransport de  $\text{Na}^+$  et de chlore ( $\text{Cl}^-$ ) à 10 domaines transmembranaires. Cette famille comprend les sites de recapture du GABA (GAT), de la glycine (GLYT), de la noradrénaline (NET), de la dopamine (DAT) et de la sérotonine (SERT).

2- Les transporteurs des acides aminés excitateurs (glutamate et aspartate) dont l'activité est dépendante d'un cotransport de  $\text{Na}^+$  et d'un antiport de potassium ( $\text{K}^+$ ). Cette famille comporte 5 membres appelés EAAT1-5 (Danbolt 2001).

Il faut aussi noter l'existence d'un transporteur de la choline (ChT). La choline est obtenue par dégradation de l'acétylcholine (ACh) par l'acétylcholinestérase (AChE) au niveau de l'espace synaptique. Elle est ensuite recaptée par ChT pour servir de précurseur pour une nouvelle synthèse. La translocation de la choline constitue l'étape limitante de la biosynthèse de l'acétylcholine (Ferguson & Blakely 2004).

## **-IV- LA NEUROTRANSMISSION GLUTAMATERGIQUE**

### **-IV-1 Rappels historiques**

Le glutamate (la forme anionique de l'acide glutamique) est l'un des 20 acides- $\alpha$ -aminés « naturels » constituant les protéines. Sa chaîne latérale contient un résidu carboxyl, ce qui en fait un acide aminé "acide", dicarboxylique et polaire.

Le glutamate est largement répandu dans l'organisme. Il intervient dans diverses réactions du métabolisme général comme la synthèse des protéines, le cycle de Krebs, la détoxification de l'ammoniaque, la glyconéogenèse (Fonnum 1984). Le glutamate fait partie des acides aminés non essentiels. En effet, bien que synthétisé par l'organisme, il ne franchit pas la barrière hémato-encéphalique. Il n'est donc pas apporté par le sang mais élaboré localement dans le système nerveux central (Meldrum 2000).

Il y a plus de 60 ans, la découverte de la forte concentration de glutamate dans le cerveau a entraîné de nombreuses spéculations sur son rôle dans le SNC. Son implication a été envisagée dans certaines pathologies neurologiques dont le retard mental et l'épilepsie (Fonnum 1984). Dans les années 1950, Hayashi et al. ont observé que le L-glutamate pouvait entraîner des convulsions et l'ont proposé comme neurotransmetteur (pour revue voir (Watkins 2000)). De même, d'autres équipes ont montré que les neurones centraux étaient dépolarisés et excités par le L-glutamate, comme le ferait un neurotransmetteur exciteur (Curtis *et al.* 1959). Cependant, certaines actions du L-glutamate semblaient contredire cet aspect d'émetteur exciteur. Il a fallu attendre 20 ans pour confirmer son rôle en tant que principal neurotransmetteur exciteur du SNC (pour revue, voir (Fonnum 1984, Watkins 2000, Purves *et al.* 2004)).

Le glutamate réunit les critères établissant le rôle de neuromédiateur dans le système nerveux (pour revue, voir (Fonnum 1984)):

- Le glutamate est synthétisé dans des neurones du système nerveux central avec une distribution régionale caractéristique.
- La stimulation du neurone entraîne la libération du glutamate vésiculaire en quantités physiologiquement significatives.
- Des récepteurs spécifiques reconnaissant le glutamate sont présents au voisinage de la structure synaptique.

- Le glutamate libéré est éliminé rapidement.

#### **-IV-2 Voies anatomiques glutamatergiques**

En 1983, Jon Storm-Mathisen et ses collègues ont mis en évidence la présence des acides aminés Glutamate et GABA dans les neurones centraux grâce à des méthodes immunocytochimiques (Storm-Mathisen *et al.* 1983). Par la suite, ils rapportent la présence de glutamate dans les vésicules synaptiques des neurones pyramidaux corticaux (Ottersen *et al.* 1997). Ces auteurs ont également établi que le glutamate vésiculaire est libéré par exocytose (Storm-Mathisen & Ottersen 1990).

Les voies glutamatergiques ont été décrites et classées en deux catégories (Ottersen *et al.* 1997, Storm-Mathisen & Iversen 1979, Storm-Mathisen *et al.* 1983, Storm-Mathisen & Ottersen 1990).

##### *-IV-2.1 Les voies corticofuges et cortico-corticales*

Les voies corticofuges partent du cortex et se projettent sur des structures comme le striatum (voie 1), le noyau accumbens, les noyaux amygdaliens, les tubercules olfactifs (voie 2), le thalamus, la substance noire, les noyaux pontiques (voie 3), la moelle épinière (voie 4), le cortex (voie 5), les noyaux rouges (voie 6), les collicules supérieurs (voie 7) et l'hippocampe (voie 8).

Les voies cortico-corticales (voie 5) relient les différentes parties du cortex ainsi que les deux hémisphères corticaux entre eux. En résumé, toute l'information qui circule dans le cortex et quitte le cortex est glutamatergique.

##### *-IV-2.2 Les voies hippocampiques, sous-corticales et cérébelleuses*

Les principales voies sous-corticales glutamatergiques sont :

- Les projections intrahippocampiques formant un continuum de connexions synaptiques excitatrices allant du cortex entorhinal vers le subiculum en passant par le gyrus dentelé (cellules granulaires), puis l'aire CA3 (cellules pyramidales) via les fibres moussues (voie 1), puis l'aire CA1 (cellules pyramidales) via les collatérales de Schaeffer (voie 2), avant un retour au cortex entorhinal (voies 3 et 4) ;

- Les projections hippocampofuges, reliant l'hippocampe (aire CA1) au noyau accumbens (voie 3) et au cortex (voie 4) ;
- Les projections thalamofuges, comme les voies thalamo-striatale (voie 5), thalamo-amygdalienne (voie 6) et thalamo-corticale (voie 7) ;
- Les voies cérébelleuses, comme les voies cérébello-thalamique (voie 9), bulbo-cérébelleuse (voie 11 et 13), cérébello-cérébelleuse (voie 12) ;
- La voie innervant la substance noire et le globus pallidus à partir du noyau subthalamique (voie 8) ;
- La voie partante du cortex piriforme et projetant vers les bulbes olfactifs (voie 10).

### **-IV-3 Description histologique des structures d'intérêt**

Je décrirai ci-dessous rapidement les principales structures anatomiques étudiées au cours de mon travail, qui sont : le cortex, l'hippocampe et le striatum.

Les cortex cérébraux sont localisés à la surface du névraxe dans les différents lobes du cerveau (frontal, temporal, pariétal, occipital). Sur le plan neuronal, ils sont constitués de deux grandes classes cellulaires : les cellules pyramidales et les cellules granulaires (étoilées). Les cellules pyramidales ont un corps cellulaire (10-70µm) pyramidal, un long axone qui s'oriente vers la substance blanche, et deux séries de dendrites dont une dendrite apicale qui se dirige vers la surface du cortex et de petites dendrites basales qui se ramifient dans les couches profondes du cortex. Les cellules granulaires ont un corps cellulaire plus petits (5-10µm) de forme étoilée et des prolongements axonaux et dendritiques plus courts qui restent dans la structure corticale. Les cellules granulaires munies d'épines sont excitatrices tandis que les cellules granulaires sans épines sont inhibitrices.

#### *-IV-3.1 L'organisation du cortex cérébral*

Le cortex recouvre les deux hémisphères du cerveau. Il est constitué par une couche de substance grise formée de 6 couches cellulaires numérotées de I à VI de la surface vers la profondeur.

- La couche I ou couche moléculaire pauvre en cellules nerveuses, constituée surtout des cellules gliales et des fibres nerveuses dont le trajet est parallèle à la surface corticale.

- La couche II ou couche granulaire externe, essentiellement constituée de petits neurones non pyramidaux. La couche granulaire reçoit les connexions provenant d'autres aires du cortex cérébral. Il s'agit de *connexions cortico-corticales afférentes*.
- La couche III ou couche pyramidale externe contient la majorité des neurones pyramidaux. Ces neurones émettent des connexions vers d'autres zones du cortex cérébral. Il s'agit de *connexions cortico-corticales efférentes*.
- La couche IV ou couche granulaire interne est formée de petits neurones non pyramidaux représentés essentiellement par des cellules étoilées. Les informations provenant des aires autres que corticales ainsi que de l'autre hémisphère arrivent au niveau de la couche granulaire.
- La couche V ou couche pyramidale interne contient essentiellement des neurones dont les dendrites apicales se projettent soit dans la couche moléculaire (couche I) soit dans la couche granulaire interne (couche IV). Les axones de ces neurones se projettent à distance (striatum, tronc cérébral, moelle épinière ...), contrairement à ceux de la couche pyramidale externe.
- La couche VI ou multiforme est la source principale des neurones qui se projettent sur le thalamus.

#### -IV-3.2 L'organisation du cortex cérébelleux

Le cortex cérébelleux est constitué de lobules formés d'une couche de matière blanche et de trois couches neuronales de matière grise. De l'extérieur vers l'intérieur, on trouve successivement : la couche externe (ou moléculaire), la couche ganglionnaire (ou couche des cellules de Purkinje), la couche interne (ou granulaire), et la couche de matière blanche.

- La couche moléculaire est formée d'interneurones inhibiteurs : les cellules étoilées et les cellules en corbeille. Les cellules étoilées sont positionnées en surface de la couche moléculaire tandis que les cellules en corbeille sont situées plus en profondeur. Ces cellules forment des connexions avec la couche inférieure, la couche des cellules de

Purkinje. Les axones des cellules granulaires se divisent en deux pour former les fibres parallèles dans cette couche.

- La couche des cellules de Purkinje est formée principalement des somas des cellules de Purkinje. Ces cellules établissent des contacts synaptiques avec les axones des cellules en corbeille. Le réseau dendritique des cellules de Purkinje forme des connexions avec les cellules étoilées et les fibres grimpantes. Les axones des cellules de Purkinje projettent des messages efférents vers les noyaux intra-cérébelleux puis les envoient vers la moelle, le bulbe et le cortex via le thalamus.
- La couche interne ou granulaire est composée de neurones inhibiteurs et excitateurs qui reçoivent les informations venant du cortex cérébral (fibres moussues) et de la moelle (fibres grimpantes).

#### *-IV-3.3 L'organisation de l'hippocampe*

L'hippocampe est composé d'une part de neurones glutamatergiques, organisés en 2 couches cellulaires majeures : les cellules de la couche granulaire du gyrus dentelé et les cellules pyramidales des champs ammoniques (corne d'Ammon, CA1-4) et d'autre part d'interneurones GABAergiques. Les connexions entre les neurones granulaires du gyrus dentelé et l'ensemble des neurones pyramidaux forme un circuit nommé boucle synaptique de l'hippocampe.

L'entrée d'une information provenant des cortex associatifs visuels, auditifs ou somatiques dans l'hippocampe se fait par les axones du cortex entorhinal nommés fibres perforantes (ou voie perforante, car elle traverse le subiculum et l'espace qui le sépare du gyrus dentelé). Ces synapses sur les neurones granulaires du gyrus dentelé forme la première connexion du circuit trisynaptique.

Les fibres moussues issues de la couche des cellules granulaires du gyrus dentelé créent la deuxième connexion avec les dendrites des cellules pyramidales de l'aire CA3..

Les axones des neurones pyramidaux de l'aire CA3 se divisent d'une part en fibres commissurales s'orientant vers l'hippocampe contralatéral via le corps calleux et d'autre part les collatérales de Schaffer, qui font la troisième connexion de la boucle avec les cellules de l'aire CA1.

Pour finir, les axones des cellules de l'aire CA1 projettent vers les neurones du subiculum et du cortex entorhinal. Les axones des neurones pyramidaux du subiculum se dirigent ensuite vers les noyaux sous-corticaux par la fimbria, mince lame de substance blanche au bord interne de l'hippocampe. Finalement, l'information retournera vers les aires corticales sensorielles d'où elle était partie avant d'être traitée par l'hippocampe.

#### *-IV-3.4 L'organisation du striatum*

La partie dorsale du striatum correspond au noyau caudé et au putamen, fusionnés chez le rongeur et distincts l'un de l'autre chez les primates.

La partie ventrale du striatum comprend le nucleus accumbens, subdivisé notamment en cœur (core, écorce) et coquille (shell, partie ventrale), et la partie striatale du tubercule olfactif (Voorn *et al.* 2004).

L'innervation que reçoit le striatum donne une représentation de la complexité de celui-ci. En effet, le striatum reçoit une projection massive et somatotopique de l'ensemble des territoires corticaux, ainsi que du thalamus, de l'amygdale et de l'hippocampe (Nakano 2000, Voorn *et al.* 2004). De plus, les terminaisons dopaminergiques et cholinergiques représentent, chacune, 15% des terminaisons totales dans le striatum (Zhou *et al.* 2002).

Le striatum est aussi divisé en une partie dorso-latérale liée au système sensori-moteur (cortical et thalamique), alors que la partie ventro-médiane est associée au système limbique (cortical, amygdalien et hippocampique). Le domaine entre la partie dorso-latérale et la partie ventro-médiane reçoit des afférences provenant de régions associatives (Voorn *et al.* 2004).

Le striatum fait partie des ganglions de la base, un ensemble de structures interconnectées qui régulent l'activité motrice. En plus du striatum, les ganglions de la base comprennent également le pallidum, le noyau sous-thalamique, le noyau entopédonculaire et la substance noire (SN, pars compacta et réticulata).

- Le striatum constitue la principale voie d'entrée dans les ganglions de la base. Il reçoit une projection massive et organisée de façon somatotopique provenant de l'ensemble des régions corticales.
- Il est constitué par les neurones épineux de taille moyenne (MSN). Leur activité est modulée de façons locales par plusieurs types d'interneurones, GABAergiques et cholinergiques ainsi que par les fibres dopaminergiques (système nigro-strié) et sérotoninergiques des noyaux du raphé.
- Les MSN striataux se projettent de façon directe ou indirecte vers la substance noire. La voie indirecte établit un relais dans le globus pallidus, puis dans le noyau sous-thalamique avant d'arriver à la substance noire.
- Les connexions efférentes qui vont vers le thalamus partent ensuite de la substance noire (partie réticulée) et se projettent vers le cortex.
- Enfin, la substance noire compacte envoie une projection dopaminergique massive vers le striatum.

Mis en forme : Titre 6

#### **-IV-4 Métabolisme du glutamate**

##### *-IV-4.1 Biosynthèse*

Le glutamate neuronal a plusieurs origine (Daikhin & Yudkoff 2000):

- Il a pour principale source le cycle de Krebs. L' $\alpha$ -cétoglutarate, intermédiaire du cycle de Krebs, est transformé en glutamate par la glutamate déshydrogénase.
- Il provient également de la glutamine des cellules gliales synthétisée par la glutamine synthétase à partir du glutamate recapté dans l'espace synaptique. La glutamine est libérée des astrocytes puis captée par les terminaisons axonales et transformée en glutamate par une enzyme mitochondriale : la glutaminase activée par le phosphate (GLS1 ou PAG).

- Le glutamate peut aussi être synthétisé à partir de l'aspartate et de la leucine qui sont désaminés respectivement par l'aspartate amino-transférase et l'aminotransférase des acides aminés hydrophobes.
- Et pour finir l'acide  $\gamma$ -amino-butyrique (GABA) qui peut être dégradé en glutamate et succinate semialdéhyde par la GABA-transaminase ([Medina-Kauwe et al. 1994](#)).

Le glutamate est présent à forte concentration (1-10mM) dans le cytoplasme de toutes les cellules du système nerveux central. En revanche, la concentration extracellulaire est inférieure à 1 $\mu$ M. Le glutamate est à la fois le principal neurotransmetteur exciteur du cerveau et une puissante molécule excitotoxique. Pour préserver l'homéostasie du cerveau, il est donc fondamental de maintenir la concentration extracellulaire du glutamate en dessous de son seuil d'excitotoxicité. Ce gradient de concentration est obtenu par des transporteurs membranaires très actifs, les EAATs qui sont localisés sur la membrane plasmique des neurones et des cellules gliales. Ils jouent plusieurs rôles clé :

- 1- Permettre le recyclage du glutamate
- 2- Contrôler la durée et l'étendue du message glutamatergique
- 3- Protéger les neurones

Ces systèmes de transport ont été identifiés grâce à différentes techniques : biochimie (transport de glutamate-[ $^3$ H]), immunocytochimie, hybridation in situ, électrophysiologie (*patch-clamp*) et de clonage moléculaire. La différence des concentrations en glutamate est maintenue à l'aide de transporteurs membranaires actifs. Ce type de transport présente une haute affinité de 10 $\mu$ M ([Meunier & A.Shvaloff 1992](#)).

Le transport du glutamate est dépendant de la concentration de sodium extracellulaire. Il consiste en un échange entre un ion glutamate et trois ions sodium d'une part qui entrent contre un ion potassium, d'autre part, qui sort de la cellule. Chaque ion glutamate qui entre entraîne donc avec lui une charge positive, d'où un courant membranaire entrant qui peut être détecté. Il apparaît que ce système de transport est étroitement dépendant du potentiel et du gradient de potassium (la dépolarisation ou/et l'élévation du taux de potassium externe le

réduit). Ce système présente une faible spécificité vis-à-vis du glutamate puisqu'il transporte également l'aspartate (Takahashi *et al.* 1997).

L'existence chez les rongeurs des trois premiers sous-types de transporteurs des acides aminés excitateurs a été révélée par des études de biologie moléculaire. Ils ont été nommés GLT1 (Glutamate Transporter 1, (Pines *et al.* 1992)), GLAST (Glutamate Aspartate Transporter, (Storck *et al.* 1992)) et EAAC1 (Excitatory Amino Acid Carrier, (Kanai & Hediger 1992)).

Ces études ont abouti au clonage chez l'homme de 5 sous-types de transporteurs nommés EAAT1 (GLAST), EAAT2 (GLT1), EAAT3 (EAAC1) EAAT4 et EAAT5 (Tableau 1) (Arriza *et al.* 1994, Fairman *et al.* 1995), présentant jusqu'à 65% d'homologie entre eux et 90% d'homologie avec les orthologues de rongeurs.

#### *-IV-4.2 Le stockage vésiculaire*

Le glutamate cytoplasmique est stocké dans des vésicules grâce à des transporteurs (VGLUT1 à 3) en attendant d'être libéré dans l'espace synaptique après un potentiel d'action. Le chapitre V leur est consacré.

#### *-IV-4.3 La libération dans l'espace synaptique et fixation sur les récepteurs*

Sous l'action d'un potentiel d'action, le glutamate accumulé dans les vésicules synaptiques, est libéré dans l'espace synaptique après fusion des vésicules synaptiques à la surface membranaire présynaptique. Le glutamate, une fois libéré, se fixe sur des récepteurs glutamatergiques ionotropiques (NMDA, AMPA et Kaïnate) ou métabotropiques (mGluR,) postsynaptiques. La plupart de ces récepteurs sont excitateurs.

En plus des principaux récepteurs du glutamate (NMDA, AMPA, Kaïnate, mGluR), il existe des récepteurs Delta, présentant une homologie de séquence avec les récepteurs AMPA, mais dont l'appartenance aux récepteurs ionotropiques du glutamate reste incertaine (Schmid & Hollmann 2008).

- Récepteurs ionotropiques ou récepteurs-canaux

Ils portent le nom de leur agoniste le plus sélectif.

Les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate) sont activés par le NMDA, le L-glutamate et le L-aspartate. À l'état de repos, le magnésium ( $Mg^{2+}$ ) reste fixé au milieu du canal ionique

et bloque le passage des ions. La dépolarisation de la membrane est nécessaire pour que le  $Mg^{2+}$  soit éliminé. Le glutamate peut alors être effectif pour la transmission de l'influx nerveux, si la glycine est fixée sur son propre site sur le récepteur NMDA. La fixation du glutamate provoque l'entrée des ions calcium qui augmentent encore davantage la dépolarisation de la membrane (Ozawa *et al.* 1998). Le message induit par les récepteurs NMDA est lent et étendu dans le temps. Il joue également un rôle central dans la plasticité synaptique, comme dans la potentialisation à long terme (LTP) ainsi que dans la dépression à long terme (LTD) dans l'hippocampe, le cortex et le cervelet (Casado *et al.* 2002, Daoudal & Debanne 2003). Tous ces processus sont la base des mécanismes cellulaires de la mémoire (Blitzer *et al.* 2005)

Les récepteurs AMPA (Acide  $\alpha$ -amino-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionique) peut être directement activés par l'AMPA et par le glutamate (sans aucun potentiel d'action préalable). La fixation du glutamate est suffisante pour l'activation du récepteur AMPA. Ils sont majoritairement perméables au  $Na^+$  et  $K^+$ . L'activation du récepteur AMPA permet l'ouverture du canal sodium et la dépolarisation de la dendrite (Ozawa *et al.* 1998, Pinheiro & Mulle 2008).

Les récepteurs Kainate sont également des récepteurs ionotropiques auxquels se lie le glutamate et une substance extraite de l'algue rouge *Digenea simplex* : le Kainate. Tout comme le récepteur AMPA, il est perméable aux ions sodium et potassium et son activation entraîne les mêmes événements que l'activation du récepteur AMPA (Ozawa *et al.* 1998). Les récepteurs Kainate sont situés au niveau post-synaptique et également pré-synaptique, où ils régulent positivement la transmission glutamatergique (autorécepteurs) ou GABAergiques (hétérorécepteurs) (Huettner 2003, Rodriguez-Moreno & Sihra 2007). Bien que possédant la structure des récepteurs ionotropiques, les récepteurs Kainate pré-synaptique présentent une action métabotrope. Ils activent certaines voies de signalisation intra-cellulaire, sans intervention de canaux ioniques (Pinheiro & Mulle 2008, Rodriguez-Moreno & Sihra 2007).

Les récepteurs delta présentent deux sous-unités (appelés  $\delta 1$  et  $\delta 2$ ) localisées différemment dans le cerveau. Delta2 est situé majoritairement au niveau des cellules de Purkinje dans le cervelet. Delta1 est exprimée dans les cellules ciliées internes de l'appareil auditif et faiblement dans les cellules pyramidales et granulaires de l'hippocampe (Schmid & Hollmann 2008). Un modèle de souris génétiquement modifiée présentant une mutation ponctuelle de la sous-unité delta2 montre une altération de la coordination des mouvements et

de l'apprentissage moteur. D'autre part, la disparition de la sous-unité Delta1 chez les souris, induit un déficit auditif. Les sous-unités delta semblent jouer un rôle important dans la neurotransmission glutamatergique. Par contre, aucun agoniste des récepteurs ionotropiques n'a une action sur les sous-unités Delta et leur activité ne semble pas être liée aux récepteurs canaux (Schmid & Hollmann 2008).

- Récepteurs métabotropiques

Les récepteurs métabotropiques (mGluRs) font partie de la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. L'activation des récepteurs métabotropiques induit l'activation de seconds messagers comme l'AMP-cyclique ou l'inositol-3-phosphate (IP-3) déclenchant les voies de phosphorylation dépendant de l'AMPc ou la libération du calcium au niveau du réticulum endoplasmique et les voies de phosphorylation dépendante de la protéine kinase C.

Les mGluRs sont classés en trois groupes en fonction de leur homologie de séquence, de leur pharmacologie et des voies de transduction auxquelles ils sont couplés (Conn & Pin 1997).

- Récepteurs ionotropiques et métabotropiques pré-synaptique

Les récepteurs du glutamate ionotropiques et métabotropiques sont également localisés au niveau pré-synaptique. Leur fonctionnalité a été étudiée pharmacologiquement et biochimiquement sur des tranches de cerveaux et sur des synaptosomes. Les récepteurs métabotropiques contrôlent (entre autre) la libération des neurotransmetteurs. Les récepteurs Kainate ionotropiques agissent sur la plasticité pré-synaptique à court terme. Les récepteurs AMPAs ionotropiques, sous l'action d'un agoniste, dépolarisent les terminaisons pré-synaptiques, mais le mécanisme reste pour l'instant inconnu. Il semble donc que des récepteurs ionotropiques pré-synaptiques facilitent la neurotransmission (Pinheiro & Mulle 2008).

#### *-IV-4.4 Arrêt du signal*

L'essentiel du glutamate présent dans l'espace synaptique est recapté par les neurones pré et post synaptique et par les astrocytes avoisinant (Danbolt 2001). Comme on l'a déjà vu, dans les astrocytes, il va y être transformé en glutamine sous l'action de la glutamine synthétase.

## **-V- LES TRANSPORTEURS VÉSICULAIRES DU GLUTAMATE**

### **-V-1 Le transport vésiculaire du glutamate et ses inhibiteurs**

Dés 1983, Naito et Ueda mettaient en évidence une capture de [<sup>3</sup>H]-Glutamate ATP-dépendante par une préparation de vésicules purifiées de cerveau de bœuf (Naito & Ueda 1983). D'autres travaux ont apporté la preuve d'une distinction entre la consommation d'ATP et la capture du glutamate (Maycox *et al.* 1990). En effet, si on remplace la V-ATPase par la rhodopsine, qui est capable de générer un gradient de photons de façon photo-dépendante, cela n'altère pas le stockage du glutamate par les vésicules (Maycox *et al.* 1990). L'hydrolyse d'ATP par la V-ATPase génère un gradient électrochimique de protons de part et d'autre de la membrane vésiculaire (Beyenbach & Wiczorek 2006). Le transporteur vésiculaire utilise l'énergie de ce gradient pour accumuler le glutamate dans la vésicule avec une affinité apparente de l'ordre du millimolaire (Carlson *et al.* 1989, Maycox *et al.* 1988, Naito & Ueda 1983). L'ensemble des données de la littérature suggère une cinétique d'accumulation du glutamate à un site de liaison, suggérant l'existence d'un monomère.

Le transport du glutamate présente des caractéristiques bioénergétiques différentes de celles des monoamines, de l'acétylcholine ou du GABA. Il dépend majoritairement de la composante  $\Delta\Psi$  du gradient du pH (Carlson *et al.* 1989, Maycox *et al.* 1988, Naito & Ueda 1983). De plus, le transport vésiculaire du glutamate dépend également des ions chlore à une concentration physiologique de 2 à 5mM pour un transport optimal (Maycox *et al.* 1988, Naito & Ueda 1985). Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer le mécanisme d'action des ions chlorures : • Une faible concentration des anions Cl<sup>-</sup> pourrait être nécessaire à l'établissement d'un  $\Delta\Psi$  minimal, nécessaire au transport du glutamate (Maycox *et al.* 1988, Tabb *et al.* 1992) ; • Les anions Cl<sup>-</sup> pourraient réguler le transport du glutamate indépendamment de  $\Delta\Psi$  par une réaction directe avec VGLUT (Hartinger & Jahn 1993) • Les anions Cl<sup>-</sup> pourraient agir selon les deux mécanismes cités précédemment, intervenant sur le gradient électrochimique de protons par régulation du  $\Delta pH$  et du  $\Delta\Psi$  et par action directe avec VGLUT (Wolosker *et al.* 1996).

Après les premières études sur le transport du glutamate, des recherches ont été effectuées par différentes équipes afin de découvrir des substances susceptibles d'inhiber les VGLUTs. Fonnum et ses collaborateurs ont été les premiers à identifier des molécules plus ou moins spécifiques des VGLUTs (Fykse & Fonnum 1991). Des inhibiteurs compétitifs

appartenant à la famille des colorants ont été identifiés. Les plus efficaces sont le bleu Evans et le bleu Trypan avec une affinité d'une dizaine de nanomolaire (Roseth *et al.* 1995, Roseth *et al.* 1998). Le Rose Bengale inhibe également l'accumulation vésiculaire de glutamate avec une affinité du même ordre que les deux autres colorants mais de manière non compétitive (Ogita *et al.* 2001). Il existe très peu d'agents pharmacologiques ciblant les VGLUTs et ils sont peu spécifiques.

Un facteur protéique (nommé IPF) inhibe l'accumulation vésiculaire du glutamate et du GABA ainsi que la libération in vitro du glutamate, du GABA ou de la sérotonine par les terminaisons nerveuses (Ozkan *et al.* 1997, Ogita *et al.* 2001). Deux enzymes de la glycolyse, dont l'activité produit l'ATP utilisé préférentiellement par la V-ATPase, sont présentes sur la membrane des vésicules synaptiques glutamatergiques (Ikemoto *et al.* 2003). Ce couplage entre la production d'ATP par glycolyse et son utilisation pour engendrer le  $\Delta\mu\text{H}^+$  implique de nouvelles possibilités de régulation du remplissage vésiculaire (Figure 20).

### **-V-2 Découverte des transporteurs vésiculaires du glutamate**

Depuis 2000, trois transporteurs vésiculaires du glutamate (VGLUT1-3) ont été identifiés. Ils sont tous les trois très homologues et permettent l'accumulation  $\text{H}^+$ -dépendante du glutamate dans des vésicules synaptiques.

#### Transporteur vésiculaire du glutamate 1 (VGLUT1) :

En 1994, un premier transporteur a été défini comme un transporteur de phosphate inorganique dépendant du sodium spécifique du cerveau (BNPI) (Ni *et al.* 1994). Son expression dans des ovocytes de xénope entraîne un transport de phosphate inorganique dépendant du sodium (Ni *et al.* 1994). Effectivement, BNPI présente une homologie d'environ 30% avec une famille de transporteur de phosphate inorganique sodium-dépendants (NAPi). Les transcrits de BNPI sont très abondants au niveau de neurones du cortex cérébral, hippocampique et cérébelleux. BNPI est également trouvé au niveau des noyaux thalamiques, des bulbes olfactifs et de certains noyaux du tronc cérébral (Ni *et al.* 1995). La protéine BNPI est associée aux vésicules au niveau des terminaisons synaptiques formant des synapses asymétriques caractéristiques des terminaisons neuronales glutamatergiques (Bellocchio *et al.* 1998), suggérant un rôle pré-synaptique dans les neurones glutamatergiques. En 2000, deux groupes démontrent, indépendamment, que BNPI est un transporteur vésiculaire du glutamate.

Bellochio et collaborateurs rapportent que des vésicules purifiées à partir de cellules PC12 transfectées avec BNPI catalysent un transport de glutamate proton-dépendant (Bellochio *et al.* 2000). D'autre part, Takamori et collaborateurs établissent que lorsque des interneurons isolés sont transfectés avec BNPI, ils acquièrent la capacité de libérer du glutamate (Takamori *et al.* 2000). Ils en concluent donc que BNPI, à lui seul, permet d'attribuer le phénotype glutamatergique à des interneurons GABAergiques (Takamori *et al.* 2000). Suite à ces travaux, BNPI a été rebaptisé Transporteur Vésiculaire du glutamate de type 1 (VGLUT1).

#### Transporteur vésiculaire du glutamate 2 (VGLUT2)

En 2000, un deuxième transporteur (DNPI), présentant 82% d'homologie avec BNPI, est identifié (Aihara *et al.* 2000). DNPI appartient à la famille des NAPI. En 2001, plusieurs groupes (dont le nôtre) montre que DNPI transporte le glutamate avec les mêmes caractéristiques que VGLUT1 (Fremeau *et al.* 2001, Herzog *et al.* 2001, Takamori *et al.* 2001, Varoqui *et al.* 2002). VGLUT2, comme VGLUT1, est associé à des vésicules synaptiques présentant dans des terminaisons nerveuses formant des synapses asymétriques (Herzog *et al.* 2001). L'ARN messager codant pour VGLUT2 est synthétisé par un continuum de neurones sous-corticaux allant du diencéphale jusqu'à la moelle épinière (Aihara *et al.* 2000, Fremeau *et al.* 2001, Herzog *et al.* 2001).

#### Transporteur vésiculaire du glutamate 3 (VGLUT3)

Enfin en 2002, un troisième transporteur est cloné par notre équipe (Gras *et al.* 2002) puis par d'autres groupes (Fremeau *et al.* 2002, Schafer *et al.* 2002, Takamori *et al.* 2002). D'un point de vue aussi bien structural que fonctionnel, VGLUT3 se distingue assez peu de VGLUT1 et VGLUT2. Par contre, sa distribution est tout à fait surprenante (Chapitre V-4). De plus, en microscopie électronique, nous avons observé la présence de VGLUT3 dans des terminaisons nerveuses non glutamatergiques (Gras *et al.* 2002).

### **-V-3 Structure tridimensionnelle des VGLUTs**

La séquence protéique des trois VGLUTs présente un fort pourcentage d'identité (supérieur à 70%). L'analyse du profil d'hydropathicité suggère l'existence de 6 à 12 domaines transmembranaires hydrophobe. Récemment, Almqvist et collaborateurs ont cristallisé puis déterminé la structure tridimensionnelle d'un distant homologue bactérien des VGLUTs (le transporteur de glycérol-3 d'*Escherichia coli*, (Almqvist *et al.* 2007)). Cela les a

conduits à proposer la structure tridimensionnelle à 12 segments transmembranaires reliée par des courtes boucles cytoplasmiques et vésiculaires. Le modèle présenterait une conformation close du côté intra-vésiculaire et une ouverture accessible à l'eau et d'autres substrats du côté du cytoplasmique. De même, l'équipe de Moriyama a proposé une structure semblable mais avec des longueurs différentes pour les domaines transmembranaires (Juge *et al.* 2006).

#### **-V-4 Localisation anatomique des VGLUTs**

##### Transporteur vésiculaire du glutamate 1 (VGLUT1)

L'ARNm codant VGLUT1 est principalement réparti dans le bulbe olfactif, les couches II-VI du cortex, dans l'hippocampe (gyrus dentelé, corne d'Amon (CA1-CA3), subiculum), les couches granulaires du cervelet, et la matière grise péri-aqueductales (Herzog *et al.* 2001, Ni *et al.* 1994, Ni *et al.* 1995, Varoqui *et al.* 2002).

Une faible quantité est localisée au niveau du septum latéral, dans certains noyaux thalamiques et dans le subiculum. L'ARNm de VGLUT1 est donc principalement exprimé dans les structures corticales du système nerveux central.

Au niveau protéique, VGLUT1 est distribué de façon ubiquitaire dans le cortex cérébral, dans l'hippocampe (sauf la couche des cellules pyramidales et des grains), les bulbes et les tubercules olfactifs, le caudé-putamen, le noyau accumbens et le septum (Bellocchio *et al.* 1998, Freneau *et al.* 2001, Fujiyama *et al.* 2001, Herzog *et al.* 2001, Herzog *et al.* 2004b, Kaneko & Fujiyama 2002). Il est également présent au niveau du thalamus, la couche moléculaire et les fibres mossues de la couche granulaire du cervelet, le noyau pontin et l'hypothalamus ainsi que dans le tronc cérébral inférieur et dans la moelle épinière dorsale et ventrale (Varoqui *et al.* 2002). Ainsi, la distribution de l'ARNm codant VGLUT1 et de la protéine présente une répartition différente. Cela tient au fait que les neurones glutamatergiques sont de neurones de projection. Les protéines VGLUT1 et VGLUT2 sont présentes exclusivement dans des terminaisons nerveuses situées à distance du soma neuronal.

##### Transporteur vésiculaire du glutamate 2 (VGLUT2)

L'étude de l'expression de VGLUT2 par Northern Blot et Hybridation *in situ* a permis d'observer une répartition qui est complémentaire de celle de VGLUT1. L'ARNm de VGLUT2 est visualisé au niveau des régions sous-corticales allant du thalamus à la moelle

épineière (Aihara et al. 2000, Herzog et al. 2001). Il est surtout présent au niveau du thalamus, de l'habénula latérale et médiane, l'épithalamus et le noyau sous-thalamique (Aihara et al. 2000, Herzog et al. 2001). L'ARNm est également observé au niveau de l'hypothalamus en quantité modérée, plus précisément dans les noyaux ventro-médian, arqué et supraoptique. Par contre, l'ARNm de VGLUT2 est peu représenté dans les structures corticales (cortex, hippocampe ou amygdale).

Au niveau protéique, VGLUT2 est présent dans les couches I et IV et à plus faible intensité dans la couche VI du cortex, dans la couche superficielle externe de la couche des grains du gyrus dentelé, l'amygdale, le thalamus, le caudé-putamen, du globus pallidus, les collicules inférieurs et supérieurs, la substance noire, le tronc cérébral, le cervelet, le bulbe rachidien et la moelle épinière (Fremeau et al. 2001, Fujiyama et al. 2001, Herzog et al. 2001, Kaneko & Fujiyama 2002, Varoqui et al. 2002).

#### Transporteur vésiculaire du glutamate 3 (VGLUT3)

L'ARNm codant pour VGLUT3 est présent dans des interneurons du caudé-putamen, de l'accumbens, du cortex cérébral et de l'hippocampe. Le marquage est intense au niveau des noyaux du raphé (Gras et al. 2002, Herzog et al. 2004a, Schafer et al. 2002). Les neurones exprimant VGLUT3 sont globalement peu nombreux et répartis de façon précise dans un nombre limité de structures.

Pour la protéine, celle-ci est présente dans certaines couches corticales (II, V et VI), le septum latéral, l'ensemble du striatum et de l'accumbens, les noyaux basolatéral et basomédian de l'amygdale, la substance noire compacte, l'aire tegmentale ventrale, le noyau interpedonculaire et les raphés dorsal et médian (Herzog et al. 2004a, Schafer et al. 2002).

#### **-V-5 Expression de VGLUT3 dans des neurones hétérologues**

De façon tout à fait surprenante, VGLUT3 est exprimé par des neurones non glutamatergiques, incluant les interneurons cholinergiques au niveau du striatum dorsal et ventral, les interneurons GABAergiques au niveau de l'hippocampe et du cortex cérébral et les neurones sérotoninergiques au niveau des noyaux du raphé (Herzog et al. 2004a, Schafer et al. 2002).

### *-V-5.1 VGLUT3 dans les interneurones cholinergiques*

Dans les neurones cholinergiques, l'acétylcholine (ACh) est synthétisée à partir de choline et d'acétyl-coenzyme A au cours d'une réaction catalysée par la choline acétyltransférase (ChAT). L'acétyl coenzyme A provient du métabolisme du glucose dans la mitochondrie. La choline, qui est l'élément limitant de la synthèse d'acétylcholine, est captée du milieu extra-cellulaire par un transporteur sodium-dépendant (ChT). La ChAT est un marqueur spécifique des neurones cholinergiques. Contrairement à de nombreux neuromédiateurs, qui sont retransportés dans les neurones qui les ont libérés (recapture) après exocytose, l'acétylcholine est essentiellement dégradée en choline et en acétate par les acétylcholinestérases (AChE) de l'espace synaptique. La demi-vie de l'ACh libérée est de 1 à 2 millisecondes.

L'ensemble des noyaux constituant le système cholinergique est localisé dans le prosencéphale et le tronc cérébral. Le prosencéphale contient des structures dont la bande de Broca, le noyau préoptique, la substance innominée, le noyau basal de Meynert et les noyaux du septum. Les projections provenant des noyaux Ch1 à Ch4 sont majoritairement corticales.

- La région Ch1 correspond au noyau médian du septum formé par les cellules cholinergiques de petite taille.

- La région Ch2 correspond au bras vertical de la bande de Broca formée par les cellules cholinergiques fusiformes et de taille moyenne. Les deux noyaux Ch1 et Ch2 représentent la principale origine de la voie septo-hippocampique.

- La région Ch3 est formée par la partie latérale du bras horizontal de la bande de Broca. Elle constitue une prolongation entre les zones Ch1 et Ch4.

- La région Ch4 est constituée de plusieurs structures dont le noyau basal de Meynert, le globus pallidus, le noyau de l'anse lenticulaire, la partie médiane du bras horizontal de la bande de Broca et le noyau préoptique où les cellules sont réunies en amas. Les axones de ces cellules innervent aussi le cortex cérébral.

- Les deux derniers noyaux (Ch5 et Ch6) sont localisés dans le tronc cérébral. La région Ch5 est formée par les noyaux cunéiforme, pédonculaire et parabrachial et le noyau Ch6 représente le noyau tegmental latéral. Les projections de ces deux noyaux constituent la voie dorsotegmentale ascendante. Elles innervent les noyaux thalamiques, l'habenula, les colliculi supérieurs.

Comme le montrent les études de pathologies humaines (maladie de Parkinson, maladie d'Alzheimer, démence à corps de Lewy) ou les modèles animaux, l'acétylcholine est associée aux processus cognitifs (Perry *et al.* 1999). Chez des sujets sains, des antagonistes des récepteurs muscariniques de l'acétylcholine provoquent l'apparition de confusions mentales semblables à celles des patients atteints de démence. L'utilisation d'inhibiteurs de l'AChE, diminue l'intensité de ces confusions mentales. On peut donc en déduire que, dans le système nerveux sain, l'acétylcholine contrôle le niveau d'attention et d'éveil (Perry & Kellar 1995, Sarter & Parikh 2005).

Dans le système cholinergique, VGLUT3 est exclusivement exprimé au niveau du striatum

D'un point de vue neurocytologique, le striatum se compose

- 1) des neurones efférents GABAergiques appelés les neurones épineux de taille moyenne (medium spiny neurons ou MSN). Les MSN représentent 95% des neurones striataux.
- 2) d'interneurones cholinergiques (1-2% des neurones striataux) et GABAergiques non épineux.

Ces populations neuronales se répartissent entre 2 territoires appelés « *patch* » et matrice (Desban *et al.* 1993). La matrice, représente 85% du tissu striatal qui est caractérisé par l'expression majoritaire des marqueurs cholinergiques (Desban *et al.* 1993). La matrice est également parcourue par des striosomes (ou filots) qui sont caractérisés par l'expression de récepteurs aux opioïdes de type mu. La région sensorimotrice du striatum est principalement constituée de matrice, alors que la région limbique est enrichie en striosomes (Kawaguchi *et al.* 1995).

Dans le striatum, on trouve l'ARNm codant VGLUT3 dans les somas des interneurones cholinergiques situés dans le striatum dorsal, l'accumbens et la partie striatale des tubercules olfactifs (Gras *et al.* 2002, Nickerson Poulin *et al.* 2006, Schafer *et al.* 2002). Dans ces interneurones, VGLUT3 est colocalisé avec le transporteur vésiculaire de l'acétylcholine (VACHT) et la ChAT. De plus, contrairement à VGLUT1 et VGLUT2 qui sont exprimés uniquement dans les terminaisons nerveuses, VGLUT3 est détecté dans le soma, les dendrites proximales et les terminaisons de l'interneurone cholinergique (Fremeau *et al.* 2002, Gras *et al.* 2002, Nickerson Poulin *et al.* 2006).

#### -V-5.2 VGLUT3 dans les interneurones GABAergiques

L'acide gamma aminobutyrique (GABA) est le principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central. Il devient inhibiteur à l'âge adulte mais qui est excitateur lors du développement embryonnaire (Ben-Ari 2002). Il possède par ailleurs un rôle neurotrophique, c'est-à-dire qu'il favorise la croissance de certains neurones.

Le GABA est synthétisé à partir de l'acide glutamique sous l'action de l'acide glutamique décarboxylase (GAD) et catabolisé par la GABA transaminase (GABAT). Les propriétés inhibitrices du GABA dans le système nerveux central sont utilisées dans certains traitements de l'épilepsie, en inhibant sa dégradation (ex : acide valproïque inhibiteur de la GABAT) ou sa recapture (GABA-pentine, inhibiteur des GAT)

À ce jour, trois types de récepteurs du GABA ont été identifiés. Deux récepteurs canaux, perméables aux anions (chlorure et hydrogénocarbonate principalement), nommés GABA<sub>A</sub> et GABA<sub>C</sub>, et les récepteurs métabotropiques nommés GABA<sub>B</sub>. Les récepteurs GABA<sub>A</sub> sont la cible des anxiolytiques de la famille des benzodiazépines qui potentialisent (augmentent) leur effet inhibiteur du système nerveux central.

On trouve le GABA essentiellement dans des interneurons ainsi que dans quelques neurones de projections efférents. Les interneurons GABAergiques présentent une forte diversité morphologique (pour revue voir la classification de (Ascoli *et al.* 2008)). L'ARNm de VGLUT3 est exprimé exclusivement dans certains interneurons GABAergiques du cortex cérébral et de l'hippocampe (Fremeau *et al.* 2002, Gras *et al.* 2002, Herzog *et al.* 2004a, Schafer *et al.* 2002, Somogyi *et al.* 2004). Dans ces interneurons, VGLUT3 colocalise avec les marqueurs GABAergiques (l'acide glutamique décarboxylase (GAD) et le transporteur vésiculaire des acides aminés inhibiteurs (VIAAT) (Herzog *et al.* 2004a, Somogyi *et al.* 2004).

Dans le cortex et l'hippocampe, les terminaisons nerveuses des interneurons, dits « en corbeille » (*basket cells*) à cause de leur forme, entourent les somas et dendrites proximales des neurones glutamatergiques pyramidaux. Deux grands groupes se distinguent : les interneurons GABAergiques qui expriment la parvalbumine (PV, protéine liant le calcium) et ceux qui coexpriment la cholécystokinine (CCK, neuropeptide) (Somogyi *et al.* 2004). VGLUT3 est observé dans 1,3% des interneurons GABAergiques corticaux des couches II et III (PV- et CCK-positifs, (Hioki *et al.* 2004)). Les interneurons GABAergiques exprimant VGLUT3, la CCK et d'autres marqueurs moléculaires, forment un réseau de connexions très robuste permettant de synchroniser l'activité rythmique des neurones

pyramidaux du cortex et de l'hippocampe (Ascoli et al. 2008, Hioki et al. 2004). L'équipe de Seal et al. a montré une hyperexcitabilité corticale des souris n'exprimant plus VGLUT3 (KO-VGLUT3, (Seal et al. 2008)). Ces auteurs suggèrent une implication de VGLUT3 au sein du système GABAergique, dans la genèse des crises d'épilepsie et proposent cette souris comme modèle murin d'épilepsie de type absence.

#### *-V-5.3 VGLUT3 dans les neurones sérotoninergiques*

Le système sérotoninergique est constitué de neurones distribués en 9 groupes le long de la ligne médiane du tronc cérébral. Les groupes les plus postérieurs (B1 à B4) comprenant les noyaux des raphés magnus, obscurus, pallidus et pontis projettent vers la moelle épinière et le système nerveux périphérique. L'innervation du cerveau antérieur provient des groupes rostraux (B6 à B9) comprenant le raphé dorsal (RD) et le raphé médian (RM).

Le système sérotoninergique reste très hétérogène sur les plans anatomique et structural. Les raphés dorsal et médian contiennent des neurones sérotoninergiques, GABAergiques, peptidergiques et quelques neurones dopaminergiques (Michelsen et al. 2007). VGLUT3 a également été observé dans des neurones glutamatergiques du raphé qui se projettent vers l'hippocampe et le septum (Jackson et al. 2009).

Les noyaux des raphés dorsal et médian se projettent dans tout le cerveau mais à des intensités différentes (Hensler 2006, Molliver 1987). Les projections de la partie rostrale du raphé dorsal se dirigent vers le striatum alors que la partie caudale du raphé dorsal se projette dans le septum latéral et la substance noire (Hensler 2006, Molliver 1987, Waselus et al. 2006). Les terminaisons du raphé dorsal se retrouvent au niveau du hile du gyrus dentelé tandis que les terminaisons du raphé médian sont présentes dans l'ensemble de l'hippocampe (Molliver 1987).

La neurotransmission sérotoninergique intervient au niveau de nombreuses fonctions périphériques et centrales. En particulier, la sérotonine (5-HT) est largement impliquée chez l'homme dans le contrôle des émotions et de l'humeur, dans l'anxiété, la dépression, l'irritabilité, l'impulsivité et l'agressivité. L'anxiété et la dépression font partie des pathologies dont l'importance grandit avec les conjonctures actuelles et futures au point de devenir la deuxième cause de maladies invalidantes (Cryan & Holmes 2005). Une classe majeure d'antidépresseurs sont des inhibiteurs spécifiques de la recapture de la sérotonine (SSRI) et de son transporteur plasmique (SERT). La sérotonine n'est pas le seul

neurotransmetteur à intervenir dans l'anxiété et la dépression puisque le glutamate, la dopamine, la noradrénaline, et le GABA font également partie du circuit limbique. De nouvelles données indiquent que des substances pharmacologiques glutamatergiques pourraient être utilisées pour soigner des patients anxieux ou dépressifs qui ne réagiraient pas aux traitements sérotoninergiques (Bergink *et al.* 2004).

L'hypothèse selon laquelle les neurones 5-HT pouvaient utiliser le glutamate comme cotransmetteur a été formulée il y a presque vingt ans (Kaneko *et al.* 1990). Par la suite, Johnson et collaborateurs ont observé la libération de glutamate par des neurones sérotoninergiques en microculture (Johnson 1994). Plus récemment, les présences de l'ARNm codant pour VGLUT3 dans les somas et du transporteur dans des terminaisons sérotoninergiques ont été rapportées (Gras *et al.* 2002, Schafer *et al.* 2002, Somogyi *et al.* 2004). Cependant, bien que les ARNm de VGLUT3 soient présents dans tous les somas sérotoninergiques, VGLUT3 ne semble pas être présent dans toutes les terminaisons 5-HT (Amilhon *et al.* soumis, Freneau *et al.* 2002, Schafer *et al.* 2002).

## **-VI- DEUX PATHOLOGIES LIÉES AU GLUTAMATE**

Le glutamate intervient dans des fonctions cérébrales comme la mémoire, l'apprentissage et la motricité. Cependant, une libération trop forte ou trop prolongée de glutamate entraîne une excitotoxicité et la mort des neurones postsynaptiques. En effet, la suractivation des récepteurs AMPA et NMDA du glutamate provoque une entrée massive de calcium et la stimulation de nombreuses enzymes cellulaires. Le calcium va induire la production de radicaux libres, du stress oxydatif et une atteinte du métabolisme mitochondrial (Camacho & Massieu 2006) et déséquilibrer la balance énergétique de la cellule contribuant à sa mort.

Différentes pathologies neurologiques sont causées par une dégénérescence neuronale aiguë ou progressive. C'est le cas de l'ischémie (Camacho & Massieu 2006) et de l'hypoglycémie cérébrales, des traumatismes du système nerveux central, de l'épilepsie (Chapman 2000) ou des pathologies d'étiologie neurodégénérative comme la sclérose latérale amyotrophique (Turner *et al.* 2009), la maladie de Huntington (Estrada Sanchez *et al.* 2008), la maladie d'Alzheimer (Francis 2003), la maladie de Parkinson (Chaudhuri & Schapira 2009) ou le neuro SIDA.

## **-VI-1 La maladie d'Alzheimer**

Au cours de ce travail, j'ai étudié les terminaisons glutamatergiques dans des échantillons post mortem de sujets humains témoins ou atteints par la maladie d'Alzheimer.

Aloïs Alzheimer (14 juin 1864 - 19 décembre 1915) était un psychiatre et un neuropathologiste allemand qui décrit en 1906 pour la première fois l'histopathologie caractéristique de la maladie d'Alzheimer. Il révéla grâce à une nouvelle technique de coloration à l'aniline et des imprégnations argentiques la présence de plaques séniles et la dégénérescence neurofibrillaire.

Actuellement, on évalue à 600 000 - 850 000 le nombre de sujets atteints par la maladie d'Alzheimer (MA) en France et plus de 6 millions en Europe (données de l'Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale, INSERM, du 17 mars 2008 et de l'Institut National de Prévention et d'Éducation pour la Santé, INPES, du 7 avril 2008). La MA et les autres pathologies neurologiques représentent 6% des malades de plus de 65 ans. Actuellement, 225 000 nouveaux cas par an sont comptabilisés. Le vieillissement de la population va conduire à une nette augmentation des cas de MA. L'INPES prévoit au minimum 2,1 millions de malades de plus de 75 ans et 1 million de personnes atteintes de plus de 85 ans en 2050 en France (INPES, numéro 5, mai 2005) soit plus de 80 millions de cas en 2040 dans le monde (INPES, novembre 2008). Aujourd'hui, la maladie d'Alzheimer est responsable de 75% des cas de démence.

La MA est définie comme une maladie dégénérative qui provoque des lésions du cerveau. Elle est caractérisée par un début progressif de démence avec une atrophie cérébrale diffuse. La fréquence de démence augmente avec l'âge, soit 36% des causes de démence chez les 65-74 ans, 64% chez 75-84 ans, 96% chez les 85 ans et plus. Le principal facteur de risque connu de la démence et de la MA reste l'âge. Les symptômes comprennent des pertes de mémoire, des difficultés de jugement, de raisonnement et d'accomplissement des tâches quotidiennes, de même que des changements dans les capacités de communication, dans l'humeur et dans les comportements. Cette dégradation se fait sur un mode progressif et irréversible. La MA est donc décrite comme l'aggravation progressive des « quatre A » : Amnésie, Apraxie (troubles gestuels), Aphasie (troubles du langage) et Agnosie (trouble de la reconnaissance des objets).

Des échelles d'évaluation permettent de mesurer le déclin des fonctions cognitives du patient et de juger la sévérité de l'évolution. Il s'agit, par exemple, de l'échelle de Blessed, du « *mini-mental test* », du « *clinical dementia rating* » (CDR). Dans nos études, l'état cognitif des sujets a été évalué de leur vivant par l'échelle clinique de démence – Qualidem (Hughes *et al.* 1982). Un entretien du patient et d'un proche permet d'évaluer six axes : 1. Mémoire ; 2. Orientation ; 3. Jugement, résolution de problèmes ; 4. Comportement social ; 5. Comportement à la maison ; 6. Soins personnels.

La forme la plus courante de la MA est la forme sporadique qui représente 90 à 95% de tous les cas. Le rôle de l'hérédité dans la forme sporadique n'est pas clair et continue de faire l'objet de nombreuses recherches. Une forme moins courante de la MA, la forme familiale autosomique dominante, représente 5 à 10% de tous les cas connus. Dans certaines familles, le gène autosomique dominant est transmis d'une génération à l'autre.

Il y a deux écoles pour expliquer les mécanismes qui conduisent à la MA. La « théorie amyloïde neurodégénérative » et la « théorie vasculaire » s'opposent aujourd'hui pour expliquer la physiopathologie de la maladie.

Pour les tenants de la « théorie amyloïde », le clivage anormal de la protéine précurseur  $\beta$  amyloïde (APP) favoriserait l'agrégation et l'accumulation du peptide  $\beta$  amyloïde dans l'espace extracellulaire. Le déséquilibre entre sa production et sa clairance serait le phénomène initiateur de la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer, conduisant à la formation de plaques séniles et, secondairement, aux facteurs neurodégénératifs (DNF) et aux atteintes neuronales et synaptiques.

Pour la « théorie vasculaire », l'exposition au cours de la vie à des facteurs de risques et pathologies cardiovasculaires, associée aux conséquences du vieillissement cardiaque et de la paroi artérielle, serait à l'origine d'une diminution de perfusion sanguine chronique débutant dans des régions cérébrales fragiles par l'amincissement de l'épaisseur des vaisseaux. Cette hypoperfusion induirait la cascade physiopathologique pouvant conduire à la MA ou brutalement suite à une maladie vasculaire cérébrale, exposant aux troubles cognitifs vasculaires au stade démentiel ou non.

Il apparaît donc un lien entre les mécanismes vasculaires et la maladie d'Alzheimer sporadique, la présence d'une hypoperfusion cérébrale. Ainsi l'hypothèse vasculaire explique les événements métaboliques, biochimiques et physiopathologiques du développement de la

MA secondairement à une hypoperfusion cérébrale: ce qui n'est pas le cas de l'hypothèse amyloïde. Cette hypoperfusion cérébrale conduit à la démence vasculaire avec atteintes cognitives et sensori-motrices et à la démence d'Alzheimer avec atteintes cognitives.

#### *-VI-1.1 Physiopathologie*

Plusieurs changements se produisent dans le cerveau des personnes atteintes par la maladie d'Alzheimer. Les perturbations de la mémoire et de l'apprentissage, caractéristiques de la MA, sont liées à un dysfonctionnement et une mort neuronale dans différentes régions cérébrales, comme l'hippocampe et le cortex préfrontal (Mattson 2004).

En plus des problèmes cognitifs (observés du vivant des patients), la confirmation du diagnostic de la MA se fait par des examens post mortem des cerveaux. On peut observer des plaques séniles et la dégénérescence neurofibrillaire (DNF), l'atrophie du cortex cérébral avec une dilatation des ventricules, associées à des pertes neuronales et synaptiques notables.

- Les plaques séniles : Les cellules du cerveau rétrécissent ou disparaissent et sont remplacées par des taches denses de forme irrégulière qu'on appelle des plaques séniles. Celles-ci sont constituées par la substance amyloïde. Le constituant moléculaire principal des plaques séniles est un polypeptide de 39 à 43 acides aminés : le peptide A $\beta$  non soluble. Celui-ci est obtenu après clivage par une  $\beta$ - et une  $\gamma$ -sécrétases de son précurseur, la protéine précurseur de l'amyloïde (APP), protéine beaucoup plus longue comportant 698 à 777 acides aminés. Certains dépôts sont constitués uniquement de peptide A $\beta$  tandis que d'autres sont entourés par des neurites en dégénérescence neurofibrillaire. Il s'agit des plaques neuritiques ou plaques séniles.

- La dégénérescence neurofibrillaire : les neurodégénérescences neurofibrillaires (DNF) sont formées par l'accumulation de neurofilaments anormaux, les PHF (paires de filaments appariés en hélice) dans le corps cellulaire et les extensions neuritiques des neurones en dégénérescence. Les PHF sont constituées de protéines Tau pathologiques, anormalement phosphorylées.

- Les pertes neuronale et synaptique : dans la maladie d'Alzheimer, la perte neuronale ne s'élève pas à plus de 20% sur l'ensemble des régions corticales. Mais cette perte est concentrée dans les aires corticales associatives (jusqu'à 50%) et dans les noyaux sous-

corticaux (jusqu'à 60%). Pourtant, elle semble intervenir de manière tardive dans la détérioration intellectuelle. Il existe une faible corrélation entre l'état intellectuel et la densité synaptique mesurée par la synaptophysine (Francis 2003, Kashani et al. 2008).

- Les lésions vasculaires : le risque de démence semble augmenté par la présence d'infarctus cérébral. La maladie d'Alzheimer est plus fréquente chez les patients présentant de petits infarctus dits lacunaires, en particulier dans trois régions du cerveau : le noyau caudé, le thalamus et la substance blanche profonde.

L'atrophie cérébrale qui résulte de la dégénérescence s'accompagne de la diminution de certains neuromédiateurs. En particulier, à des stades sévères de la MA, le déficit en acétylcholine peut atteindre 70% dans les noyaux basaux de Meynert (Arendt et al. 1983). La mise en évidence du rôle de l'acétylcholine a d'ailleurs ouvert la voie vers les premiers traitements spécifiques. Les déficits cognitifs des patients atteints par la MA semblent corrélés à une dégénérescence des neurones cholinergiques au niveau du striatum ventral, interface entre les systèmes limbique et moteur (Lehericy et al. 1989). De même, les neurones qui utilisent le glutamate, la sérotonine et la norépinéphrine apparaissent particulièrement affectés (Mattson 2004).

#### *-VI-1.2 Le système glutamatergique et la maladie d'Alzheimer*

Les DNF et les plaques séniles sont observées dans différentes régions du néocortex et à tous les stades de la MA. Le cortex associatif (lobes temporal, pariétal et frontal) est particulièrement atteint, surtout dans les couches corticales III et V pour la dégénérescence neurofibrillaire et les couches II et III pour les plaques séniles de la région A9 de Brodmann (Bussiere et al. 2003, Pearson et al. 1985). Les cellules pyramidales localisées dans les couches III et V du néocortex utilisent le glutamate comme neurotransmetteur et sont particulièrement vulnérables à la MA (Francis 2003). L'atrophie corticale est due à la destruction des neurones pyramidaux du néocortex. Des travaux récents ont rapporté que la recapture vésiculaire de glutamate était diminuée dans le cortex de sujets atteints par la MA (Westphalen et al. 2003). Certaines données de la littérature plaident en faveur d'un rôle de l'excitotoxicité dans la maladie d'Alzheimer (Doble 1999). Cette hypothèse est, en partie, soutenue par la démonstration des effets bénéfiques d'un antagoniste des récepteurs NMDA, la mémantine (Herrmann & Gauthier 2008, Shah et al. 2008). Dans les neurones corticaux et hippocampiques, le glutamate régule la production de BDNF (Brain Derived NeuroFactor) et

le BDNF stimule la transmission glutamatergique (Mattson 2008). Des travaux récents ont rapporté une réduction des taux de BDNF dans les cerveaux post mortem de patients atteints par la MA et suggéré un rôle protecteur du BDNF contre la toxicité des peptides  $\beta$  amyloïdes (pour revue voir (Mattson 2008)).

Il est donc important de définir le taux des transporteurs vésiculaires du glutamate, marqueurs spécifiques du système glutamatergique, dans différentes régions cérébrales de patients atteints de la maladie d'Alzheimer.

## **-VI-2 L'autisme**

Dans un second temps, mon travail de diplôme a porté sur l'autisme.

L'autisme est un désordre neuro-développemental caractérisé par des troubles de la communication et des interactions sociales, ainsi que par des comportements répétitifs et des intérêts restreints. C'est une pathologie qui touche un enfant sur 1000 pour l'autisme typique dit « autisme de Kanner ». Mais si l'on prend la définition plus large de l'autisme, un enfant sur 166 est atteint de troubles du spectre autistique. Le syndrome autistique est 4 fois plus fréquent chez les garçons que chez les filles. Il se manifeste avant l'âge de 3 ans et fait partie des troubles envahissants du développement (TED). Les TED comprennent l'autisme, le syndrome d'Asperger et les troubles envahissants du développement non spécifiés (dits aussi "autisme atypique"). Ces pathologies présentent différents degrés de sévérité.

Les premiers cas d'autistes ont été décrits par Léo Kanner en 1943. Vers les années 1970-1980, l'autisme était considéré par les médecins comme une maladie d'origine environnementale due à des parents peu communicatifs. Depuis, l'origine neurobiologique de l'autisme résultant des facteurs génétiques complexes a été confirmée (Jamain *et al.* 2003a).

### *-VI-2.1 Diagnostic de l'autisme*

L'autisme peut être diagnostiqué dès l'âge de deux ans principalement grâce aux observations des parents. Aujourd'hui, les critères de diagnostic de l'autisme sont basés sur la Quatrième révision du manuel diagnostique et statistique des désordres mentaux (DSM IV). Les trois critères (altération qualitative des interactions sociales ; altération qualitative de la communication ; caractère restreint, répétitif et stéréotypé des comportements, des intérêts et des activités) doivent être présents pour définir un diagnostic d'autisme.

En plus des anomalies neuro-développementales, on observe une augmentation de la taille de la tête (macrocéphalie) chez 20 % des sujets. Par ailleurs, des études d'imagerie ont permis de mettre en évidence des anomalies au niveau du lobe frontal, du cervelet et des structures limbiques chez certains sujets atteints d'autisme.

#### -VI-2.2 Multicausalité de l'autisme

L'autisme présente un ensemble de signes cliniques dont la sévérité varie en fonction des patients. De plus, les causes de l'autisme sont très complexes, impliquant majoritairement des facteurs génétiques et environnementaux. (Geschwind 2008).

De nombreux arguments sont en faveur d'une origine génétique. Tout d'abord, le taux de concordance de l'autisme est plus important chez les jumeaux monozygotes (60-92%) que chez les jumeaux hétérozygotes (5-40%). Pour les familles ayant déjà un enfant atteint d'autisme, il y a 5-8% de probabilité qu'un deuxième enfant soit également atteint, comparé à 0,6% dans la population générale.

Différentes études ont montré que la transmission génétique ne suit pas un seul motif. En effet, l'autisme présente une très grande hétérogénéité génétique. Différentes pathologies génétiques peuvent être associées à l'autisme comme : le syndrome de Rett, la sclérose tubéreuse, le syndrome de l'X fragile et le syndrome de Joubert. Par ailleurs, des anomalies chromosomiques, comme des délétions et des duplications de certaines régions chromosomiques sont retrouvées chez au moins 10% des patients (Geschwind 2008). Plusieurs mutations de protéines synaptiques (les neuroligines (NLG3, NLG4), SHANK3 et la neurexine (NRXN1) ont été identifiées chez des patients atteints du syndrome autistique (Arking *et al.* 2008, Durand *et al.* 2007, Durand *et al.* 2008, Jamain *et al.* 2003b). Ces études suggèrent fortement l'altération de la formation et la maturation des synapses dans la pathologie de l'autisme (Betancur *et al.* 2009).

En effet, les neuroligines (par exemple) sont des protéines d'adhésion qui servent à stabiliser l'interaction entre une terminaison nerveuse et une épine dendritique. La NLG1 et NLG2 sont reliées respectivement au système glutamatergique et au système GABAergique (Varoquaux *et al.* 2004). De plus, Varoquaux et collaborateurs ont montré que des mutants de triples délétions NLG1-, NLG2-, NLG3-KO mourraient à la naissance de déficit respiratoire dû à une réduction de la transmission glutamatergique et GABAergique

(Varoqueaux *et al.* 2006). Ces observations suggèrent donc qu'il pourrait exister chez certains autistes un déséquilibre de la transmission glutamatergique et GABAergique.

Durant le développement du cerveau, le glutamate, en régulant la synaptogenèse, est impliqué dans la formation de la cytoarchitecture (Sahai 1990). Or, il a été proposé que l'autisme serait une pathologie hypoglutamatergique d'après des études neuroanatomiques, pharmacologiques, de neuroimagerie et d'expérimentation animale (Carlsson 1998). Des antagonistes du glutamate chez des sujets sains induisent des symptômes similaires à ceux observés chez des patients atteints d'autisme. De même, des modèles expérimentaux d'hypoglutamatergie montrent également des symptômes similaires à ceux de l'autisme, tels qu'un défaut d'habituation, un répertoire restreint de comportement et une incapacité à changer de comportements (Carlsson 1998). De plus, des anomalies du système glutamatergique ont été observées chez des patients atteints d'autisme. Des taux plasmatiques élevés de glutamate, d'aspartate et de taurine ont été mesurés par chromatographie liquide à haute pression chez 14 enfants autistes (Moreno-Fuenmayor *et al.* 1996). L'origine de ces modifications des taux plasmatiques des acides aminés chez des patients autistes reste pour l'instant inconnue. Certains auteurs ont proposé d'utiliser les taux de glutamate, aspartate et du GABA plaquettaires comme des biomarqueurs de l'autisme infantile. (Rolf *et al.* 1993). Les récepteurs du glutamate de type AMPA et les transporteurs du glutamate (EAAT1, GLAST-1) augmentent au niveau du caudé-putamen et du cortex préfrontal chez des patients autistes (Purcell *et al.* 2001). Par contre, la densité des récepteurs AMPA est diminuée au niveau du cervelet des patients (Purcell *et al.* 2001).

L'ensemble de ces résultats suggère que l'autisme serait une maladie hypoglutamatergique. Par conséquent, l'objectif d'une partie de mon travail a été d'évaluer des marqueurs spécifiques du système glutamatergique, les transporteurs vésiculaires du glutamate (VGLUT1 et VGLUT2) au niveau des terminaisons glutamatergiques à partir de cerveaux post mortem de patients atteints d'autisme par rapport à des témoins du même âge.

*Pour étudier le système glutamatergique normal et pathologique, j'ai travaillé d'une part sur un modèle animal et de l'autre sur des échantillons de cerveaux humains post mortem. Ces différents modèles ont été abordés par des méthodes d'anatomie quantitative et qualitative que je décrirai brièvement dans le chapitre suivant.*

## BIBLIOGRAPHIE

---

---

- Aihara, Y., Mashima, H., Onda, H. et al. (2000) Molecular cloning of a novel brain-type Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter. *J Neurochem*, **74**, 2622-2625.
- Almqvist, J., Huang, Y., Laaksonen, A., Wang, D. N. and Hovmoller, S. (2007) Docking and homology modeling explain inhibition of the human vesicular glutamate transporters. *Protein Sci*, **16**, 1819-1829.
- Amilhon, B., Lopicard, E., Renoir, T. et al. (soumis) VGLUT3 contribution to the regulation of serotonergic transmission and anxiety.
- Arendt, T., Bigl, V., Arendt, A. and Tennstedt, A. (1983) Loss of neurons in the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer's disease, paralysis agitans and Korsakoff's Disease. *Acta Neuropathol*, **61**, 101-108.
- Arking, D. E., Cutler, D. J., Brune, C. W. et al. (2008) A common genetic variant in the neurexin superfamily member CNTNAP2 increases familial risk of autism. *Am J Hum Genet*, **82**, 160-164.
- Arriza, J. L., Fairman, W. A., Wadiche, J. I., Murdoch, G. H., Kavanaugh, M. P. and Amara, S. G. (1994) Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. *J Neurosci*, **14**, 5559-5569.
- Ascoli, G. A., Alonso-Nanclares, L., Anderson, S. A. et al. (2008) Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci*, **9**, 557-568.
- Baranano, D. E., Ferris, C. D. and Snyder, S. H. (2001) Atypical neural messengers. *Trends Neurosci*, **24**, 99-106.
- Bell, K. F. and Claudio Cuello, A. (2006) Altered synaptic function in Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol*, **545**, 11-21.
- Bellocchio, E. E., Hu, H., Pohorille, A., Chan, J., Pickel, V. M. and Edwards, R. H. (1998) The localization of the brain-specific inorganic phosphate transporter suggests a specific presynaptic role in glutamatergic transmission. *J Neurosci*, **18**, 8648-8659.
- Bellocchio, E. E., Reimer, R. J., Freneau, R. T., Jr. and Edwards, R. H. (2000) Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science*, **289**, 957-960.
- Ben-Ari, Y. (2002) Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci*, **3**, 728-739.
- Bergink, V., van Megen, H. J. and Westenberg, H. G. (2004) Glutamate and anxiety. *Eur Neuropsychopharmacol*, **14**, 175-183.
- Betancur, C., Sakurai, T. and Buxbaum, J. D. (2009) The emerging role of synaptic cell-adhesion pathways in the pathogenesis of autism spectrum disorders. *Trends Neurosci*.
- Beyenbach, K. W. and Wieczorek, H. (2006) The V-type H<sup>+</sup> ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *J Exp Biol*, **209**, 577-589.
- Blitzer, R. D., Iyengar, R. and Landau, E. M. (2005) Postsynaptic signaling networks: cellular cogwheels underlying long-term plasticity. *Biol Psychiatry*, **57**, 113-119.
- Boehning, D. and Snyder, S. H. (2003) Novel neural modulators. *Annu Rev Neurosci*, **26**, 105-131.

- Bussiere, T., Gold, G., Kovari, E., Giannakopoulos, P., Bouras, C., Perl, D. P., Morrison, J. H. and Hof, P. R. (2003) Stereologic analysis of neurofibrillary tangle formation in prefrontal cortex area 9 in aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience*, **117**, 577-592.
- Camacho, A. and Massieu, L. (2006) Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death. *Arch Med Res*, **37**, 11-18.
- Carlson, M. D., Kish, P. E. and Ueda, T. (1989) Glutamate uptake into synaptic vesicles: competitive inhibition by bromocriptine. *J Neurochem*, **53**, 1889-1894.
- Carlsson, M. L. (1998) Hypothesis: is infantile autism a hypoglutamatergic disorder? Relevance of glutamate - serotonin interactions for pharmacotherapy. *J Neural Transm*, **105**, 525-535.
- Casado, M., Isope, P. and Ascher, P. (2002) Involvement of presynaptic N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar long-term depression. *Neuron*, **33**, 123-130.
- Chapman, A. G. (2000) Glutamate and epilepsy. *J Nutr*, **130**, 1043S-1045S.
- Chaudhuri, K. R. and Schapira, A. H. (2009) Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *Lancet Neurol*, **8**, 464-474.
- Conn, P. J. and Pin, J. P. (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **37**, 205-237.
- Cryan, J. F. and Holmes, A. (2005) The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov*, **4**, 775-790.
- Curtis, D. R., Phillis, J. W. and Watkins, J. C. (1959) Chemical excitation of spinal neurones. *Nature*, **183**, 611-612.
- Daikhin, Y. and Yudkoff, M. (2000) Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. *J Nutr*, **130**, 1026S-1031S.
- Danbolt, N. C. (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol*, **65**, 1-105.
- Daoudal, G. and Debanne, D. (2003) Long-term plasticity of intrinsic excitability: learning rules and mechanisms. *Learn Mem*, **10**, 456-465.
- De Gois, S., Schafer, M. K., Defamie, N., Chen, C., Ricci, A., Weihe, E., Varoqui, H. and Erickson, J. D. (2005) Homeostatic scaling of vesicular glutamate and GABA transporter expression in rat neocortical circuits. *J Neurosci*, **25**, 7121-7133.
- Desban, M., Kemel, M. L., Glowinski, J. and Gauchy, C. (1993) Spatial organization of patch and matrix compartments in the rat striatum. *Neuroscience*, **57**, 661-671.
- Doble, A. (1999) The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacol Ther*, **81**, 163-221.
- Duncan, G., Miyamoto, S., Gu, H., Lieberman, J., Koller, B. and Snouwaert, J. (2002) Alterations in regional brain metabolism in genetic and pharmacological models of reduced NMDA receptor function. *Brain Res*, **951**, 166-176.
- Durand, C. M., Betancur, C., Boeckers, T. M. et al. (2007) Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat Genet*, **39**, 25-27.
- Durand, C. M., Chaste, P., Fauchereau, F., Betancur, C., Leboyer, M. and Bourgeron, T. (2008) [Alterations in synapsis formation and function in autism disorders]. *Med Sci (Paris)*, **24**, 25-28.
- Eiden, L. E. (2000) The vesicular neurotransmitter transporters: current perspectives and future prospects. *FASEB J*, **14**, 2396-2400.
- Estrada Sanchez, A. M., Mejia-Toiber, J. and Massieu, L. (2008) Excitotoxic neuronal death and the pathogenesis of Huntington's disease. *Arch Med Res*, **39**, 265-276.
- Fairman, W. A., Vandenberg, R. J., Arriza, J. L., Kavanaugh, M. P. and Amara, S. G. (1995) An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature*, **375**, 599-603.

- Ferguson, S. M. and Blakely, R. D. (2004) The choline transporter resurfaces: new roles for synaptic vesicles? *Mol Interv*, **4**, 22-37.
- Fernagut, P. O., Chalon, S., Diguët, E., Guilloteau, D., Tison, F. and Jaber, M. (2003) Motor behaviour deficits and their histopathological and functional correlates in the nigrostriatal system of dopamine transporter knockout mice. *Neuroscience*, **116**, 1123-1130.
- Fonnum, F. (1984) Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem*, **42**, 1-11.
- Francis, P. T. (2003) Glutamatergic systems in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry*, **18**, S15-21.
- Freneau, R. T., Jr., Burman, J., Qureshi, T. et al. (2002) The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 14488-14493.
- Freneau, R. T., Jr., Troyer, M. D., Pahner, I. et al. (2001) The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron*, **31**, 247-260.
- Freneau, R. T., Jr., Voglmaier, S., Seal, R. P. and Edwards, R. H. (2004) VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. *Trends Neurosci*, **27**, 98-103.
- Froger, N., Gardier, A. M., Moratalla, R. et al. (2001) 5-hydroxytryptamine (5-HT)<sub>1A</sub> autoreceptor adaptive changes in substance P (neurokinin 1) receptor knock-out mice mimic antidepressant-induced desensitization. *J Neurosci*, **21**, 8188-8197.
- Fujiyama, F., Furuta, T. and Kaneko, T. (2001) Immunocytochemical localization of candidates for vesicular glutamate transporters in the rat cerebral cortex. *J Comp Neurol*, **435**, 379-387.
- Fykse, E. M. and Fonnum, F. (1991) Transport of gamma-aminobutyrate and L-glutamate into synaptic vesicles. Effect of different inhibitors on the vesicular uptake of neurotransmitters and on the Mg<sup>2+</sup>-ATPase. *Biochem J*, **276** ( Pt 2), 363-367.
- Gasnier, B. (2000) The loading of neurotransmitters into synaptic vesicles. *Biochimie*, **82**, 327-337.
- Geschwind, D. H. (2008) Autism: many genes, common pathways? *Cell*, **135**, 391-395.
- Gras, C., Amilhon, B., Lepicard, E. M. et al. (2008) The vesicular glutamate transporter VGLUT3 synergizes striatal acetylcholine tone. *Nat Neurosci*, **11**, 292-300.
- Gras, C., Herzog, E., Bellenchi, G. C., Bernard, V., Ravassard, P., Pohl, M., Gasnier, B., Giros, B. and El Mestikawy, S. (2002) A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J Neurosci*, **22**, 5442-5451.
- Hartinger, J. and Jahn, R. (1993) An anion binding site that regulates the glutamate transporter of synaptic vesicles. *J Biol Chem*, **268**, 23122-23127.
- Hell, J. W., Maycox, P. R. and Jahn, R. (1990) Energy dependence and functional reconstitution of the gamma-aminobutyric acid carrier from synaptic vesicles. *J Biol Chem*, **265**, 2111-2117.
- Hensler, J. G. (2006) Serotonergic modulation of the limbic system. *Neurosci Biobehav Rev*, **30**, 203-214.
- Herrmann, N. and Gauthier, S. (2008) Diagnosis and treatment of dementia: 6. Management of severe Alzheimer disease. *Cmaj*, **179**, 1279-1287.
- Herzog, E., Bellenchi, G. C., Gras, C., Bernard, V., Ravassard, P., Bedet, C., Gasnier, B., Giros, B. and El Mestikawy, S. (2001) The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J Neurosci*, **21**, RC181.
- Herzog, E., Gilchrist, J., Gras, C., Muzerelle, A., Ravassard, P., Giros, B., Gaspar, P. and El Mestikawy, S. (2004a) Localization of VGLUT3, the vesicular glutamate transporter type 3, in the rat brain. *Neuroscience*, **123**, 983-1002.

- Herzog, E., Landry, M., Buhler, E. et al. (2004b) Expression of vesicular glutamate transporters, VGLUT1 and VGLUT2, in cholinergic spinal motoneurons. *Eur J Neurosci*, **20**, 1752-1760.
- Herzog, E., Takamori, S., Jahn, R., Brose, N. and Wojcik, S. M. (2006) Synaptic and vesicular co-localization of the glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in the mouse hippocampus. *J Neurochem*, **99**, 1011-1018.
- Hioki, H., Fujiyama, F., Nakamura, K., Wu, S. X., Matsuda, W. and Kaneko, T. (2004) Chemically specific circuit composed of vesicular glutamate transporter 3- and preprotachykinin B-producing interneurons in the rat neocortex. *Cereb Cortex*, **14**, 1266-1275.
- Huettnner, J. E. (2003) Kainate receptors and synaptic transmission. *Prog Neurobiol*, **70**, 387-407.
- Hughes, C. P., Berg, L., Danziger, W. L., Coben, L. A. and Martin, R. L. (1982) A new clinical scale for the staging of dementia. *Br J Psychiatry*, **140**, 566-572.
- Ikemoto, A., Bole, D. G. and Ueda, T. (2003) Glycolysis and glutamate accumulation into synaptic vesicles. Role of glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and 3-phosphoglycerate kinase. *J Biol Chem*, **278**, 5929-5940.
- Jackson, J., Bland, B. H. and Antle, M. C. (2009) Nonserotonergic projection neurons in the midbrain raphe nuclei contain the vesicular glutamate transporter VGLUT3. *Synapse*, **63**, 31-41.
- Jamain, S., Betancur, C., Giros, B., Leboyer, M. and Bourgeron, T. (2003a) [Genetics of autism: from genome scans to candidate genes]. *Med Sci (Paris)*, **19**, 1081-1090.
- Jamain, S., Quach, H., Betancur, C. et al. (2003b) Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat Genet*, **34**, 27-29.
- Johnson, M. D. (1994) Synaptic glutamate release by postnatal rat serotonergic neurons in microculture. *Neuron*, **12**, 433-442.
- Juge, N., Yoshida, Y., Yatsushiro, S., Omote, H. and Moriyama, Y. (2006) Vesicular glutamate transporter contains two independent transport machineries. *J Biol Chem*, **281**, 39499-39506.
- Kanai, Y. and Hediger, M. A. (1992) Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature*, **360**, 467-471.
- Kaneko, T., Akiyama, H., Nagatsu, I. and Mizuno, N. (1990) Immunohistochemical demonstration of glutaminase in catecholaminergic and serotonergic neurons of rat brain. *Brain Res*, **507**, 151-154.
- Kaneko, T. and Fujiyama, F. (2002) Complementary distribution of vesicular glutamate transporters in the central nervous system. *Neurosci Res*, **42**, 243-250.
- Kashani, A., Betancur, C., Giros, B., Hirsch, E. and El Mestikawy, S. (2007) Altered expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in Parkinson disease. *Neurobiol Aging*, **28**, 568-578.
- Kashani, A., Lopicard, E., Poirel, O. et al. (2008) Loss of VGLUT1 and VGLUT2 in the prefrontal cortex is correlated with cognitive decline in Alzheimer disease. *Neurobiol Aging*, **29**, 1619-1630.
- Kawaguchi, Y., Wilson, C. J., Augood, S. J. and Emson, P. C. (1995) Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci*, **18**, 527-535.
- Kirvell, S. L., Esiri, M. and Francis, P. T. (2006) Down-regulation of vesicular glutamate transporters precedes cell loss and pathology in Alzheimer's disease. *J Neurochem*, **98**, 939-950.

- Lehericy, S., Hirsch, E. C., Cervera, P., Hersh, L. B., Hauw, J. J., Ruberg, M. and Agid, Y. (1989) Selective loss of cholinergic neurons in the ventral striatum of patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 8580-8584.
- Martres, M. P., Bouthenet, M. L., Sales, N., Sokoloff, P. and Schwartz, J. C. (1985) Widespread distribution of brain dopamine receptors evidenced with [125I]iodosulpride, a highly selective ligand. *Science*, **228**, 752-755.
- Masson, J., Sagne, C., Hamon, M. and El Mestikawy, S. (1999) Neurotransmitter transporters in the central nervous system. *Pharmacol Rev*, **51**, 439-464.
- Mattson, M. P. (2004) Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*, **430**, 631-639.
- Mattson, M. P. (2008) Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Ann N Y Acad Sci*, **1144**, 97-112.
- Maycox, P. R., Deckwerth, T., Hell, J. W. and Jahn, R. (1988) Glutamate uptake by brain synaptic vesicles. Energy dependence of transport and functional reconstitution in proteoliposomes. *J Biol Chem*, **263**, 15423-15428.
- Maycox, P. R., Deckwerth, T. and Jahn, R. (1990) Bacteriorhodopsin drives the glutamate transporter of synaptic vesicles after co-reconstitution. *EMBO J*, **9**, 1465-1469.
- Maycox, P. R. and Jahn, R. (1990) Reconstitution of neurotransmitter carriers from synaptic vesicles. *Biochem Soc Trans*, **18**, 381-384.
- Medina-Kauwe, L. K., Tillakaratne, N. J., Wu, J. Y. and Tobin, A. J. (1994) A rat brain cDNA encodes enzymatically active GABA transaminase and provides a molecular probe for GABA-catabolizing cells. *J Neurochem*, **62**, 1267-1275.
- Meldrum, B. S. (2000) Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr*, **130**, 1007S-1015S.
- Merighi, A. (2002) Costorage and coexistence of neuropeptides in the mammalian CNS. *Prog Neurobiol*, **66**, 161-190.
- Meunier, J.-M. and A.Shvaloff (1992) Neurotransmetteurs - Bases neurobiologiques et pharmacologiques. In: *Masson*, pp. 161.
- Michelsen, K. A., Schmitz, C. and Steinbusch, H. W. (2007) The dorsal raphe nucleus--from silver stainings to a role in depression. *Brain Res Rev*, **55**, 329-342.
- Miyaji, T., Echigo, N., Hiasa, M., Senoh, S., Omote, H. and Moriyama, Y. (2008) Identification of a vesicular aspartate transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 11720-11724.
- Molliver, M. E. (1987) Serotonergic neuronal systems: what their anatomic organization tells us about function. *J Clin Psychopharmacol*, **7**, 3S-23S.
- Moreno-Fuenmayor, H., Borjas, L., Arrieta, A., Valera, V. and Socorro-Candanoza, L. (1996) Plasma excitatory amino acids in autism. *Invest Clin*, **37**, 113-128.
- Naito, S. and Ueda, T. (1983) Adenosine triphosphate-dependent uptake of glutamate into protein I-associated synaptic vesicles. *J Biol Chem*, **258**, 696-699.
- Naito, S. and Ueda, T. (1985) Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles. *J Neurochem*, **44**, 99-109.
- Nakano, K. (2000) Neural circuits and topographic organization of the basal ganglia and related regions. *Brain Dev*, **22 Suppl 1**, S5-16.
- Ni, B., Rosteck, P. R., Jr., Nadi, N. S. and Paul, S. M. (1994) Cloning and expression of a cDNA encoding a brain-specific Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 5607-5611.
- Ni, B., Wu, X., Yan, G. M., Wang, J. and Paul, S. M. (1995) Regional expression and cellular localization of the Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter of rat brain. *J Neurosci*, **15**, 5789-5799.

- Nickerson Poulin, A., Guerci, A., El Mestikawy, S. and Semba, K. (2006) Vesicular glutamate transporter 3 immunoreactivity is present in cholinergic basal forebrain neurons projecting to the basolateral amygdala in rat. *J Comp Neurol*, **498**, 690-711.
- Ogita, K., Hirata, K., Bole, D. G., Yoshida, S., Tamura, Y., Leckenby, A. M. and Ueda, T. (2001) Inhibition of vesicular glutamate storage and exocytotic release by Rose Bengal. *J Neurochem*, **77**, 34-42.
- Ottersen, O. P., Chaudhry, F. A., Danbolt, N. C., Laake, J. H., Nagelhus, E. A., Storm-Mathisen, J. and Torp, R. (1997) Molecular organization of cerebellar glutamate synapses. *Prog Brain Res*, **114**, 97-107.
- Ozawa, S., Kamiya, H. and Tsuzuki, K. (1998) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol*, **54**, 581-618.
- Ozkan, E. D., Lee, F. S. and Ueda, T. (1997) A protein factor that inhibits ATP-dependent glutamate and gamma-aminobutyric acid accumulation into synaptic vesicles: purification and initial characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 4137-4142.
- Ozkan, E. D. and Ueda, T. (1998) Glutamate transport and storage in synaptic vesicles. *Jpn J Pharmacol*, **77**, 1-10.
- Parsons, S. M. (2000) Transport mechanisms in acetylcholine and monoamine storage. *FASEB J*, **14**, 2423-2434.
- Payne, H. L., Donoghue, P. S., Connelly, W. M. et al. (2006) Aberrant GABA(A) receptor expression in the dentate gyrus of the epileptic mutant mouse stargazer. *J Neurosci*, **26**, 8600-8608.
- Pearson, R. C., Esiri, M. M., Hiorns, R. W., Wilcock, G. K. and Powell, T. P. (1985) Anatomical correlates of the distribution of the pathological changes in the neocortex in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 4531-4534.
- Perry, D. C. and Kellar, K. J. (1995) [<sup>3</sup>H]epibatidine labels nicotinic receptors in rat brain: an autoradiographic study. *J Pharmacol Exp Ther*, **275**, 1030-1034.
- Perry, E., Walker, M., Grace, J. and Perry, R. (1999) Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness? *Trends Neurosci*, **22**, 273-280.
- Pines, G., Danbolt, N. C., Bjoras, M. et al. (1992) Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature*, **360**, 464-467.
- Pinheiro, P. S. and Mulle, C. (2008) Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanisms of action. *Nat Rev Neurosci*, **9**, 423-436.
- Purcell, A. E., Jeon, O. H., Zimmerman, A. W., Blue, M. E. and Pevsner, J. (2001) Postmortem brain abnormalities of the glutamate neurotransmitter system in autism. *Neurology*, **57**, 1618-1628.
- Purves, D., Williams, S. M., Nundy, S. and Lotto, R. B. (2004) Perceiving the intensity of light. *Psychol Rev*, **111**, 142-158.
- Que, M., Witte, O. W., Neumann-Haefelin, T., Schiene, K., Schroeter, M. and Zilles, K. (1999) Changes in GABA(A) and GABA(B) receptor binding following cortical photothrombosis: a quantitative receptor autoradiographic study. *Neuroscience*, **93**, 1233-1240.
- Reimer, R. J., Fremeau, R. T., Jr., Bellocchio, E. E. and Edwards, R. H. (2001) The essence of excitation. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 417-421.
- Rodriguez-Moreno, A. and Sihra, T. S. (2007) Metabotropic actions of kainate receptors in the CNS. *J Neurochem*, **103**, 2121-2135.
- Rolf, L. H., Haarmann, F. Y., Grottemeyer, K. H. and Kehrer, H. (1993) Serotonin and amino acid content in platelets of autistic children. *Acta Psychiatr Scand*, **87**, 312-316.
- Roseth, S., Fykse, E. M. and Fonnum, F. (1995) Uptake of L-glutamate into rat brain synaptic vesicles: effect of inhibitors that bind specifically to the glutamate transporter. *J Neurochem*, **65**, 96-103.

- Roseth, S., Fykse, E. M. and Fonnum, F. (1998) Uptake of L-glutamate into synaptic vesicles: competitive inhibition by dyes with biphenyl and amino- and sulphonic acid-substituted naphthyl groups. *Biochem Pharmacol*, **56**, 1243-1249.
- Rupprecht, R., di Michele, F., Hermann, B., Strohle, A., Lancel, M., Romeo, E. and Holsboer, F. (2001) Neuroactive steroids: molecular mechanisms of action and implications for neuropsychopharmacology. *Brain Res Brain Res Rev*, **37**, 59-67.
- Sagne, C., El Mestikawy, S., Isambert, M. F., Hamon, M., Henry, J. P., Giros, B. and Gasnier, B. (1997) Cloning of a functional vesicular GABA and glycine transporter by screening of genome databases. *FEBS Lett*, **417**, 177-183.
- Sahai, S. (1990) Glutamate in the mammalian CNS. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, **240**, 121-133.
- Sakurai, S. Y., Lutz, P. L., Schulman, A. and Albin, R. L. (1993) Unchanged [3H]MK-801 binding and increased [3H]flunitrazepam binding in turtle forebrain during anoxia. *Brain Res*, **625**, 181-185.
- Salio, C., Lossi, L., Ferrini, F. and Merighi, A. (2006) Neuropeptides as synaptic transmitters. *Cell Tissue Res*, **326**, 583-598.
- Sarter, M. and Parikh, V. (2005) Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. *Nat Rev Neurosci*, **6**, 48-56.
- Sawada, K., Echigo, N., Juge, N., Miyaji, T., Otsuka, M., Omote, H., Yamamoto, A. and Moriyama, Y. (2008) Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 5683-5686.
- Schafer, M. K., Varoqui, H., Defamie, N., Weihe, E. and Erickson, J. D. (2002) Molecular cloning and functional identification of mouse vesicular glutamate transporter 3 and its expression in subsets of novel excitatory neurons. *J Biol Chem*, **277**, 50734-50748.
- Schmid, S. M. and Hollmann, M. (2008) To gate or not to gate: are the delta subunits in the glutamate receptor family functional ion channels? *Mol Neurobiol*, **37**, 126-141.
- Schwartz, J., H (2000) Neurotransmitters. Principles of Neural Science. *E,R.Kandel, J.H.Schwartz and T.M.Jessel, eds.(New York: McGraw-Hill*, 280-297.
- Seal, R. P., Akil, O., Yi, E. et al. (2008) Sensorineural deafness and seizures in mice lacking vesicular glutamate transporter 3. *Neuron*, **57**, 263-275.
- Shah, R. S., Lee, H. G., Xiongwei, Z., Perry, G., Smith, M. A. and Castellani, R. J. (2008) Current approaches in the treatment of Alzheimer's disease. *Biomed Pharmacother*, **62**, 199-207.
- Somogyi, J., Baude, A., Omori, Y., Shimizu, H., El Mestikawy, S., Fukaya, M., Shigemoto, R., Watanabe, M. and Somogyi, P. (2004) GABAergic basket cells expressing cholecystinin contain vesicular glutamate transporter type 3 (VGLUT3) in their synaptic terminals in hippocampus and isocortex of the rat. *Eur J Neurosci*, **19**, 552-569.
- Spurden, D. P., Court, J. A., Lloyd, S., Oakley, A., Perry, R., Pearson, C., Pullen, R. G. and Perry, E. K. (1997) Nicotinic receptor distribution in the human thalamus: autoradiographical localization of [3H]nicotine and [125I] alpha-bungarotoxin binding. *J Chem Neuroanat*, **13**, 105-113.
- Stanwood, G. D., Artymyshyn, R. P., Kung, M. P., Kung, H. F., Lucki, I. and McGonigle, P. (2000) Quantitative autoradiographic mapping of rat brain dopamine D3 binding with [(125I)7-OH-PIPAT: evidence for the presence of D3 receptors on dopaminergic and nondopaminergic cell bodies and terminals. *J Pharmacol Exp Ther*, **295**, 1223-1231.
- Storck, T., Schulte, S., Hofmann, K. and Stoffel, W. (1992) Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 10955-10959.

- Storm-Mathisen, J. and Iversen, L. L. (1979) Uptake of [3H]Glutamic acid in excitatory nerve endings: light and electronmicroscopic observations in the hippocampal formation of the rat. *Neuroscience*, **4**, 1237-1253.
- Storm-Mathisen, J., Leknes, A. K., Bore, A. T., Vaaland, J. L., Edminson, P., Haug, F. M. and Ottersen, O. P. (1983) First visualization of glutamate and GABA in neurones by immunocytochemistry. *Nature*, **301**, 517-520.
- Storm-Mathisen, J. and Ottersen, O. P. (1990) Immunocytochemistry of glutamate at the synaptic level. *J Histochem Cytochem*, **38**, 1733-1743.
- Tabb, J. S., Kish, P. E., Van Dyke, R. and Ueda, T. (1992) Glutamate transport into synaptic vesicles. Roles of membrane potential, pH gradient, and intravesicular pH. *J Biol Chem*, **267**, 15412-15418.
- Takahashi, M., Billups, B., Rossi, D., Sarantis, M., Hamann, M. and Attwell, D. (1997) The role of glutamate transporters in glutamate homeostasis in the brain. *J Exp Biol*, **200**, 401-409.
- Takamori, S., Malherbe, P., Broger, C. and Jahn, R. (2002) Molecular cloning and functional characterization of human vesicular glutamate transporter 3. *EMBO Rep*, **3**, 798-803.
- Takamori, S., Rhee, J. S., Rosenmund, C. and Jahn, R. (2000) Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature*, **407**, 189-194.
- Takamori, S., Rhee, J. S., Rosenmund, C. and Jahn, R. (2001) Identification of differentiation-associated brain-specific phosphate transporter as a second vesicular glutamate transporter (VGLUT2). *J Neurosci*, **21**, RC182.
- Tien, L. T., Fan, L. W., Sogawa, C., Ma, T., Loh, H. H. and Ho, I. K. (2004) Changes in acetylcholinesterase activity and muscarinic receptor bindings in mu-opioid receptor knockout mice. *Brain Res Mol Brain Res*, **126**, 38-44.
- Turner, M. R., Kiernan, M. C., Leigh, P. N. and Talbot, K. (2009) Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol*, **8**, 94-109.
- Varoqueaux, F., Aramuni, G., Rawson, R. L., Mohrmann, R., Missler, M., Gottmann, K., Zhang, W., Sudhof, T. C. and Brose, N. (2006) Neuroligins determine synapse maturation and function. *Neuron*, **51**, 741-754.
- Varoqueaux, F., Jamain, S. and Brose, N. (2004) Neuroligin 2 is exclusively localized to inhibitory synapses. *Eur J Cell Biol*, **83**, 449-456.
- Varoqui, H., Schafer, M. K., Zhu, H., Weihe, E. and Erickson, J. D. (2002) Identification of the differentiation-associated Na<sup>+</sup>/PI transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses. *J Neurosci*, **22**, 142-155.
- Voorn, P., Vanderschuren, L. J., Groenewegen, H. J., Robbins, T. W. and Pennartz, C. M. (2004) Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. *Trends Neurosci*, **27**, 468-474.
- Wallen-Mackenzie, A., Gezelius, H., Thoby-Brisson, M., Nygard, A., Enjin, A., Fujiyama, F., Fortin, G. and Kullander, K. (2006) Vesicular glutamate transporter 2 is required for central respiratory rhythm generation but not for locomotor central pattern generation. *J Neurosci*, **26**, 12294-12307.
- Wasselus, M., Galvez, J. P., Valentino, R. J. and Van Bockstaele, E. J. (2006) Differential projections of dorsal raphe nucleus neurons to the lateral septum and striatum. *J Chem Neuroanat*, **31**, 233-242.
- Watkins, J. C. (2000) l-glutamate as a central neurotransmitter: looking back. *Biochem Soc Trans*, **28**, 297-309.

- Westphalen, R. I., Scott, H. L. and Dodd, P. R. (2003) Synaptic vesicle transport and synaptic membrane transporter sites in excitatory amino acid nerve terminals in Alzheimer disease. *J Neural Transm*, **110**, 1013-1027.
- Wojcik, S. M., Rhee, J. S., Herzog, E., Sigler, A., Jahn, R., Takamori, S., Brose, N. and Rosenmund, C. (2004) An essential role for vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) in postnatal development and control of quantal size. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 7158-7163.
- Wolosker, H., de Souza, D. O. and de Meis, L. (1996) Regulation of glutamate transport into synaptic vesicles by chloride and proton gradient. *J Biol Chem*, **271**, 11726-11731.
- Zhou, F. M., Wilson, C. J. and Dani, J. A. (2002) Cholinergic interneuron characteristics and nicotinic properties in the striatum. *J Neurobiol*, **53**, 590-605.