



HAL
open science

Caractérisation d'une mutation humaine du transporteur vésiculaire du glutamate de type 3 (VGLUT3) : VGLUT3-p.A211V dans le système nerveux central de souris

Lauriane Ramet

► **To cite this version:**

Lauriane Ramet. Caractérisation d'une mutation humaine du transporteur vésiculaire du glutamate de type 3 (VGLUT3) : VGLUT3-p.A211V dans le système nerveux central de souris. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066700 . tel-01400441

HAL Id: tel-01400441

<https://theses.hal.science/tel-01400441v1>

Submitted on 22 Nov 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.

Université Pierre et Marie Curie
Ecole doctorale Cerveau, Cognition, Comportement
Neuroscience Paris Seine

**Caractérisation d'une mutation humaine du transporteur vésiculaire
du glutamate de type 3 (VGLUT3) :
VGLUT3-p.A211V dans le système nerveux central de souris**

Par **Lauriane Ramet**

Thèse de doctorat de Neurosciences

Dirigée par le **Dr. Salah El Mestikawy**

Présentée et soutenue publiquement le 20 Novembre 2015

Devant un jury composé de :

Dr. Régis NOUVIAN

Rapporteur

Dr. Philippe VERNIER

Rapporteur

Dr. Serge PICAUD

Examineur

Pr. Ann LOHOF

Examineur

Dr. Salah EL MESTIKAWY

Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury Régis Nouvian, Philippe Vernier, Ann Lohof et Serge Picaud qui me font l'honneur et le privilège de juger ce travail de thèse.

J'aimerai, ensuite, remercier Salah. Merci pour la confiance que tu m'as témoignée, pour la grande liberté de travail que tu m'as laissée (qui m'a fait énormément progresser) tout en étant toujours là quand j'en ai eu besoin et de m'avoir toujours encouragée même quand les manip ne fonctionnaient pas. J'ai beaucoup appris pendant ces 4 années. Avec toi, j'ai compris ce que signifiait être passionné par la recherche et tu sais d'ailleurs très bien transmettre cette passion. Merci également pour tous les paris que tu as perdus et qui m'ont permis de manger de très bonnes glaces Berthillon. D'ailleurs, je crois que tu m'en dois une !

Mes remerciements s'adressent ensuite à la fondation pour la recherche médicale et ses donateurs pour avoir financé ma quatrième et dernière année de thèse.

A tous les membres de l'équipe VGLUT passés ou présents : Diana, Stéphanie D., Odile, les deux Véronique, Nina, Nida, Fiona, Kätlin, Sylvie, Stéphanie Miot qui ont rendu cette expérience agréable et très enrichissante aussi bien sur le plan scientifique qu'humain.

Diana, je suis très heureuse de t'avoir rencontrée et que l'on soit devenue amie. Tu m'as énormément apporté et tu me manques beaucoup. Mais comme dit le proverbe, « les vrais amis ne sont jamais loin, peut-être dans la distance, mais pas dans le cœur ».

Steph D., merci pour toute l'aide que tu m'as apportée, tes conseils et pour tout ce que tu m'as appris.

Odile, merci d'avoir été ma binôme de cocotte (ton aide me fût si précieuse), pour ta bonne humeur (rarement ébranlée), pour les commandes que tu passes toujours avec le sourire même quand il est très tard le soir. Tu es essentielle à l'équipe.

Merci Véro B. et Véro F. d'avoir pris le temps de m'écouter dans mes moments de stress et d'avoir réussi à me calmer. Merci Véro B. pour le travail que tu as fourni sur ce projet.

Sylvie, merci pour l'aide que tu m'as fournie sur les hybridations *in situ* et pour toutes les conversations si enrichissantes que nous avons eues sur la bonne gastronomie et les vins!

Un grand merci à mes co-bureaux qui ont réussi à me supporter ces derniers temps! Merci Nina, Nida, Fiona, Sara, Raphaëlle, Alex (le seul garçon du bureau!) pour tout ce que vous avez fait. Je vous souhaite bonne continuation pour la suite et bien sûr le meilleur. Je tiens également à remercier mes anciens co-bureaux Thomas et Elsa.

Merci à toi, Elsa, pour l'aide si précieuse que tu m'as fournie au moment de la mise en page de mon manuscrit. J'ai été très contente de partager le bureau avec toi durant ses 4 années même si on n'arrivait rarement à se mettre d'accord sur le chauffage !

Au sein du B4, je remercierai également Bruno Giros ainsi que tous les autres membres pour leur accueil. Je tiens à remercier Amaia, Barbara, Franck, Steph DG, Vincent pour tous les échanges que nous avons pu avoir au niveau scientifique ou autre.

Merci Amaia pour ta gentillesse et pour avoir toujours été disponible quand j'avais besoin de toi.

Merci à toi, Steph DG de m'avoir appris tous les secrets des bactéries et des levures. Le clonage n'a presque plus de mystère pour moi ! Je te remercie car j'ai énormément appris à tes côtés.

A tous les membres de l'UMR, pour ces années passées à vos côtés, pour avoir créé un espace de travail agréable et conviviale. Merci à Marine, Marc, Nicolas, Lydie, Juliette, Melody, Laëtitia, Marie-Noëlle, Jamila, Layal.

Je remercie également tout le personnel de l'animalerie de l'université Pierre et Marie Curie sans qui ce travail aurait été difficilement réalisable. Un grand merci à Fabrice, Nicolas, Léa, Goran et Fanny.

Enfin un grand merci à tous mes proches.

A mes amis d'enfance et lotois, Laure, Emeline, Zazou, Maxou pour tous les moments que l'on a vécu depuis l'école d'Arcambal, pour s'être toujours soutenu et suivi de près ou de loin, je vous remercie du fond du cœur.

Aux copains de Paris, Fanny, Jimmy, Loic, Charlie, Delphine, Julien pour tous les moments que l'on a partagés ensemble et votre amitié.

Je tiens à remercier de tout mon amour ma famille. Ma sœur pour m'avoir toujours soutenue et encouragée. Tu es un exemple pour moi. Je suis très fière d'être ta petite sœur. A mes deux adorables neveux, Armand et Adrien qui m'ont obligés, pendant l'écriture, à faire des pauses « piscines » qui ont été essentielles pour mon bien-être. Merci à toi, Laurent, mon beau-frère préféré de m'avoir toujours encouragée et poussée à me surpasser.

A mes parents pour n'avoir jamais douté de moi et pour m'avoir permis d'aller au bout de mes ambitions. Je n'en serais pas arrivé là sans vous. D'ailleurs, je n'aurai pas pu rêver mieux comme parents. Merci pour tout, je vous aime.

Enfin, je remercie de tout mon cœur celui qui partage ma vie depuis toutes ces années. Merci Cédric pour ta patience, pour avoir su me rassurer quand j'en ai eu besoin, pour ton soutien sans faille depuis toutes ces années. Tu as été exceptionnel car vivre le quotidien d'une thésarde, ce n'est pas une chose facile. Je t'aime.

Merci à tous ceux que j'aurai pu oublier,

Et merci à vous, lecteurs de cette thèse.

Liste d'abréviations

AC	Amacrine Cell
ACh	Acétylcholine
AMPA	Acide alpha-amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazole Propionique
AMPc	Adénosine MonoPhosphate cyclique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
AAV1	<i>Adeno-associated virus type 1</i>
CCE	Cellules Ciliées Externes
CCI	Cellules Ciliées Internes
CCK	Cholécystokinine
CCP	<i>Clathrin-Coated Pits</i>
CCV	<i>Clathrin-Coated Vesicles</i>
CD	<i>Cochlear Duct</i>
CDK5	<i>Cyclin-Dependent Kinase 5</i>
ChAT	<i>Choline Acetyl Transferase</i>
CME	<i>Clathrin-mediated endocytosis</i>
CSP	<i>Cysteine-string protein</i>
DAG	DiAcylGlycérol
DC	<i>Deiter Cell</i>
DCN	<i>Dorsal Cochlear Nucleus</i>
DRG	<i>Dorsal Root Ganglion</i>
EAAC1	<i>Excitatory Amino Acid Carrier 1</i>
EAAT	<i>Excitatory Amino Acid Transporter</i>
EPSP	<i>Excitatory Postsynaptic Potential</i>
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
GAD	Glutamate Decarboxylase
GLAST-1	<i>GLutamate ASpartate Transporter-1</i>
Gln	Glutamine
GLT1	<i>GLutamate Transporter 1</i>
Glu	Glutamate

GS	Glutamine Syntéthase
iGluR	<i>Ionotropic Glutamate Receptor</i>
IHC	<i>Inner Hair Cell</i>
IP3	Inositol-3-phosphate
IPF	<i>Inhibitory Protein Factor</i>
KO	<i>KnockOut</i>
LOC	<i>Lateral Olivocochlear system</i>
MB	Membrane Basilaire
mEPSP	<i>Mini Excitatory Postsynaptic Potential</i>
mGluR	<i>Metabotropic Glutamate Receptor</i>
MOC	<i>Medial Olivocochlear system</i>
MSN	<i>Medium Spiny Neuron</i>
MT	Membrane tectoriaie
Munc-13/18	Mamalian-Uncoordinated-13/18
NMDA	N-Methyl-D-Aspartate
nNOS	Neuronal Nitric Oxide Synthase
NT	Neurotransmetteur
NTS	Noyau du Tractus Solitaire
OHC	Outer Hair Cell
PA	Potentiel d'Action
PAG	<i>Phosphate-Activated Glutaminase</i>
PC	Pillar Cell
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-diphosphate
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Proteine kinase C
PLC	Phospholipase C
PSD	<i>Postsynaptic Density</i>
PTV	<i>Piccolo-bassoon Transport Vesicle</i>
PV	Parvalbumin
QDC	<i>Quinoline-2,4-dicarboxylic acids</i>
RD	Raphé Dorsal

RIM	<i>Rab3 Interacting protein Molecule</i>
RM	Raphé médian
RP	<i>Recycling Pool</i>
RRP	<i>Readily Releasable Pool</i>
Rtp	<i>Resting Pool</i>
SERT	<i>Serotonin transporter</i>
SLC	<i>Solute Carrier family</i>
SNAP 25	<i>Synaptosomal-Associated Protein 25</i>
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor</i>
SNC	Système Nerveux Central
SOC	<i>Superior Olivary Complex</i>
SSRI	<i>Selective Serotonin Reuptake Inhibitor</i>
ST	Scala Tympani
SV	Scala Vestibuli
SVP	<i>Synaptic Vesicle Precursor</i>
SynCAM	<i>Synaptic Adhesion Molecule</i>
Syt1	Synaptotagmine 1
TANs	<i>Tonically Active Neurons</i>
TC	Tunnel de Corti
Trans-ACPD	<i>trans-1-amino-cyclopentane-1,3-dicarboxylate</i>
TRP	<i>Total recycling pool</i>
t-SNARE	<i>target-Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor</i>
VAChT	<i>Vesicular Acetylcholine Transporter</i>
VAMP2/7	<i>Vesicle-Associated Membrane Protein 2/7</i>
VCN	<i>Ventral Cochlear Nucleus</i>
VEAAT	<i>Vesicular Excitatory Amino Acid Transporter</i>
VGAT	<i>Vesicular GABA Transporter</i>
VGLUT	<i>Vesicular Glutamate Transporter</i>
VMAT	<i>Vesicular Monoamine Transporter</i>
VNUT	<i>Vesicular Nucleotide Transporter</i>

VS	Vésicule Synaptique
v-SNARE	<i>vesicular-Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor</i>
vt1a	<i>Vps10p-tail-interactor-1a</i>
WT	<i>Wild type</i>
ZA	Zone Active
$\Delta\psi$	Gradient électrique
$\Delta\mu\text{H}^+$	Gradient électrochimique
ΔpH	Gradient de pH
5-HT	Sérotonine

Index des tableaux	11
Index des figures	11
Introduction	13
<u>I. Le glutamate</u>	15
I.1. Acteur du métabolisme.....	15
I.2. Neurotransmetteur	17
I.3. La synapse glutamatergique : synapse excitatrice.....	18
I.3.a. Organisation de la synapse glutamatergique.....	18
I.3.a.i Les récepteurs du glutamate.....	21
I.3.a.ii Les transporteurs du glutamate.....	24
I.3.b. Les vésicules synaptiques	26
I.3.c. Transport des précurseurs et des vésicules synaptiques	32
I.4. Les différentes familles des transporteurs vésiculaires.....	33
<u>II. Les transporteurs vésiculaires du glutamate</u>	37
II.1. Découverte des VGLUTs	37
II.2. Structure membranaire/tridimensionnelle des VGLUTs.....	38
II.3. Propriétés biochimiques et pharmacologiques des VGLUTs.....	40
II.4. Distribution anatomique de VGLUT1 et VGLUT2.....	45
<u>III. Le transporteur vésiculaire du glutamate 3 : VGLUT3</u>	49
III.1. Répartition anatomique de VGLUT3	50
III.2. VGLUT3 dans les interneurons cholinergiques du striatum	54
III.3. VGLUT3 dans les neurones GABAergiques	58
III.4. VGLUT3 dans les neurones sérotoninergiques	61
III.5. La synergie vésiculaire.....	64
III.6. VGLUT3 hors du cerveau.....	67
III.6.a. VGLUT3 dans la moelle épinière et dans la racine dorsale	67
III.6.b. VGLUT3 dans le tractus solitaire	67
III.6.c. VGLUT3 dans les organes périphériques	68
III.6.d. VGLUT3 dans la rétine.....	68
<u>IV. VGLUT3 dans le système auditif</u>	70
IV.1. Oreille externe et moyenne.....	72
IV.2. Oreille interne.....	72
IV.2.a. Les cellules ciliées externes	75
IV.2.b. Les cellules ciliées internes	77
IV.2.c. Les synapses à ruban.....	79
Problématique	85
Résultats	89
<u>I. Article</u>	91
I.1. Résumé des principaux résultats	91

I.2. Article : Characterization of a human point mutation of VGLUT3 (p.A211V) - implication for synaptic vesicles composition	93
II. <u>Résultats complémentaires</u>.....	151
II.1. Contexte	151
II.2. Matériels et méthodes	152
II.3. Résultats	154
II.3.a. Résultats obtenus par Hybrigenics	154
II.3.b. Clones sélectionnés	158
II.3.c. Résultats double hybride avec le mutant de VGLUT3	160
Discussion.....	163
Conclusion	179
Références.....	183
Annexes	221
Annexe 1	223
Annexe 2	225

Index des tableaux

Tableau 1. Les sous-unités des récepteurs ionotropiques du glutamate.	23
Tableau 2. Classification, voie de signalisation et distribution cellulaire des récepteurs métabotropiques.....	24
Tableau 3. Caractéristiques des transporteurs vésiculaires des neurotransmetteurs.....	35
Tableau 4. Distribution anatomique de l'ARNm de VGLUT3 et de sa protéine dans le SNC.....	54
Tableau 5. Clones positifs obtenus après le crible double hybride.	155
Tableau 6. Résultats obtenus des interactions étudiées par double hybride en levure.	161

Index des figures

Figure 1. Représentation schématique du cycle glutamine-glutamate.....	17
Figure 2. Morphologie d'une synapse excitatrice observée en microscopie électronique	19
Figure 3. Schéma simplifié d'une synapse glutamatergique.	25
Figure 4. Schéma de la classification des principales populations de VSs.....	27
Figure 5. Molécules impliquées dans le cycle vésiculaire.	30
Figure 6. Les différentes voies d'endocytose.	32
Figure 7. Arbre phylogénétique des transporteurs de la famille SLC17.....	36
Figure 8. Alignement des séquences d'acides aminés de VGLUT1, VGLUT2, VGLUT3 de rat.	39
Figure 9. Structure 3D du VGLUT1 humain obtenue par homologie.	40
Figure 10. Dépendance et régulation du transport de glutamate par les ions chlore.....	42
Figure 11. Structures des molécules qui inhibent les VGLUTs.	45
Figure 12. Distribution régionale des ARNm (a) et protéines (b) de VGLUT1 et VGLUT2.	47
Figure 13. Les différents types cellulaires de la rétine.	48
Figure 14. Distribution régionale de l'ARNm et de la protéine VGLUT3.	52
Figure 15. Distribution régionale de l'ARNm et la protéine de VGLUT3.	53
Figure 16. Composition neuronale du striatum.	55
Figure 17. Les interneurones cholinergiques striataux expriment VGLUT3.....	56
Figure 18. Les interneurones GABAergiques expriment VGLUT3.....	58
Figure 19. Les interneurones GABAergiques exprimant VGLUT3 sont CCK-positifs.	59
Figure 20. VGLUT3 et VIAAT sont localisés sur les mêmes vésicules.	60

Figure 21. Voies sérotoninergiques chez l'Homme.....	62
Figure 22. Colocalisation de 5-HT (en vert) et VGLUT3 (en bleu) dans un segment axonal du cortex moteur.....	63
Figure 23. Synergie vésiculaire cholinergique (A) et sérotoninergique (B).....	65
Figure 24. Mécanisme moléculaire proposé pour la synergie vésiculaire.....	66
Figure 25. VGLUT3 est présent dans les neurones nitroxydériques du NTS.....	68
Figure 26. Distribution de VGLUT3 dans la rétine de rat et d'Homme.....	70
Figure 27. Schéma de l'appareil auditif humain.....	71
Figure 28. Section axiale de la cochlée de mammifère.....	73
Figure 29. Image de microscopie à balayage de l'organe de Corti.....	73
Figure 30. Représentation schématique d'une section transversale de cochlée (A) avec un zoom sur l'organe de Corti (B).....	74
Figure 31. Microscopie à balayage de l'arrangement des cellules ciliées à la base de la cochlée.....	75
Figure 32. Représentation schématique des innervations afférentes et efférentes des CCE et des CCI.....	77
Figure 33. Organisation tonotopique de la cochlée.....	78
Figure 34. Synapse à ruban visualisée en microscopie électronique à transmission.....	80
Figure 35. Composition moléculaire d'une synapse à ruban d'une CCI.....	82
Figure 36. Expression de VGLUT3 et de la protéine Otoferline dans l'organe de Corti.....	83
Figure 37. Expression de VGLUT3 dans les CCI.....	84
Figure 38. Représentation chimique des acides aminés alanine (A) et valine (B).....	165
Figure 39. Les différents modèles putatifs de répartition de VGLUT3 sur les VSs.....	176

Introduction

I. Le glutamate

I.1. Acteur du métabolisme

Le glutamate (forme anionique de l'acide glutamique) est le plus abondant des acides aminés de l'alimentation humaine. Connu sous le code E620, il est utilisé comme exhausteur de goût des aliments et est additionné aux préparations alimentaires. Sa saveur spécifique n'est détectable que s'il est présent à l'état libre. Cette saveur a été reconnue pour la première fois en 1908, par le scientifique Kikunae Ikeda, qui la nomma « umami » (savoureux). De nos jours, cette saveur est largement acceptée comme étant le cinquième goût (Sano, 2009). Le glutamate est largement répandu dans l'organisme où il joue un rôle central dans le métabolisme cellulaire (Krebs, 1935). En effet, il intervient dans diverses réactions du métabolisme comme :

- la synthèse de petites molécules telles que le glutathion
- la synthèse de grosses molécules comme les protéines
- la détoxification de l'ammoniaque (Fonnum, 1984).

Il est également, un précurseur majeur du cycle de Krebs (Meister *et al.*, 1979; Owen *et al.*, 2002). Par exemple, dans le muscle squelettique, le glutamate est utilisé comme un précurseur anaplérotique pour améliorer le métabolisme oxydatif dans le cycle de Krebs (Rennie *et al.*, 2001; Frigerio *et al.*, 2008). Il joue également un rôle de messenger dans les organes périphériques et les tissus. Ainsi, dans les cellules endocrines, il agit comme un messenger intracellulaire dans la régulation de la sécrétion d'insuline en réponse à une augmentation de glucose (Maechler & Wollheim, 1999; Moriyama *et al.*, 2000).

La concentration en glutamate varie selon les différents compartiments cellulaires et tissus. En effet, sa concentration plasmatique est comprise entre 30-100 μM alors que dans le cytoplasme des érythrocytes, elle est d'environ 500 μM et dans le muscle squelettique de 5000 μM (Henriksson, 1991; Filho *et al.*, 1999; Small & Tauskela, 2005). Le liquide céphalo-rachidien contient 10 μM de glutamate.

Dans le Système Nerveux Central (SNC), le glutamate a deux fonctions principales. Il est le principal neurotransmetteur excitateur et un intermédiaire métabolique de la synthèse de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) qui est le principal neurotransmetteur inhibiteur du

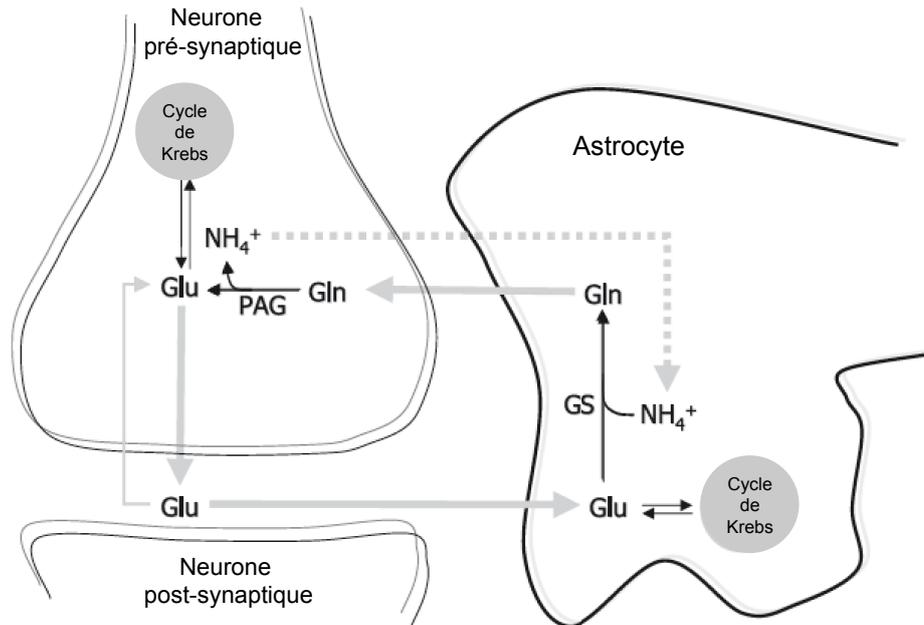
SNC chez les mammifères et les oiseaux. Le glutamate est également une puissante molécule excitotoxique (Olney, 1969). En effet, son excitotoxicité est impliquée dans de nombreuses pathologies neurodégénératives comme les accidents vasculaires cérébraux, la sclérose latérale amyotrophique et l'épilepsie (Smith, 2000).

Dans le cerveau, la concentration en glutamate intracellulaire est particulièrement élevée puisqu'elle atteint 10 mM (Danbolt, 2001; Featherstone & Shippy, 2008). Le glutamate est continuellement libéré par les neurones. Il est donc très important que la concentration extracellulaire en glutamate soit maintenue en dessous de son seuil d'excitotoxicité afin de préserver l'homéostasie du cerveau. Dans la fente synaptique, la concentration du glutamate est d'environ 20 nM. Elle augmente jusqu'à 1 mM après l'arrivée d'un potentiel d'action puis revient en 10 msec à 20 nM, grâce à deux mécanismes (Dzubay & Jahr, 1999) :

- le premier étant par simple diffusion dans les synapses de petits diamètres. Cette diffusion n'est possible que sur de petites distances (de l'ordre de quelques centaines de nanomètres) et tant que la concentration en glutamate dans le fluide extracellulaire est basse (Danbolt, 2001).

- le deuxième et principal mécanisme responsable du maintien des faibles concentrations en glutamate dans la fente synaptique, est la recapture de ce dernier par des transporteurs membranaires très actifs appelés Transporteurs des Acides Aminés Excitateurs (EAAT) (Logan & Snyder, 1972; Erecinska & Silver, 1990; Danbolt, 2001).

Le glutamate libéré est recapté essentiellement par les astrocytes grâce aux transporteurs EAAT1 et EAAT2 mais il peut également l'être par les neurones grâce à EAAT3. Dans l'astrocyte, le glutamate peut être soit transformé en glutamine par la glutamine synthétase (GS), une enzyme ATP-dépendante (Laake *et al.*, 1995), soit converti en alpha-cétoglutarate par la glutamate déshydrogénase ou par une transaminase. L'alpha-cétoglutarate est ensuite intégré au cycle de Krebs pour produire du malate. La glutamine est libérée dans l'espace extracellulaire par les astrocytes puis captée par les terminaisons axonales et transformée en glutamate par une enzyme mitochondriale, la glutaminase activée par le phosphate (GLS1 ou PAG pour *phosphate-activated glutaminase*) (Erecinska & Silver, 1990). Ce processus est appelé le cycle glutamine-glutamate (**Figure 1**) (van den Berg & Garfinkel, 1971; Bak *et al.*, 2006). La glutamine est le principal précurseur du glutamate neuronal. Il faut donc une bonne coopération entre les terminaisons synaptiques et les cellules gliales pour maintenir une réserve adéquate de glutamate dans les neurones excitateurs.



?

Figure 1. Représentation schématique du cycle glutamine-glutamate.

Le glutamate (Glu) libéré dans la fente synaptique par exocytose est capté par les astrocytes et converti en glutamine (Gln) par la glutamine synthétase (GS). La Gln est libérée par l'astrocyte puis recaptée par le neurone. Elle est ensuite convertie en Glu dans la mitochondrie neuronale. Le Glu peut être converti en alpha-cétoglutarate et intégré au cycle de Krebs dans le neurone comme dans l'astrocyte (d'après Back *et al.*, 2006).

I.2. Neurotransmetteur

Dans les années 1950, Hayashi a observé que le L-glutamate pouvait provoquer des convulsions chez le chien et le singe lorsqu'il était injecté en intra-cérébro-ventriculaire et intra-carotidien (Hayashi, 1954). Neuf ans plus tard, Curtis et collaborateurs rapportent dans la revue *Nature* que le glutamate a un effet excitateur et dépolarisant sur les neurones (Curtis *et al.*, 1959) et proposent pour la première fois un rôle de neurotransmetteur pour le glutamate (pour revue (Watkins, 2000)). Mais il a fallu attendre une trentaine d'années plus tard pour que son rôle en tant que principal neurotransmetteur excitateur du SNC soit confirmé (Fonnum, 1984).

Le glutamate peut être qualifié de neurotransmetteur car il remplit différents critères définissant les neurotransmetteurs (Schwartz, 2000; Hackett & Ueda, 2015) :

- être synthétisé dans certains neurones car il ne passe pas la barrière hémato-encéphalique
- être présent et stocké au niveau des terminaisons présynaptiques dans des vésicules synaptiques

- être libéré dans l'espace synaptique en réponse à un potentiel d'action pré-synaptique de façon dépendante des ions calciums et en quantité suffisante pour induire une réponse de l'élément pré- et/ou postsynaptique

- des récepteurs spécifiques reconnaissant le glutamate sont présents au voisinage de la structure synaptique

- le glutamate libéré est rapidement éliminé de la fente synaptique par les EAATs.

De nos jours, il est admis que la transmission glutamatergique joue un rôle majeur dans le SNC des mammifères et que le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur du SNC. On estime que plus de 70% des synapses du cerveau libèrent du glutamate et que la majorité des structures du cerveau possède des neurones glutamatergiques (Purves *et al.*, 2004). De plus, les cellules gliales possèdent des récepteurs au glutamate sur leur membrane plasmique et la machinerie nécessaire pour libérer le glutamate (Parpura *et al.*, 1994; Bergles *et al.*, 2000). Il n'est donc pas surprenant que le glutamate soit impliqué dans de nombreux mécanismes physiologiques normaux et pathologiques. Son implication dans des fonctions importantes comme l'apprentissage, la cognition, la mémoire a été largement décrite (Curtis *et al.*, 1960; Attwell, 2000; Sheldon & Robinson, 2007). Il intervient également dans l'induction et l'élimination de synapses, dans la migration et la différenciation cellulaire lors du développement du SNC (Danbolt, 2001).

Dans les terminaisons synaptiques, le glutamate devient un neurotransmetteur (NT) lorsqu'il est accumulé dans les vésicules synaptiques par des transporteurs vésiculaires du glutamate (appelés VGLUT, voir chapitre II et III de l'introduction).

I.3. La synapse glutamatergique : synapse excitatrice

I.3.a. Organisation de la synapse glutamatergique

Les neurones présents dans le cerveau des mammifères communiquent entre eux par des jonctions spécialisées appelées synapses (Sheng & Hoogenraad, 2007). Environ 99% des synapses du SNC des vertébrés sont des synapses chimiques. Cela signifie que les neurones communiquent entre eux par libération de NT dans la fente synaptique. Selon la classification établie par Gray en 1959, les synapses glutamatergiques sont des synapses de type I dites asymétriques composées de trois compartiments : le bouton présynaptique, la fente synaptique et l'élément postsynaptique (Gray, 1959).

Le bouton présynaptique contient les vésicules synaptiques (VSs) remplies de glutamate. Une partie de ces vésicules est arrimée à la membrane plasmique dans la zone active (ZA). C'est dans cette zone que le glutamate vésiculaire est libéré par exocytose (Storm-Mathisen & Ottersen, 1990; Sudhof, 2004). En microscopie électronique, une zone dense aux électrons apparaît sur la membrane de l'élément postsynaptique. Cette zone dense aux électrons est appelée densité postsynaptique (PSD) (**Figure 2**). Elle est directement apposée à la zone active et elle contient une forte concentration en protéines de signalisation et structurales (Kim & Ryan, 2009; Sheng & Kim, 2011). Les récepteurs au glutamate sont enrichis dans cette zone dense aux électrons qui est caractéristique des synapses glutamatergiques (Gray, 1959; Colonnier, 1968). Elle joue un rôle dans la transduction du signal postsynaptique et dans la plasticité synaptique. La fente synaptique, qui mesure 30 nm de large, est distante de 15 à 25 nm de l'élément postsynaptique. La synapse est stabilisée grâce à des molécules d'adhésions synaptiques comme les neuroligines/neurexines, les éphrines et les récepteurs éphrines, les cadhérines, les molécules d'adhésion cellulaire synaptique (synCAM) (Gray, 1969; Zuber *et al.*, 2005; Savtchenko & Rusakov, 2007). Ces dernières interagissent avec les protéines d'échafaudage intracellulaires pour maintenir l'intégrité de la synapse et régulent l'assemblage et le fonctionnement de la machinerie synaptique dans la PSD (Chua *et al.*, 2010; Hruska & Dalva, 2012). Par exemple, les neurexines et les neuroligines sont les composants principaux des machines moléculaires qui contrôlent la transmission synaptique et permettent aux réseaux neuronaux de traiter des signaux complexes (Sudhof, 2008).

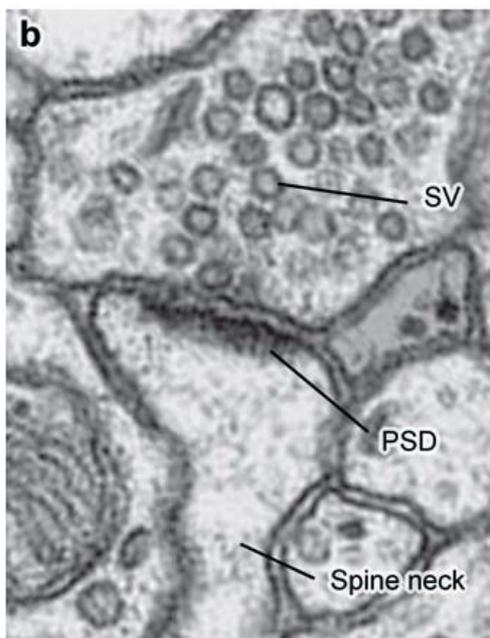


Figure 2. Morphologie d'une synapse excitatrice observée en microscopie électronique.

L'élément présynaptique contient les vésicules synaptiques (abréviation SV pour *synaptic vesicle*) remplies de glutamate. Les vésicules font face à la densité postsynaptique (PSD) localisée à l'extrémité de l'épine dendritique (spine neck) de l'élément postsynaptique. La fente synaptique qui sépare l'élément présynaptique du postsynaptique mesure entre 20 et 25 nm de large. (Figure prise de Sheng *et al.*, 2007).

Le fonctionnement des synapses chimiques repose sur la transduction successive du signal électrique en signal chimique, par libération du NT, puis du signal chimique en signal électrique suite à l'activation de récepteurs postsynaptiques par le NT (Kandel, 2000). En effet, lors de l'arrivée d'un PA et suite à une entrée de calcium dans le neurone présynaptique, les vésicules libèrent le glutamate dans la fente synaptique par exocytose au niveau de la ZA. Une fois libéré, le glutamate interagit avec ses récepteurs présents dans la fente synaptique, induisant ainsi une réponse dans l'élément postsynaptique. Il est, ensuite, rapidement recapté par les EAATs présents sur les cellules environnantes. Tous ces procédés sont étroitement contrôlés et dépendent de complexes macromoléculaires impliquant des protéines et des lipides (Sudhof, 2004; Sheng & Hoogenraad, 2007; Chua *et al.*, 2010).

Différents paramètres peuvent altérer l'action du glutamate libéré (Featherstone & Shippy, 2008) :

- la quantité de glutamate libéré
- la répartition et le nombre de récepteurs et transporteurs
- la diffusion du neurotransmetteur
- l'anatomie de la synapse

La PSD est généralement localisée à l'extrémité d'une épine dendritique. Elle recrute et organise les récepteurs du glutamate (AMPA, NMDA, Kainate, les récepteurs métabotropiques) ainsi que les molécules participant aux cascades de signalisation initiées par la liaison du glutamate à ses récepteurs. Elle permet aussi l'ancrage de ce complexe au cytosquelette d'actine. Aux extrémités de la PSD (région appelée extrasynaptique), on trouve les récepteurs métabotropiques du glutamate et les protéines impliquées dans l'endocytose des récepteurs (Sudhof, 2004; Sheng & Hoogenraad, 2007; Chua *et al.*, 2010; Smart & Paoletti, 2012). La structure et la composition de la PSD est régulée de façon dynamique par l'activité synaptique (Heine *et al.*, 2008; Bannai *et al.*, 2009; Kim & Ryan, 2009; Sheng & Kim, 2011). Les compartiments pré- et postsynaptiques changent de structure et de composition durant le développement et en réponse à l'activité synaptique (Sheng & Hoogenraad, 2007; Branco & Staras, 2009; Fisher-Lavie & Ziv, 2013). Le nombre de vésicules dans la zone active, leur probabilité de libération, le nombre de récepteurs dans le compartiment postsynaptique jouent un rôle essentiel dans l'organisation et dans la régulation de la transmission synaptique (Kim & Ryan, 2010; Sudhof, 2012).

1.3.a.i Les récepteurs du glutamate

La transmission glutamatergique se fait grâce à la liaison du glutamate sur des récepteurs spécifiques, divisés en deux classes :

- les récepteurs ionotropiques (iGluR) ou récepteurs-canaux qui sont responsables d'une transmission synaptique excitatrice rapide.

- les récepteurs métabotropiques (mGluRs) qui sont couplés à des protéines G et qui vont avoir un effet modulateur du fait du couplage avec une protéine G et du recrutement de divers seconds messagers. Grâce à cette classe de récepteur, le glutamate peut donc exercer également un effet inhibiteur.

- **Les récepteurs ionotropiques**

Les iGluRs sont les récepteurs glutamatergiques les plus abondants dans le cerveau. Environ 70% des synapses dans le cerveau des mammifères expriment les iGluRs (Bekkers & Stevens, 1989). Les iGluRs sont divisés en quatre sous-groupes selon la séquence de leurs sous-unités et leurs affinités pharmacologiques pour des ligands synthétiques. Ils ont, dans un premier temps, été classés en fonction du nom de leur agoniste le plus sélectif (**Tableau 1**).

Les récepteurs NMDA sont activés par le N-méthyl-D-aspartate (NMDA), le L-glutamate et le L-aspartate. A l'état basal, le magnésium (Mg^{2+}) reste fixé au milieu du canal ionique et bloque le passage des cations. 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 de calcium qui a pour conséquence d'augmenter encore davantage la dépolarisation de la membrane (Ozawa *et al.*, 1998; Kohr, 2006). Le message induit par les récepteurs NMDA est lent et étendu dans le temps. Il joue un rôle central dans la plasticité synaptique (Casado *et al.*, 2002; Daoudal & Debanne, 2003).

Les récepteurs AMPA peuvent être directement activés par l'Acide α -amino-3-hydroxy-5-Méthyl-4-isoxazole Propionique (AMPA) et par le glutamate. La fixation du glutamate est suffisante pour l'activation du récepteur AMPA. Ils sont majoritairement perméables aux ions sodium et potassium. L'activation du récepteur AMPA se fait lorsque les quatre sites de liaison au glutamate sont occupés, ce qui a pour conséquence l'ouverture du canal sodium et la dépolarisation de la dendrite (Ozawa *et al.*, 1998; Pinheiro & Mulle,

2008). Les récepteurs AMPA se désensibilisent rapidement (Armstrong *et al.*, 2006). L'activation des récepteurs AMPA est, en général, plus rapide et précède l'activation des récepteurs NMDA. Le nombre de récepteurs AMPA dans la PSD est activement régulé, en particulier par leur mobilité. En effet, ces récepteurs peuvent se déplacer de quelques microns par seconde et leur mobilité est un mécanisme sous-jacent de l'affaiblissement ou du renforcement de la transmission synaptique (Heine *et al.*, 2008; Anggono & Huganir, 2012; Luscher & Malenka, 2012; Choquet & Triller, 2013).

Les récepteurs Kainate sont activés par le glutamate et par une substance extraite de l'algue rouge *Digenea simplex*, le kainate. Tout comme les récepteurs AMPA, ils sont perméables aux ions sodium et potassium et leur activation entraîne les mêmes événements que l'activation du récepteur AMPA (Ozawa *et al.*, 1998). Les récepteurs Kainate sont situés au niveau postsynaptique comme les autres iGluRs ainsi qu'au niveau présynaptique où ils régulent positivement la transmission glutamatergique (autorécepteurs) (Rodriguez-Moreno & Sihra, 2007). Les récepteurs kainate présynaptiques posséderaient une activité métabotrope. En effet, ils inhiberaient la libération de glutamate à travers un mécanisme dépendant des protéines G au niveau des synapses des cellules pyramidales de l'hippocampe pendant le développement (Lauri *et al.*, 2006; Pinheiro & Mulle, 2008).

Enfin, les récepteurs Delta sont considérés comme des iGluRs sur la base de leur séquence en acides aminés. Ils présentent deux sous-unités appelées delta 1 et delta 2 localisés différemment dans le cerveau. Delta 2 est majoritairement situé au niveau des cellules de Purkinje dans le cervelet alors que Delta 1 est exprimé dans les cellules ciliées internes du système auditif, les cellules bipolaires et le ganglion rétinien et dans l'organe vestibulaire (Safieddine & Wenthold, 1997; Jakobs *et al.*, 2007; Schmid & Hollmann, 2008). Dans ces deux systèmes, les récepteurs Delta jouent un rôle important. Delta 1 est important pour l'audition des hautes fréquences et pour maintenir l'homéostasie ionique dans la cochlée basale. La délétion de GluD1 chez la souris entraîne un comportement émotionnel et social anormal (Yadav *et al.*, 2012). Les souris n'exprimant plus GluD2 (delta 2) souffrent d'ataxie et ont une plasticité synaptique altérée. En particulier, la synaptogénèse des cellules de Purkinje, l'apprentissage moteur, la coordination sont altérés chez ces souris (Wang *et al.*, 2003; Yuzaki, 2004). Leur ligand endogène n'a pas encore été identifié et aucun agoniste des autres iGluRs n'est actif sur les sous-unités Delta. L'activité de cette sous-classe d'iGluR ne semble pas être liée aux récepteurs canaux (Schmid & Hollmann, 2008). Cependant, il a été montré que les récepteurs delta 1 et delta 2 peuvent former un canal ionique quand ils sont liés au domaine ligand du récepteur Kainate (Schmid *et al.*, 2009; Orth *et al.*, 2013).

Tableau 1. Les sous-unités des récepteurs ionotropiques du glutamate.
 Entre parenthèse figure la nouvelle nomenclature simplifiée des iGluRs.

Récepteurs ionotropiques			
AMPA	NMDA	Kainate	Récepteur Delta
GluR1 (GluA1)	NR1 (GluN1)	GluR5 (GluK1)	GluR δ 1 (GluD1)
GluR2 (GluA2)	NR2 A,B,C,D (GluN2A,B,C,D)	GluR6 (GluK2)	GluR δ 2 (GluD2)
GluR3 (GluA3)	NR3A,B (GluN3A,B)	GluR7 (GluK3)	
GluR4 (GluA4)		KA1 (GluK4)	
		KA2 (GluK5)	

• **Les récepteurs métabotropiques**

Les mGluRs font partie de la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (pour revue (Nicoletti *et al.*, 2011)). L'activation des mGluRs induit l'activation de seconds messagers comme l'AMP-cyclique (AMPc) ou l'inositol-3-phosphate (IP-3). Ces deux seconds messagers déclenchent soit les voies de phosphorylation dépendantes de l'AMPc, soit celles de la libération de calcium au niveau du réticulum endoplasmique et les voies de phosphorylation dépendantes de la protéine kinase C (PKC) respectivement. Les mGluRs montrent une cinétique d'activation et de propagation du signal plus lente que les iGluRs. Il existe huit sous-types de mGluRs qui sont classés en trois groupes (**Tableau 2**) en fonction de leurs homologies de séquence (environ 70% d'homologie dans un groupe et 40% d'homologie intergroupe), de leurs pharmacologies et des voies de transduction auxquelles ils sont couplés (Nakanishi, 1992; Conn & Pin, 1997).

Les trois groupes sont formés par :

- Groupe I : mGluR1 et mGluR5
- Groupe II : mGluR2 et mGluR3
- Groupe III : mGluR4, mGluR6, mGluR7 et mGluR8

Les récepteurs du groupe I sont couplés à la protéine G_q/G₁₁ et activent la phospholipase C (PLC) qui clive le phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP2) en IP3 et en DiAcylGlycérol (DAG). L'IP3 libère le calcium de la réserve intracellulaire et le DAG active la PKC. Les récepteurs du groupe II et III, quant à eux, sont couplés à la protéine G_i/G_o qui inhibe l'adénylate cyclase (AC). Cette dernière catalysant la réaction ATP en AMPc, la

concentration en AMPc diminue dans la cellule ainsi que celle du calcium (**Tableau 2**) (Kew & Kemp, 2005; Ferraguti & Shigemoto, 2006).

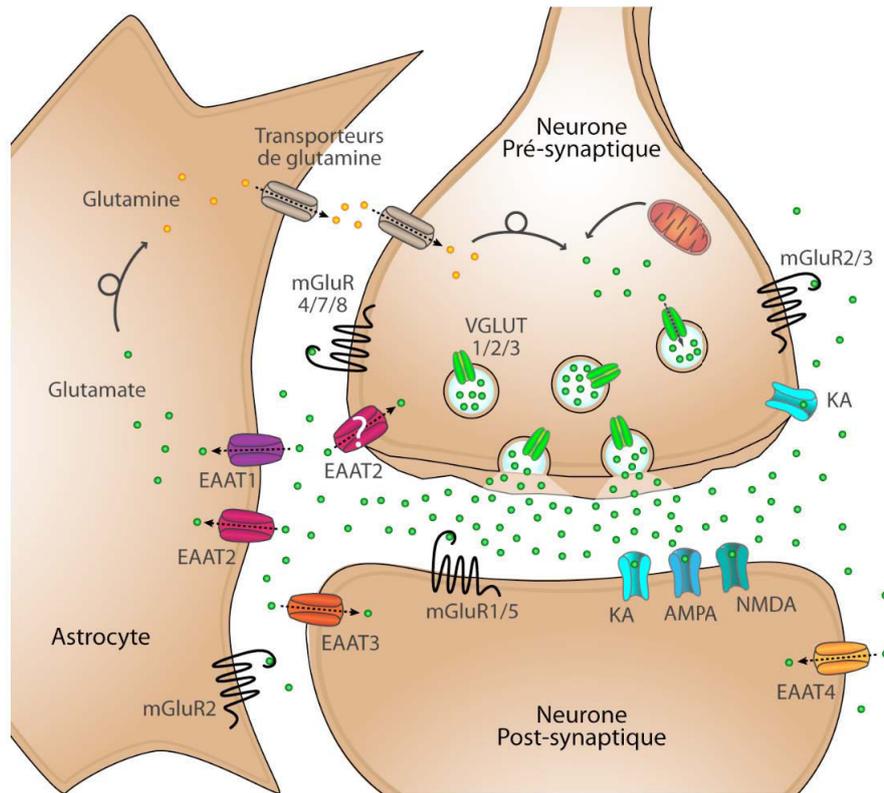
Tableau 2. Classification, voie de signalisation et distribution cellulaire des récepteurs métabotropiques.

Groupe	Récepteurs	Proteine G	Voie de signalisation	Expression cellulaire
Groupe I	mGluR1	G _q /G ₁₁	Activation PLC	Neurones, majoritairement postsynaptique
	mGluR5		↑DAG ↑IP ₃ ↑[Ca ²⁺]	Neurones, majoritairement postsynaptique Astrocytes
Groupe II	mGluR2	G _i /G ₀	Inhibition AC	Neurones, présynaptique et postsynaptique
	mGluR3		↓[AMPc] ↓[Ca ²⁺]	Neurones, présynaptique et postsynaptique Astrocytes
Groupe III	mGluR4	G _i /G ₀	Inhibition AC	Neurones, majoritairement présynaptique
	mGluR6			Cellules bipolaires de la rétine
	mGluR7			Neurones, présynaptique
	mGluR8			Neurones, majoritairement présynaptique

1.3.a.ii Les transporteurs du glutamate

Les transporteurs du glutamate ont deux fonctions principales (**Figure 3**) :

- accumuler le glutamate dans les vésicules synaptiques, fonction réalisée par les transporteurs vésiculaires du glutamate (VGLUTs)
- éliminer le glutamate libéré de la fente synaptique afin de réguler son activité et de prévenir son excitotoxicité, fonction réalisée par les transporteurs plasmiques (EAATs) (Meldrum & Garthwaite, 1990).



?

Figure 3. Schéma simplifié d'une synapse glutamatergique.

Le glutamate synthétisé dans le neurone présynaptique est accumulé dans des vésicules synaptiques par des transporteurs vésiculaires du glutamate (VGLUTs). Une fois libéré dans la fente synaptique, il active ses récepteurs ionotropiques (AMPA, NMDA, Kaïnate) ou métabotropiques (mGluRs). La transmission synaptique prend fin lorsque le glutamate est recapté par des transporteurs plasmiques (EAATs) présents sur les neurones et les astrocytes.

- **Les transporteurs plasmiques**

Les transporteurs excitateurs d'acides aminés (EAAT) exprimés par les neurones et les cellules gliales sont des acteurs majeurs de la transmission excitatrice dans le SNC. En effet, ils jouent plusieurs rôles clés puisqu'ils permettent 1) le recyclage du glutamate, 2) le contrôle de la durée et l'étendue du message glutamatergique et 3) de protéger les neurones de l'action excitotoxique du glutamate (**Figure 3**).

Les EAATs sont des membres de la famille des SLC1 (pour « *SoLute Carrier* »). Ils éliminent le glutamate (et l'aspartate) de la fente synaptique. Ce transport s'accompagne d'un cotransport d'ions sodium et hydrogène et d'un antiport de potassium (Kanai & Hediger, 2004).

Cette famille comporte cinq membres appelés EAAT1-5. Ils présentent 50-60% d'homologies (Seal & Amara, 1999). Les EAATs ont une distribution différentielle dans le

SNC. EAAT1-3 sont les plus abondants dans le SNC. On les retrouve également dans les tissus périphériques (Gegelashvili & Schousboe, 1998). EAAT1 (appelé également GLAST1) a été le premier des EAATs à être cloné (Storck *et al.*, 1992). Ensuite, EAAT2 (GLT1) et EAAT3 (EAAC1) ont été identifiés (Kanai & Hediger, 1992; Pines *et al.*, 1992). EAAT1 et EAAT2 sont exprimés par les astrocytes alors que EAAT3 et EAAT4 sont des transporteurs neuronaux (Furuta *et al.*, 1997; Perego *et al.*, 2000) (**Figure 3**). Contrairement aux autres EAATs, EAAT5 est présent au niveau des bâtonnets et des cellules bipolaires de la rétine (Eliasof *et al.*, 1998).

- **Les transporteurs vésiculaires du glutamate**

A l'instar des autres NTs classiques, le glutamate est accumulé dans des vésicules synaptiques par trois sous-types de transporteurs protons-dépendants (**Figure 3**). Ces transporteurs vésiculaires du glutamate (VGLUT1-3) sont des marqueurs spécifiques de la transmission glutamatergique. Ils ont été identifiés dans les années 2000 (Ni *et al.*, 1994; Aihara *et al.*, 2000; Bellocchio *et al.*, 2000; Takamori *et al.*, 2000; Fremeau *et al.*, 2001; Herzog *et al.*, 2001; Fremeau *et al.*, 2002; Gras *et al.*, 2002; Schafer *et al.*, 2002; Takamori *et al.*, 2002; Varoqui *et al.*, 2002; Fremeau *et al.*, 2004) (voir chapitre II et III).

I.3.b. Les vésicules synaptiques

Les vésicules synaptiques (VSs) sont un intermédiaire clé dans la conversion de l'information électrique en information chimique. L'élément présynaptique contient en moyenne une centaine de VSs (Schikorski & Stevens, 1997) qui sont classées en différentes populations selon leurs compositions en protéines, leurs distances à la membrane plasmique et leurs propriétés fonctionnelles. Ces vésicules confèrent à l'élément présynaptique des caractéristiques différentes de libération du NT (Rizzoli & Betz, 2005; Fowler & Staras, 2015).

Les VSs sont regroupées en trois populations (ou *pool*) : le *pool* compétent pour la libération (*Readily Releasable Pool* ou RRP), le *pool* de recyclage (*Recycling Pool* ou RP) et le *pool* de repos (*Resting Pool* ou RtP) (**Figure 4**).

Le RRP est amarré ou "*docké*" à la membrane plasmique et il constitue le premier groupe de vésicules libéré à l'arrivée d'un potentiel d'action. Le RRP comprendrait un petit nombre de vésicules et est rapidement utilisé. Dans les neurones de l'hippocampe, il contient 5 à 15 vésicules (Stevens & Tsujimoto, 1995; Rosenmund & Stevens, 1996; Dobrunz & Stevens, 1997).

Le RP est proche de la membrane plasmique et tend à être utilisé lors de stimulations modérées. Le RRP et le RP forment le *pool* total de recyclage (TRP) (Figure 4). La taille moyenne du TRP dans une synapse est couramment estimée entre 20 et 50% du *pool* total de VS. Cependant, cela varie considérablement d'un site présynaptique à l'autre. La taille du *pool* serait régulée d'une manière dépendante de l'activité et aurait besoin d'un signal de la cellule postsynaptique. Des études récentes ont identifiées plusieurs kinases, notamment la CDK5 (*cyclin-dependent kinase 5*) comme acteur clé dans la régulation de la taille du RP (Kim & Ryan, 2010). La régulation de la taille du RP implique également la protéine kinase A (PKA) en réponse à l'activation des récepteurs présynaptiques Kainate (Gelsomino *et al.*, 2013).

Enfin, le RtP correspond au *pool* dont les conditions de recrutement ne semblent pas être physiologique et ne répondent pas à une stimulation. Mais ce *pool* contient la majorité des VSs. On peut donc se poser la question de savoir pour quelle raison un *pool* non-fonctionnel (le RtP) et contenant la majorité des VSs est maintenu dans les synapses avec un coût énergétique certainement considérable (Ikeda & Bekkers, 2009). Une solution proposée est que ces vésicules agissent comme un tampon pour les protéines solubles impliquées dans le recyclage des vésicules (Denker *et al.*, 2011a). Une autre possibilité est que le RtP sert de donneur ou d'accepteur de vésicules au TRP (Jung *et al.*, 2014). Il a été montré que l'activité de la CDK5 permet le recrutement et l'échange de vésicules du RtP vers le TRP quand la calcineurine a un effet inverse. Mais le rôle de ce *pool* de vésicule est encore controversé. (Darcy *et al.*, 2006; Fernandez-Alfonso & Ryan, 2008; Kim & Ryan, 2010; Denker *et al.*, 2011b; Hua *et al.*, 2011a; Marra *et al.*, 2012).

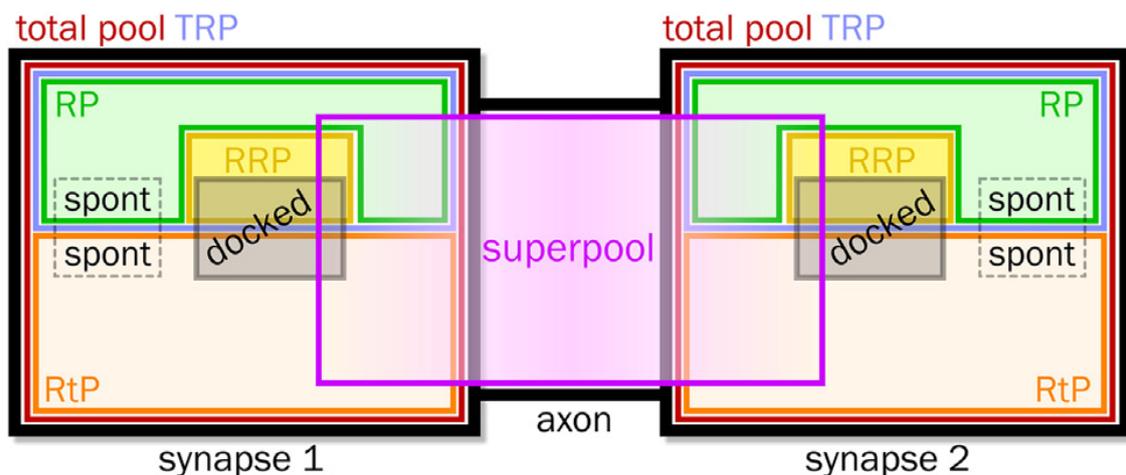


Figure 4. Schéma de la classification des principales populations de VSs.

Les *pool*s représentés sont le *pool* total (*total pool*), le *pool* total de recyclage (*total recycling pool* ou TRP), le *pool* de recyclage (*recycling pool* ou RP), le *pool* de repos (*resting pool* ou RtP), le *pool* compétent pour la libération (*readily releasable pool* ou RRP), le *pool* arrimé (*docked*) et le *superpool*. Le *pool* spontané est indiqué par des rectangles en pointillés reflétant l'incertitude quant à sa place des les sous-populations existantes. La taille des carrés reflète la quantité moyenne des divers *pool*s (d'après Fowler *et al.*, 2015).

La population de vésicules qui est morphologiquement associée à la zone active forme une catégorie particulière de sous-populations vésiculaires appelée le *pool* arrimé (« *docked pool* »). Ce *pool* assure une réponse rapide en réponse à l'arrivée d'un PA (**Figure 4**). Elle comprend des vésicules du RRP mais aussi du RtP (Ratnayaka *et al.*, 2012).

Depuis quelques années, une autre sous-population de vésicules, appelée le « *superpool* », a émergé. Elle définit une population de vésicules qui n'est pas confinée dans la synapse mais qui est mobile entre plusieurs synapses (**Figure 4**). Le *superpool* comprend aussi bien des vésicules du RP que du RtP. Il se déplace le long de l'axone comprenant un petit groupe de vésicules mixtes appelé « *clusters* » par diffusion ou dépendant des moteurs moléculaires (Fernandez-Alfonso & Ryan, 2008; Staras *et al.*, 2010; Herzog *et al.*, 2011). Enfin, il a été décrit une autre sous-population de vésicules qui correspond au *pool* spontané. Il s'agit de vésicules qui peuvent fusionner spontanément avec la membrane plasmique (sans l'arrivée d'un PA et d'une entrée de calcium dans le neurone présynaptique) avec comme conséquence la production de courants postsynaptiques excitateurs miniatures (miniature Excitatory PostSynaptic Currents ou mEPSC). Ces mEPSCs représentent un quantum de NT libérés qui pourrait correspondre au contenu d'une seule vésicule (Fatt & Katz, 1952). La nature des vésicules responsables des mEPSCs est encore controversée. En effet, certaines études proposent qu'elles proviendraient du RP (Groemer & Klingauf, 2007; Hua *et al.*, 2010; Wilhelm *et al.*, 2010) ou d'un sous-ensemble du RP et du RtP (Hua *et al.*, 2011a) et posséderaient les mêmes caractéristiques que les VSs répondant au PA. Au contraire, d'autres études ont récemment montré qu'elles proviendraient d'un sous-ensemble de VSs du RtP mais avec des caractéristiques (machinerie de fusion utilisée, voie de recyclage et composition moléculaire) complètement différentes des VSs qui répondent au PA (Truckenbrodt & Rizzoli, 2014; Kavalali, 2015). Cette libération spontanée de NT qui a lieu en absence de stimulation et dans des synapses à faible probabilité de libération jouerait un rôle dans le développement synaptique, la plasticité neuronale, l'excitabilité et l'homéostasie synaptique (Fredj & Burrone, 2009; Ramirez *et al.*, 2012; Truckenbrodt & Rizzoli, 2014; Kavalali, 2015).

Comme mentionné plus haut, on peut distinguer les différents *pools* de vésicules synaptiques selon leur composition moléculaire. En effet, des niveaux élevés en VAMP7 sembleraient être un identifiant du RtP pendant que VGLUT1 et VAMP2 seraient présents préférentiellement dans le RP (Hua *et al.*, 2011b). Vti1a, protéine vésiculaire synaptique, est associée, elle, aux vésicules du *pool* spontané (Ramirez *et al.*, 2012; Revelo *et al.*, 2014).

De plus, une étude a montré qu'il y avait des changements d'expression des protéines synaptiques entre vésicules et que ces changements affectaient la composition des VSs en protéines et leur fonctionnement. En effet, les protéines VGLUT1, synaptotagmine 1 et la

proton ATPase montrent très peu de variation en nombre entre les VSs indiquant qu'elles sont groupées dans les VSs avec une très grande précision alors que l'apparent nombre de VAMP2/synaptobrevine 2, synaptophysine et synaptogyrine montre une grande variabilité (Mutch *et al.*, 2011). Il a été montré que le nombre de VGLUTs par vésicules serait compris entre 4 et 14 (Takamori *et al.*, 2006; Mutch *et al.*, 2011).

Un autre critère de classification des VSs est leurs interactions avec des protéines solubles. En effet, la synapsine, qui est une protéine soluble, semble sélectivement immobiliser le RtP (Orenbuch *et al.*, 2012) alors que DOC2, une autre protéine soluble, semble être un marqueur du pool spontané (Pang *et al.*, 2011).

Le processus d'exocytose est un processus très régulé (**Figure 5**). Ce processus met en jeu des protéines associées aux VSs, des protéines de la membrane plasmique ainsi que des protéines d'échafaudage. Elles forment des complexes qui s'assemblent et se désassemblent une fois l'exocytose effectuée et qui sont de suite prêts à participer à une nouvelle libération de VSs (Jahn & Fasshauer, 2012). L'arrimage des VSs implique les protéines Munc 13, Rab 3, les protéines RIM (*Rab3 Interacting Molecule*) ainsi que des protéines structurales comme Bassoon et Piccolo (Dulubova *et al.*, 2005; Muller *et al.*, 2012). Une fois arrimées, les vésicules passent ensuite dans un état « amorcé » puis suite à l'arrivée d'un PA, du calcium extracellulaire pénètre dans la cellule. Il est détecté par la synaptotagmine 1 (Syt1) qui est un senseur de calcium. La liaison de Ca^{2+} à Syt1 induit un changement de conformation de la protéine et favorise ainsi la fusion des VSs avec la membrane plasmique (Brose *et al.*, 1992; Fernandez-Chacon *et al.*, 2001; Yoshihara & Littleton, 2002; Bykhovskaia, 2015). La fusion des VSs fait intervenir le complexe SNARE (composé d'une v-SNARE dite VAMP ou synaptobrevine et deux t-SNARE, SNAP-25 et syntaxine) qui est un complexe de fusion membranaire intracellulaire conservé à travers l'évolution, les complexines et Munc 18 (Martens *et al.*, 2007; Brose, 2008; Ma *et al.*, 2011; Sudhof & Rizo, 2011; Jahn & Fasshauer, 2012). Les protéines SNARE donnent l'énergie nécessaire à l'étape de fusion des bicouches lipidiques (Tareste *et al.*, 2008).

Une fois le NT libéré dans la fente synaptique, les VSs sont recyclées par endocytose. Le taux d'endocytose dépend du taux d'exocytose (Balaji & Ryan, 2007). Avant formation d'une VS, les protéines destinées à être internalisées sur la même vésicule doivent être regroupée dans une petite zone de la membrane plasmique.

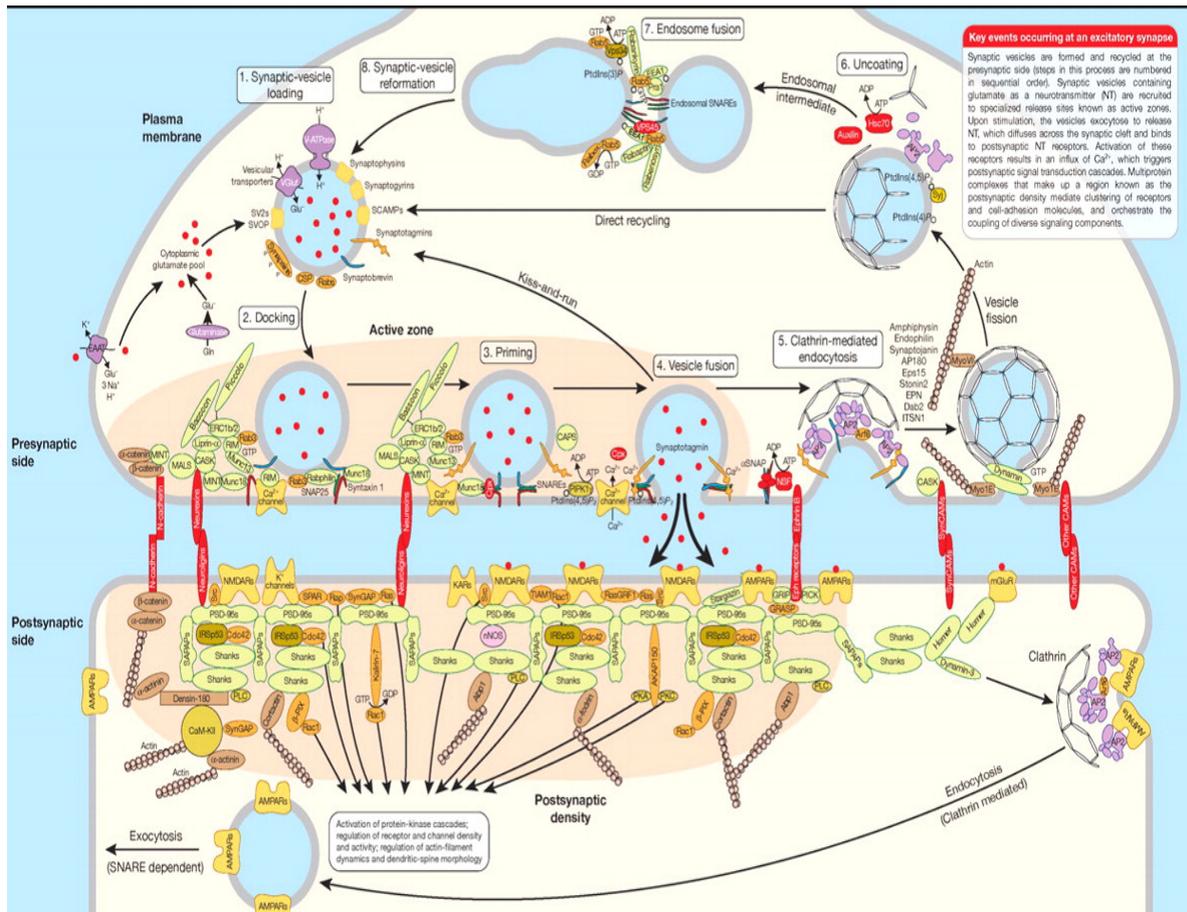


Figure 5. Molécules impliquées dans le cycle vésiculaire.

Les étapes clés dans la neurotransmission d'une synapse excitatrice incluent le chargement de la vésicule en NT (1), qui est suivi par l'arrimage (2) et la mise dans un état « amorcé » des vésicules (3) puis la fusion avec la membrane plasmique suite à l'arrivée d'un PA et d'une entrée de Ca²⁺ (4). Après libération du NT dans la fente synaptique, la vésicule va être recyclée soit directement (*kiss-and-run*) soit par endocytose par la voie clathrine-dépendante (5) avec formation d'un manteau de clathrine. Ce dernier est ensuite retiré (6). La vésicule fusionne avec l'endosome (7). Dans l'épine dendritique, la PSD recrute les récepteurs et les molécules participant à la cascade de signalisation initiée par la libération de glutamate (d'après Chua et al., 2010).

Quatre voies d'endocytose qui diffèrent par leur vitesse et les composants moléculaires mis en jeu ont été décrites : 1) le « *kiss-and-run* », 2) l'ultra rapide endocytose (*ultra-fast endocytosis*), 3) la voie clathrine-dépendante (*Clathrin-mediated endocytosis*, CME) et 4) la « *bulk endocytosis* » (Figure 6).

Le « *kiss-and-run* » exo- et endocytose a lieu directement dans la ZA et consiste en l'ouverture transitoire et en la rapide fermeture d'un pore de fusion (Figure 6A). La vésicule ne fusionne pas totalement avec la membrane plasmique et garde toute son intégrité. La VS est prête à être réutilisée (Ceccarelli et al., 1972; Pyle et al., 2000; Harata et al., 2006; Alabi & Tsien, 2013).

L'ultra rapide endocytose consiste en une fusion rapide, totale de la VS avec la membrane plasmique ; les VSs étant récupérées rapidement par des invaginations endocytiques avec ou sans formation de manteau de clathrine (**Figure 6C**) (Watanabe *et al.*, 2013; Watanabe *et al.*, 2014).

La CME est la voie la plus utilisée. Il y a formation de puits recouverts de clathrine (CCP) qui sont responsables de l'internalisation des molécules. Les CCP s'invaginent jusqu'à l'obtention d'une vésicule (CCV). Une fois le manteau de clathrine enlevé, la VS intègre le RtP (**Figure 6B**). Ce mécanisme se passe en une dizaine de secondes. Cette voie fait intervenir des protéines adaptatrices (*clathrin associated cargo adaptor complex*) comme AP2 qui reconnaissent spécifiquement des motifs dans les régions cytoplasmiques des protéines à endocyter. Certains de ces motifs ont été identifiés comme sur VGLUT1 (motif « *dileucine-like* » et un domaine riche en proline PRPPPP) et sur Syt 1 (Maycox *et al.*, 1992; Brodsky *et al.*, 2001; Blondeau *et al.*, 2004; De Gois *et al.*, 2006; Granseth *et al.*, 2006; Vinatier *et al.*, 2006; Voglmaier *et al.*, 2006; McMahon & Boucrot, 2011). Il semblerait que la CME puisse passer par la formation d'endosomes (Takei *et al.*, 1996; Kasproicz *et al.*, 2014; Jahne *et al.*, 2015).

Enfin, les VSs peuvent être récupérées par la « *bulk endocytosis* » qui a lieu dans la zone distale de la ZA en réponse à des stimulations fortes et répétées (Richards *et al.*, 2000; Cheung & Cousin, 2013). Cette voie d'endocytose passe par la création de grandes vacuoles qui peuvent former des endosomes (**Figure 6D**) (Heerssen *et al.*, 2008; Kononenko *et al.*, 2014; Watanabe *et al.*, 2014).

Le fait d'avoir différentes voies de recyclage pourrait expliquer l'existence de VSs avec une composition en protéines différentes. Il est intéressant de noter que les voies d'endocytose rapide et lente peuvent déterminer si la VS va plutôt aller respectivement dans le RRP ou le RtP (Richards *et al.*, 2000; Paillart *et al.*, 2003).

Le recyclage de VGLUT1 peut s'effectuer par aux moins deux voies alternatives, une relativement rapide où VGLUT1 interagit avec l'endophiline A1 qui va recruter AP2 et donc utiliser la voie CME et une plus lente où VGLUT1 interagit avec AP3 et utiliser la voie « *bulk endocytosis* » où les VSs seront adressées au RtP (Scheuber *et al.*, 2006; Voglmaier *et al.*, 2006). De plus, il semblerait que VGLUT1 joue un rôle dans la stabilisation des VSs dans les terminaisons présynaptiques et améliorerait la tonicité de l'exocytose des VSs (Siksou *et al.*, 2013). Récemment, il a également été montré que VGLUT1 a une forte influence sur la cinétique de récupération de certaines protéines cargos lors de l'endocytose. Il jouerait donc

un rôle central dans le recyclage des VSs en coordonnant le recrutement de protéines cargos (Pan *et al.*, 2015).

Plusieurs aspects de l'endocytose des VSs restent encore incompris.

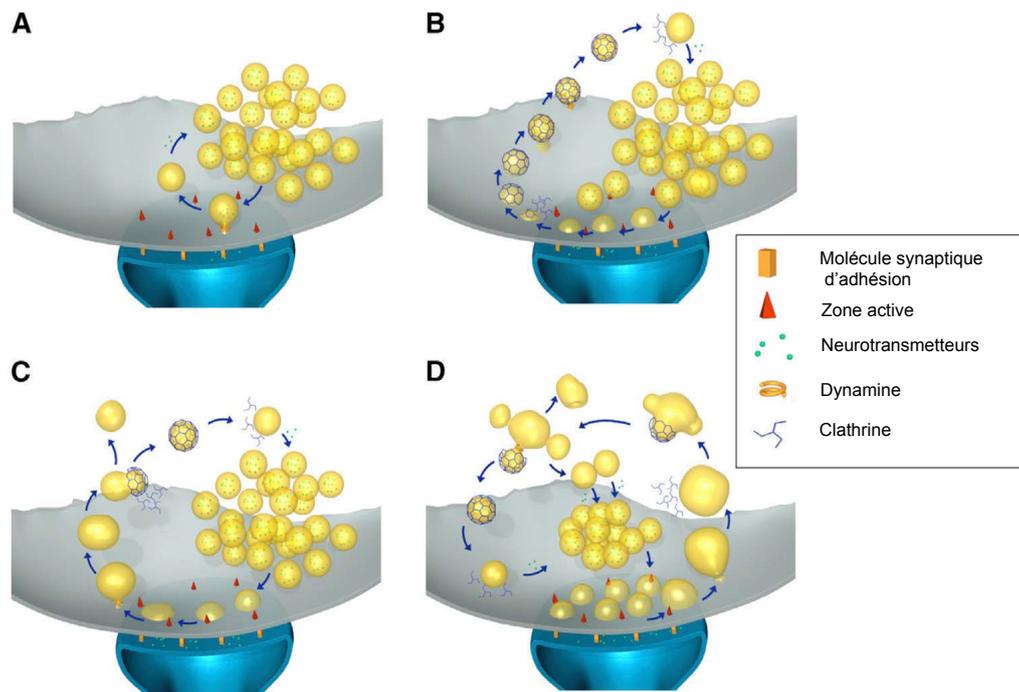


Figure 6. Les différentes voies d'endocytose.

(A) La voie « Kiss and Run ». La VS ne fusionne pas totalement avec la membrane plasmique. Un pore s'ouvre et se referme rapidement. Après la fermeture du pore, la VS se détache de la membrane plasmique et est directement réutilisée. (B) La voie classique clathrine-dépendante. La fusion de la VS avec la membrane plasmique est totale. Les composants de la VS sont par la suite récupérés directement de la surface cellulaire à travers la formation d'une vésicule avec un manteau de clathrine. Puis, ce manteau est enlevé et les VSs rentrent dans le RtP. (C) L'ultra rapide endocytose. La récupération des VSs après exocytose est rapide et se fait par des invaginations de la membrane plasmique avec ou sans formation de manteau de clathrine. (D) La voie « bulk endocytosis ». Des stimulations téaniques ou chimiques fortes causent la formation de larges structures endocytiques, qui vont ensuite devenir des VSs via des mécanismes clathrine-dépendants et/ou clathrine-indépendants (*d'après Kononenko et al., 2014*).

I.3.c. Transport des précurseurs et des vésicules synaptiques

Un neurone est une structure hautement polarisée. La plupart des protéines sont synthétisées dans le corps cellulaire et doivent donc être acheminées vers les différents compartiments neuronaux. Depuis plusieurs années, il a été démontré qu'il existait également une traduction locale d'ARNm pour certaines protéines (Yoon *et al.*, 2009; Di Liegro *et al.*, 2014). Le transport des protéines et le mouvement des VSs dans le neurone sont rendus possible grâce au cytosquelette et aux moteurs moléculaires. Les principales familles de moteurs moléculaires impliqués dans le transport intracellulaire sont les

kinésines, les dynéines et les myosines. Les kinésines (transport antérograde, vers le pôle positif des microtubules) et les dynéines (transport rétrograde, vers le pôle négatif des microtubules) sont responsables du transport sur de longues distances sur les microtubules. Les myosines assurent le transport de courte distance sur les filaments d'actine (Hirokawa & Takemura, 2005; Hirokawa *et al.*, 2009). Les précurseurs des VSs (SVPs) ainsi que les cargos transportant les composants de la zone active (Piccolo-bassoon *Transport Vesicles* ou PTVs) voyagent du corps cellulaire jusqu'à la terminaison synaptique sur les microtubules (Goldstein *et al.*, 2008). Durant le développement, les différents composants des VSs sont probablement transportés séparément et ensuite assemblés à la synapse à travers un endosome recyclé (Bonanomi *et al.*, 2006). Le transport des SVPs (comprenant des protéines vésiculaires synaptiques comme la synaptophysine et la synaptotagmine) à la terminaison synaptique est dépendant du moteur KIF1A et KIF1B de la famille de la kinésine 3. Celui de la membrane présynaptique ou des vésicules de la ZA se fait grâce à KIF5 de la famille des kinésine 1 (Hirokawa & Noda, 2008; Hirokawa *et al.*, 2009). La vitesse de transport du moteur KIF1 est d'environ 1,2 $\mu\text{m/s}$ faisant de lui l'un des plus rapide moteur antérograde (Okada *et al.*, 1995). Les dynéines ne fonctionnent qu'avec un complexe de protéines associées, la dynactine (Kardon & Vale, 2009). Les cargos utilisent des protéines adaptatrices (comme AP1 ou mLin10) pour se connecter au bon moteur moléculaire (Hirokawa & Noda, 2008). La balance entre un transport antérograde ou rétrograde ainsi que l'accrochage ou la libération des cargos semblent être régulés par phosphorylation (Hirokawa *et al.*, 2009). Une fois le cargo arrivé près de sa destination synaptique, il passe d'un transport sur microtubules par la dynéine ou la kinésine à un transport sur filaments d'actine par la myosine (Schroeder *et al.*, 2010). Il existe 35 classes de myosine, trois d'entre elles ont des fonctions synaptiques (myosines II, V et VI). La myosine II est impliquée dans la mobilité des VSs dans la ZA, en participant à la libération évoquée par un PA des vésicules (Peng *et al.*, 2012). Contrairement à la myosine II, les myosines V et VI semblent agir comme des transporteurs de cargos et participer à la mobilité des VSs à la synapse (Takamori *et al.*, 2006; Kneussel & Wagner, 2013). Il a été montré que la myosine VI participe à l'endocytose médiée par la clathrine (CME) en transportant les vésicules vers l'endosome (Aschenbrenner *et al.*, 2004).

I.4. Les différentes familles des transporteurs vésiculaires

L'accumulation du NT dans les VSs est au cœur de la transmission chimique. Cette étape est rendue possible grâce aux transporteurs vésiculaires. En théorie, il est communément admis que les transporteurs vésiculaires déterminent le niveau de

remplissage des VSs en neurotransmetteurs. Ces transporteurs vésiculaires des NT assurent donc une étape clé dans la neurotransmission. La modification du nombre de transporteurs vésiculaires et leur activité seraient donc des outils puissants de régulation de la neurotransmission (Song *et al.*, 1997; Williams, 1997; Daniels *et al.*, 2004; Wojcik *et al.*, 2004; Moechars *et al.*, 2006; Edwards, 2007; Daniels *et al.*, 2011). Le transport vésiculaire des neurotransmetteurs a été initialement caractérisé biochimiquement à l'aide de préparations de VSs cérébrales (pour revue (Gasnier, 2000)).

Ces transporteurs appartiennent à une famille de protéines membranaires de transport appelée *Solute Carriers* (SLC), constituée de 300 protéines organisées en 51 familles (Hediger *et al.*, 2013). Jusqu'à présent, treize transporteurs vésiculaires ont été identifiés et classés en trois familles (SLC17, SLC18, SLC32) en fonction de leur substrat et de leur similarité de séquence (Omote *et al.*, 2011). SLC17, SLC18 et SLC32 assurent, respectivement, l'accumulation vésiculaire de neurotransmetteurs de type anionique, cationique ou neutre (**Tableau 3**) (Reimer, 2013). De plus, outre la spécificité de substrat, les trois familles de transporteurs diffèrent par des forces motrices et des modes de régulation différents. Les transporteurs SLC17 et SLC18 appartiennent à la super-famille des « *Major Facilitator Super-families* » ou MFS. Cette super-famille est présente dans l'ensemble du vivant et regroupe tous les transporteurs actifs secondaires, soit plus de 3600 protéines (Reddy *et al.*, 2012). Les SLC32 appartiennent à la super-famille des « *Amino acid/Polyamine/organoCation* » ou APC (Wong *et al.*, 2012).

Les transporteurs vésiculaires sont des transporteurs secondaires. Leur activité dépend de l'existence d'un gradient de protons généré par l'ATPase vacuolaire (V-ATPase) présente sur les vésicules synaptiques. La V-ATPase utilise l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP en ADP pour accumuler les ions H^+ dans les VSs créant ainsi un fort gradient électrochimique ($\Delta\mu H^+$) et acidifiant la VS. Ce gradient de proton entre le cytoplasme et la lumière vésiculaire peut être divisé en deux composantes : le gradient de pH (ou ΔpH), dû à l'acidification des VSs et le gradient électrique (ou $\Delta\Psi$) lié au nombre de charges positives dans la VS. Ces deux gradients peuvent être modulés par la perméabilité aux ions chlore de la VS. L'activité des transporteurs vésiculaires des NT dépend de ces deux composantes (ΔpH ou $\Delta\Psi$) du gradient électrochimique (**Tableau 3**) (Reimer *et al.*, 2001; Omote *et al.*, 2011).

Tableau 3. Caractéristiques des transporteurs vésiculaires des neurotransmetteurs.

Nom du gène	Nom du transporteur	Substrats	Dépendance Mode de transport
SLC17A1	NPT1	Anions organiques, Phosphate, Chlorure	$\Delta\psi$; dépendant du Cl^-
SLC17A2	NPT3	Non connu	Non connu
SLC17A3	NPT4	Anions organiques	$\Delta\psi$
SLC17A4	NPT homologue cotransporteur	Non connu	Non connu
SLC17A5	Transporteur Vésiculaire des Acides aminés Excitateurs (VEAT/Sialine)	Acide sialique, Glutamate, Aspartate	$\Delta\psi$, uniport
SLC17A6	Transporteur Vésiculaire du Glutamate 2 (VGLUT2)	Glutamate	$\Delta\psi > \Delta\text{pH}$ Uniport, antiport ?
SLC17A7	Transporteur Vésiculaire du Glutamate 1 (VGLUT1)	Glutamate	$\Delta\psi > \Delta\text{pH}$ Uniport, antiport ?
SLC17A8	Transporteur Vésiculaire du Glutamate 3 (VGLUT3)	Glutamate	$\Delta\psi > \Delta\text{pH}$ Uniport, antiport ?
SLC17A9	Transporteur Vésiculaire de Nucléotide (VNUT)	ATP	$\Delta\psi > \Delta\text{pH}$ Uniport, antiport ?
SLC18A1	Transporteur Vésiculaire de Monoamine 1 (VMAT1)	Adrénaline, sérotonine, noradrénaline, dopamine, histamine	$\Delta\text{pH} > \Delta\psi$ Antiport $2\text{H}^+/\text{NT}$
SLC18A2	Transporteur Vésiculaire de Monoamine 2 (VMAT2)	Adrénaline, sérotonine, noradrénaline, dopamine, histamine	$\Delta\text{pH} > \Delta\psi$ Antiport $2\text{H}^+/\text{NT}$
SLC18A3	Transporteur Vésiculaire d'AcétylCholine (VACHT)	Acétylcholine	$\Delta\text{pH} > \Delta\psi$ Antiport $2\text{H}^+/\text{NT}$
SLC32A1	Transporteur Vésiculaire de GABA ou d'Acides Aminés Inhibiteurs (VGAT ou VIAAT)	GABA, glycine	$\Delta\psi > \Delta\text{pH}$ Cl^- cotransport

La famille des SLC17 est impliquée dans le transport vésiculaire de neurotransmetteurs anioniques. Cette famille est composée de neuf membres (**Figure 7** et **tableau 3**) :

- les trois transporteurs vésiculaires du glutamate (VGLUT1-3) codés, respectivement, par les gènes *Slc17a7*, *Slc17a6*, *Slc17a8* (Takamori *et al.*, 2000; El Mestikawy *et al.*, 2011) (voir chapitre II et III).

- le cotransporteur d' H^+ et d'acide sialique (ou Sialine) (Verheijen *et al.*, 1999) également appelé transporteur vésiculaire d'acides aminés excitateurs (VEAAT) codé par le gène

Slc17a5 (Miyaji *et al.*, 2008). La sialine transporte l'acide sialique lysosomal et véhiculerait également le glutamate et l'aspartate qui joueraient le rôle de neurotransmetteur (Miyaji *et al.*, 2011). Cependant, le rôle de neurotransmetteur pour l'aspartate est, à l'heure actuelle, controversé (Herring *et al.*, 2015).

- les transporteurs phosphate sodium-dépendant (NPT1, NPT3, NPT4 et NPT homologue) qui sont dédiés au transport d'anions organiques pour l'élimination rénale des xénobiotiques. Ils sont codés par les gènes *Slc17Aa1*, *Slc17a2*, *Slc17a3*, *Slc17a4* respectivement (Reimer, 2013).

- le transporteur vésiculaire de nucléotides (VNUT) qui permet l'incorporation de l'ATP dans les vésicules de stockage. En effet, l'ATP est reconnu comme neurotransmetteur de la signalisation purinergique (Sawada *et al.*, 2008; Nishida *et al.*, 2014).

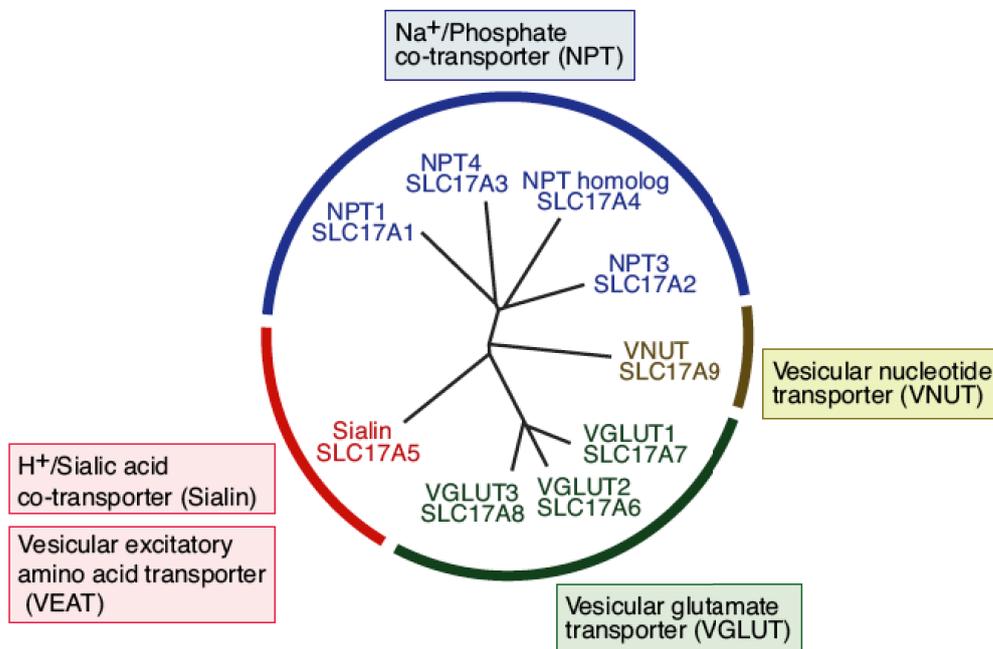


Figure 7. Arbre phylogénétique des transporteurs de la famille SLC17.
(d'après Miyaji *et al.*, 2008)

Les transporteurs de la famille des SLC18 permettent l'accumulation vésiculaire de neurotransmetteurs cationiques comme l'acétylcholine, la sérotonine, la dopamine, l'adrénaline et la noradrénaline (**Tableau 3**) (Parsons, 2000; Eiden *et al.*, 2004). Cette famille est composée de trois membres : les transporteurs vésiculaires de monoamine de type 1 et 2 (VMAT1-2 ; gènes *Slc18a1* et *Slc18a2* respectivement) et le transporteur vésiculaire de l'acétylcholine (VACHT ; gène *Slc18a3*). VMAT1 et VMAT2 ont une distribution différente. VMAT1 est principalement exprimé dans les cellules endocrines périphériques des glandes surrénales alors que VMAT2 est principalement exprimé dans les neurones aminergiques du

SNC. Un autre transporteur appelé *portabella* (*prt* ; gène *Slc18a4*) a été découvert chez la drosophile mais son substrat est encore inconnu (Brooks *et al.*, 2011; Lawal & Krantz, 2013).

La famille des SLC32 permet le transport de substrats électriquement neutres tels que le GABA et la glycine (**Tableau 3**). Cette famille comprend seulement, à l'heure actuelle, le transporteur vésiculaire du GABA et de la glycine (appelé VGAT ou VIAAT, pour transporteur vésiculaire d'acides aminés inhibiteurs) (McIntire *et al.*, 1997; Sagne *et al.*, 1997). Le transport de GABA dans la VS nécessite le cotransport d'ions Cl⁻ (Juge *et al.*, 2009).

II. Les transporteurs vésiculaires du glutamate

II.1. Découverte des VGLUTs

Le glutamate a d'abord été identifié comme neurotransmetteur excitateur il y a une trentaine d'années (Fonnum, 1984). Puis son transport dans les VSs a été mis en évidence par des méthodes biochimiques (Disbrow *et al.*, 1982). Enfin, trois transporteurs vésiculaires du glutamate (VGLUT1-3) ont été identifiés et caractérisés moléculairement il y a une dizaine d'années (pour revue voir (El Mestikawy *et al.*, 2011)). VGLUT1-3 sont très conservés au niveau structurel et fonctionnel et permettent l'accumulation proton-dépendante du glutamate dans les VSs.

En 1994, Ni et collaborateurs découvrent un gène régulé positivement après un traitement avec un analogue du glutamate, le NMDA, dans une culture primaire de cellules granulaires de cervelet de rat (Ni *et al.*, 1994). La protéine codée par ce gène semblait responsable du transport du phosphate inorganique de façon dépendante du sodium. Son expression dans le cerveau était restreinte à un certain nombre de neurones corticaux. Pour ces raisons, la protéine a été appelée transporteur de phosphate inorganique dépendant du sodium (BNPI) (Ni *et al.*, 1994). En 1998, il a été montré que BNPI était associé aux VSs au niveau des terminaisons présynaptiques glutamatergiques, suggérant ainsi un rôle présynaptique pour BNPI (Bellocchio *et al.*, 1998). Un an plus tard, il est rapporté que des mutations dans EAT-4 (orthologue de BNPI chez la drosophile) causent des déficits dans la transmission glutamatergique. Ces observations confirment donc l'implication de cette protéine dans le fonctionnement de la transmission glutamatergique (Lee *et al.*, 1999). Finalement, en 2000, deux articles sortis indépendamment décrivent le rôle de BNPI dans le transport vésiculaire du glutamate et le renomme Transporteur Vésiculaire du Glutamate 1 (VGLUT1) (Bellocchio *et al.*, 2000; Takamori *et al.*, 2000).

En parallèle, un deuxième transporteur de phosphate inorganique dépendant du sodium, appelé DNPI (pour *differentiation-associated Na⁺ /P_i cotransporter*) et présentant 82% d'homologie avec VGLUT1 est identifié (Aihara et al., 2000). En 2001, plusieurs groupes montrent que DNPI est associé à des vésicules synaptiques dans les terminaisons nerveuses glutamatergiques et qu'il transporte le glutamate avec les mêmes caractéristiques que VGLUT1. Il est donc renommé VGLUT2 (Bai et al., 2001; Fremeau et al., 2001; Herzog et al., 2001; Takamori et al., 2001; Varoqui et al., 2002).

En 2002, un troisième transporteur est identifié et appelé VGLUT3 (Fremeau et al., 2002; Gras et al., 2002; Schafer et al., 2002; Takamori et al., 2002). Il se différencie peu de VGLUT1 et VGLUT2 au niveau structurel et fonctionnel. Par contre, il présente une distribution tout à fait surprenante, en étant présent dans des neurones décrits préalablement comme non glutamatergiques (Gras et al., 2002; Herzog et al., 2004).

Les VGLUTs sont des marqueurs spécifiques des neurones glutamatergiques. En effet, leur expression suffit pour conférer un phénotype glutamatergique aux neurones (Takamori et al., 2000; Takamori et al., 2002). D'autre part, le clonage et l'identification de ces trois VGLUTs ont radicalement changé la perception de la neurotransmission glutamatergique puisqu'ils mettent en évidence d'une part une hétérogénéité et une complexité insoupçonnées des systèmes glutamatergiques et d'autre part la potentialité d'une cotransmission impliquant deux neurotransmetteurs classiques.

II.2. Structure membranaire/tridimensionnelle des VGLUTs

La séquence protéique des trois VGLUTs présente un fort pourcentage d'identité, supérieur à 70% entre les trois isoformes d'une même espèce (Gras et al., 2002). Les domaines transmembranaires des VGLUTs ont une forte homologie, d'environ 90% tandis que les régions N- et C-terminales ont peu d'homologie entre elles (17% et 2% respectivement) (**Figure 8**). Elles contribuent donc aux différences fonctionnelles. L'homologue le plus proche dans la famille SLC17 est le transporteur sialine (environ 40% d'identité de séquence et 60% de similarité).

```

VGLUT3 MPFNAFDTFKER I I KPGKEGVKNVGLSLGII QF MIDGTNEEGDATELSE EGRPVCT SRAFAPVCDGSCCCI PKRYITAV 80
VGLUT2 M-----E SVKQR I I APGKEGKKNFAGKSLGQIYR VLEKKNCDNRETIEL I EDGRF LEVPEKRAPI CDCTCFGLPRRYIIAI 75
VGLUT1 M-----E FRC-----E EFRKLAGRALGR I E ILEKRFQGAET IELS ADGRPV I I THTRDE PV V DCTCFGLPRRYIIAI 67

VGLUT3 MSGLGFCISFGIRCNLGVAV I E MVNNS I VYVD G R PEI C I AQFNWDPETVGLIHGSFFWGY I V TQIPGGF I SN KFAANRVF 160
VGLUT2 MSGLGFCISFGIRCNLGVAV I E MVNNS I I HRGKVIKEKAKFNWDPETVGM I HGSFFWGY I I TQIPGGY I ASRI I AANRVF 155
VGLUT1 MSGLGFCISFGIRCNLGVAV I E MVNNS I I HRGGE V VV QKAQFNWDPETVGLIHGSFFWGY I V TQIPGGF I CC KFAANRVF 147

VGLUT3 GAA I FLTSTLNI I I P S A A R V H Y G C V M C V R I L Q L G L V E G V T Y P A C H G I W S K W A P P L E R S R L A T T S F C G S Y A G A V V A M P L A G V 240
VGLUT2 GAA I I L T S T L N M L I P S A A R V H Y G C V I F V R I L Q L G L V E G V T Y P A C H G I W S K W A P P L E R S R L A T T S F C G S Y A G A V I A M P L A G I 235
VGLUT1 G F A I V T S T L N M L I P S A A R V H Y G C V I F V R I L Q L G L V E G V T Y P A C H G I W S K W A P P L E R S R L A T T A F C G S Y A G A V V A M P L A G V 227

VGLUT3 LVQY I G W A S V F Y I Y G M F G I I W Y M F W L I Q A Y E C P A V H P T I S N E E R T Y I E I S I G E C A N I - A S L S K F N T P W R R F F T S I P V Y A I 319
VGLUT2 LVQY I G W S S V F Y V Y G S F G M V W Y M F W L L V S Y E S P A K H P T I I L E E R F Y I E E S I G E S A N I L G A M E K E F T P W R K F F T S M P V Y A I 315
VGLUT1 LVQY I G W S S V F Y V Y G S F G I F W I T F W L L V S Y E S P A I H F S I S E E E R K Y I E D A I G E S A K I M N P V T K F N T P W R R F F T S M P V Y A I 307

VGLUT3 I V A N F C R S W T F Y L L I S Q P A Y F E E V F G F A I S K V G L L S A V P H V M T I V V P I G G Q I A L Y L R S E K I I I T T A V R K I M N C G G F G M 399
VGLUT2 I V A N F C R S W T F Y L L I S Q P A Y F E E V F G F E I S K V G L S A V P H L V M T I I V P I G G Q I A D F L R S K C I L S T T I V R K I M N C G G F G M 395
VGLUT1 I V A N F C R S W T F Y L L I S Q P A Y F E E V F G F E I S K V G L V S A I P H L V M T I I V P I G G Q I A D F L R S E I M S T T V R R K I M N C G G F G M 387

VGLUT3 E A T L L L V V G F S H T K G V A I S F L V L A V G F S G F A I S G F N V N H L D I A P R Y A S I L M G I S N G V G T L S G M V C P I I V G A M T K H K T R E E 479
VGLUT2 E A T L L L V V G Y S H T R G V A I S F L V L A V G F S G F A I S G F N V N H L D I A P R Y A S I L M G I S N G V G T L S G M V C P I I V G A M T K R S R E E 475
VGLUT1 E A T L L L V V G Y S F S K G V A I S F L V L A V G F S G F A I S G F N V N H L D I A P R Y A S I L M G I S N G V G T L S G M V C P I I V G A M T K H K T R E E 467

VGLUT3 W C N V F L I A A L V H Y S G V I F Y G V F A S G E K Q I W A D P E N I S E E K C G I I D C D E L A E T E L N H E A F V S P R K K M - - - - S Y G A T I C N 554
VGLUT2 W Q Y V F L I A A L V H Y G G V I F Y A I F A S G E K Q P W A D P E E T S E E K C G F I H E D E L D E E T G D I T O N Y I N Y G T K - - - - S Y G A T S C E 550
VGLUT1 W Q Y V F L I A S L V H Y G G V I F Y G V F A S G E K Q P W A P E E M S E E K C G F V G H L Q L A G S D E S E M E D E V E F P G A P P A P P F S Y G A T H S T 547

VGLUT3 CEVQKTDRRQQFESA F E G - E E P I S Y Q N E E D E S E T S 589
VGLUT2 N G G W P N G W E K K E E F V Q E S A Q D A Y S Y K D R I D Y S 582
VGLUT1 V Q P P R P P P P - - - - - - - - - - - - - - - - V F D Y 560

```

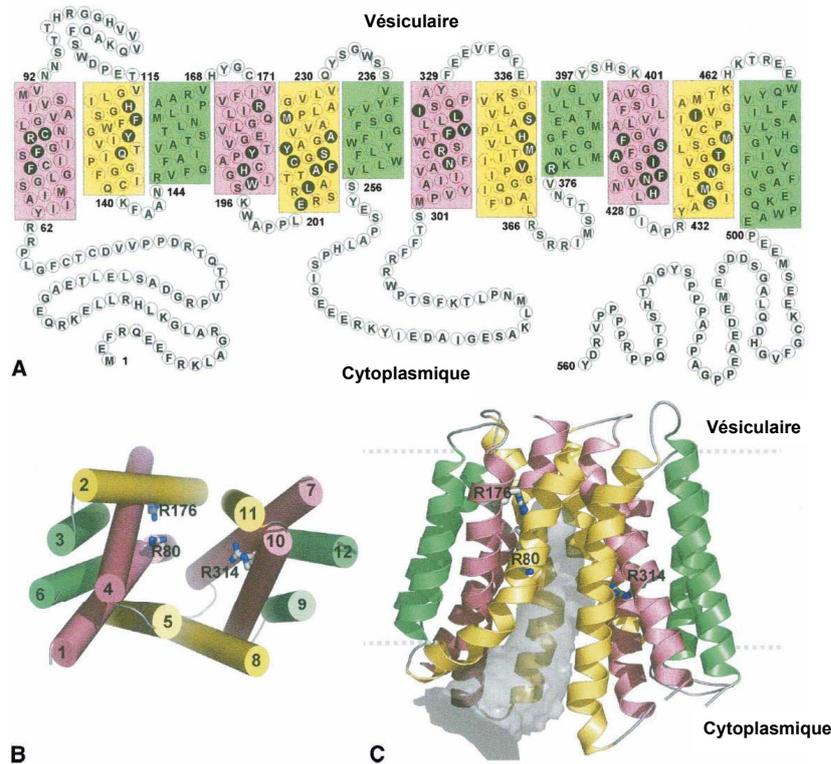
?

Figure 8. Alignement des séquences d'acides aminés de VGLUT1, VGLUT2, VGLUT3 de rat.

Les trois protéines sont hautement conservées dans leur partie centrale. Les lettres surlignées en noir indiquent les résidus identiques (d'après Gras *et al.*, 2002).

Il semblerait que le gène codant les VGLUTs soit très conservé dans l'évolution. En effet, de multiples isoformes de VGLUTs ont été identifiées dans plusieurs organismes de différentes branches de l'arbre phylogénétique, *i.e.*, la droshophile (Daniels *et al.*, 2004), le poisson zèbre (Higashijima *et al.*, 2004a; Higashijima *et al.*, 2004b), la grenouille (Gleason *et al.*, 2003) ou le nématode *Caenorhabditis elegans* (Lee *et al.*, 1999).

La structure 3D des VGLUTs est encore inconnue à ce jour puisqu'ils n'ont pas été cristallographiés. Cependant, des modèles 3D putatifs des VGLUTs ont été générés à partir de la structure cristallographique du transporteur du glycerol-3-phosphate de la bactérie *Escherichia Coli* (ou GlpT), un distant orthologue bactérien des VGLUTs (Huang *et al.*, 2003). Almqvist et collaborateurs ont montré que les VGLUTs seraient composés de 12 domaines transmembranaires (Almqvist *et al.*, 2007). Leur structure serait symétrique puisqu'elle serait formée de deux groupes de six hélices transmembranaires reliés par une longue boucle cytoplasmique (Almqvist *et al.*, 2007). Le modèle 3D présenterait une conformation close du côté de la lumière vésiculaire et une ouverture accessible à l'eau et à d'autres substrats du côté cytoplasmique (Figure 9).



?

Figure 9. Structure 3D du VGLUT1 humain obtenue par homologie.

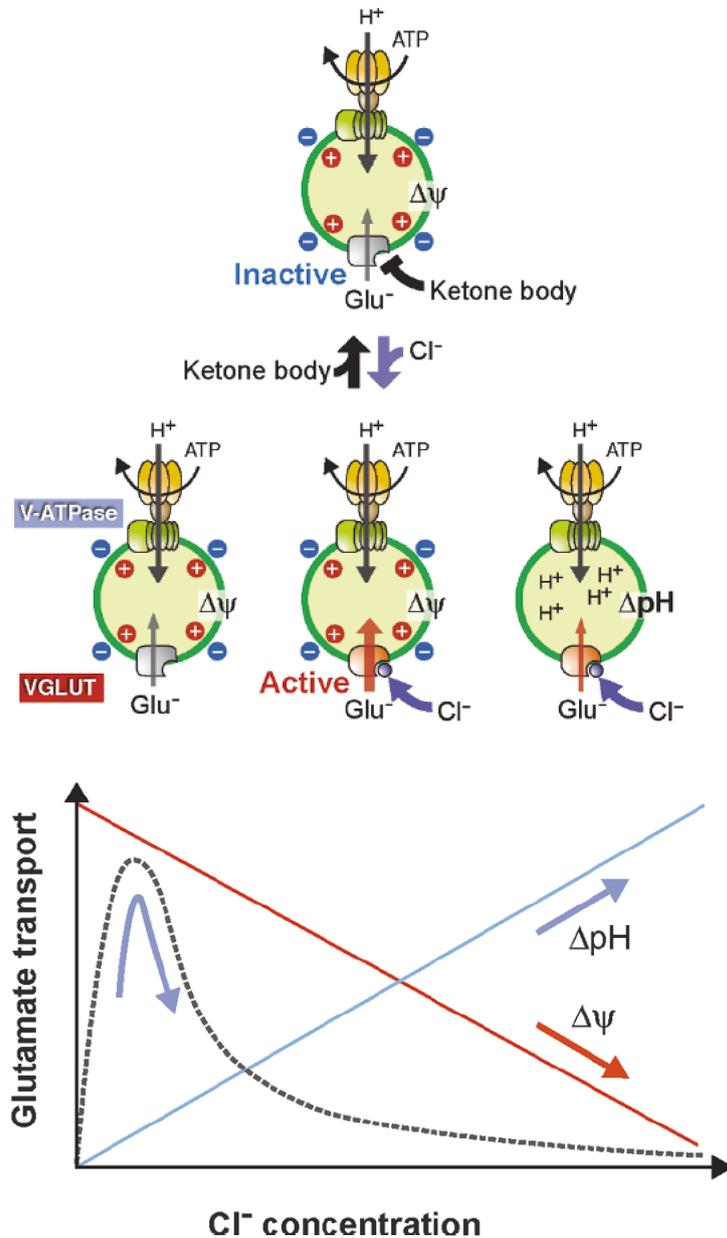
(A) Topologie proposée de VGLUT1 avec 12 domaines transmembranaires (colorés). (B) Vue des hélices transmembranaires depuis le cytoplasme. Les groupes d'hélices 1 à 6 et 7 à 12 sont disposés de façon symétrique. (C) Le pore est ouvert du côté cytoplasmique, représenté par le volume gris (d'après *Almqvist et al., 2007*).

II.3. Propriétés biochimiques et pharmacologiques des VGLUTs

Le transport du glutamate présente des caractéristiques bioénergétiques différentes de celles des monoamines, de l'acétylcholine ou du GABA. En effet, contrairement aux transporteurs VMATs et VACHTs, les VGLUTs dépendent essentiellement du gradient électrique ($\Delta\psi$) plutôt que du gradient de pH (ΔpH) (Naito & Ueda, 1985; Maycox *et al.*, 1988). Les trois VGLUTs possèdent des activités de transport similaires. Ils ont une affinité pour le glutamate de l'ordre de 1 à 5 mM. Cette affinité est relativement faible si on la compare aux autres transporteurs du glutamate comme les EAATs (de l'ordre de $K_m \sim 4\text{-}40 \mu\text{M}$) (Reimer *et al.*, 2001). Malgré cette faible affinité pour le glutamate, les VGLUTs sont très sélectifs pour le glutamate et ne reconnaissent ni l'aspartate, ni le GABA, ni la glutamine ou autres neurotransmetteurs. Cette exclusivité de substrat n'est d'ailleurs pas retrouvée chez les autres membres de la famille des SLC17.

Une caractéristique importante du transport vésiculaire du glutamate est sa dépendance biphasique au chlore extravésiculaire qui a été caractérisée sur des préparations de vésicules synaptiques ou des membranes contenant des VGLUTs hétérologues (Naito & Ueda, 1985; Bellocchio *et al.*, 2000; Bai *et al.*, 2001; Fremeau *et al.*, 2001; Varoqui *et al.*, 2002). A faible concentration en chlorure, le transport du glutamate est négligeable. En revanche, lors de l'augmentation de la concentration en ions Cl^- , le transport du glutamate est activé et l'activité maximale est atteinte pour une concentration en chlore de 4 mM. Au-dessus de cette concentration, le transport décroît jusqu'à être inhibé à cause de l'effondrement du $\Delta\psi$ (**Figure 10**) (Maycox *et al.*, 1988; Omote *et al.*, 2011). Le mécanisme provoquant l'inhibition du transport par des fortes concentrations en chlore est bien compris. Par contre, celui sous-jacent l'activation du transport de glutamate par une faible concentration en ions Cl^- (< 4 mM) est encore débattu. Deux hypothèses ont été émises par Chaudry *et al.*, (Chaudry *et al.*, 2008) pour expliquer le mécanisme permettant l'augmentation de recapture du glutamate. Elle serait soit due à un afflux important d'ions Cl^- dans la vésicule, soit il existerait un site allostérique aux anions sur les VGLUTs sur lequel les ions Cl^- viendraient se fixer. Des études sur des préparations de protéines purifiées reconstituées dans des liposomes ont obtenu des résultats contraires. Il a d'abord été montré la présence sur les VSs d'un canal chlore CLC-3 jouant le rôle de régulateur du ΔpH vésiculaire (Xie *et al.*, 1989) mais des études ont montré que la dépendance biphasique aux ions Cl^- est maintenue en l'absence de CLC-3 (Stobrawa *et al.*, 2001). L'existence d'une conductance au chlore dans des protéoliposomes contenant des VGLUTs a également été rapportée ainsi que la stimulation de la recapture de glutamate par le chlore intracellulaire. Les auteurs ont proposé que lorsque la concentration vésiculaire en Cl^- augmentait, les VGLUTs passaient d'un mode H^+ antiport à un mode Cl^- antiport (Schenck *et al.*, 2009).

Au contraire, un autre modèle de transport des chlorures a été proposé par Juge *et al.*, en 2010 (Juge *et al.*, 2010). Ils ont purifié VGLUT1 et l'ont incorporé dans des protéoliposomes pour que la cinétique du transport du glutamate devienne dépendante d'un seul composant. Dans cet essai, le gradient ionique est obtenu par addition de valinomycine et de K^+ -acétate. Ce modèle suggère que l'activité des VGLUTs est régulée par une liaison directe des ions Cl^- aux VGLUTs. Cette régulation par les ions chlorures est spécifique de la famille des SLC17 puisqu'elle n'est pas observée avec VMAT1-2 (Juge *et al.*, 2010). La stimulation des VGLUTs par les ions Cl^- est inhibée par les corps cétoniques qui sont des intermédiaires métaboliques de la glycolyse et qui rentrent directement en compétition avec les ions Cl^- (Juge *et al.*, 2010). Ce modèle permettrait ainsi d'expliquer l'effet neuroprotecteur des régimes cétoniques qui sont utilisés dans le traitement des épilepsies (**Figure 10**) (Vining, 1999).



?

Figure 10. Dépendance et régulation du transport de glutamate par les ions chlore.

Les ions Cl⁻ régulent le transport de glutamate en contrôlant le ΔpH et l'activité des VGLUTs. Une faible concentration de Cl⁻ active les VGLUTs alors qu'ils sont inhibés par une forte concentration à cause de la perte de force motrice. En effet, l'augmentation de la concentration en Cl⁻ provoque une augmentation de ΔpH et une diminution de Δψ. Les corps cétoniques (*ketone body*) inactivent les VGLUTs en empêchant le chlore de se lier (d'après Omote *et al.*, 2011).

La compréhension de l'effet du chlore sur les VGLUTs est assez complexe et reste encore débattue (Omote *et al.*, 2011).

Au moment de leur identification moléculaire, les premiers VGLUTs ont été caractérisés comme étant des transporteurs de phosphate inorganique. Les premières études menées sur VGLUT2 suggéraient une activité de transport de phosphate inorganique

Na⁺-dépendante. Contrairement au transport de glutamate qui nécessite des ions chlorures, le transport de phosphate est indépendant de ces ions. Ainsi, selon certains auteurs, les VGLUTs possèderaient une double machinerie de transport :

- la première, dépendante du $\Delta\psi$ et des ions chlore pour le transport de glutamate,
- la seconde, dépendante des ions sodium pour le transport de phosphate inorganique.

Cette multifonctionnalité serait une des caractéristiques des transporteurs de la famille des SLC17 (Juge *et al.*, 2006).

Récemment, une étude a proposé un modèle de transport qui prendrait en compte au moins en partie l'ensemble de ces données (Preobraschenski *et al.*, 2014). Les auteurs ont utilisé deux systèmes :

- des protéoliposomes contenant VGLUT1 et la V-ATPase
- des protéoliposomes reconstitués avec la V-ATPase qu'ils ont fusionné à des VSs purifiées, grâce à la machinerie SNARE.

Leurs données suggèrent que le Cl⁻ peut être transporté par les VGLUTs puisqu'ils ont observé une acidification dépendante du Cl⁻ et un efflux de chlore dans des liposomes contenant seulement VGLUT et une V-ATPase. De plus, à cause des interférences observées avec des concentrations élevées en glutamate, il semblerait que le Cl⁻ rentrerait en compétition avec le site de liaison du glutamate. Preobraschenski *et al.*, (2014) propose donc un modèle dans lequel les VGLUTs auraient trois sites de liaison : un pour les cations et deux pour les anions. La localisation de ces sites est inconnue et leurs interactions sont très peu comprises mais le degré de plasticité fonctionnelle montré par les VGLUTs est unique. En plus de sa fonction canonique comme transporteur du glutamate, ces transporteurs changeant permettent le mouvement découplé du Cl⁻, l'échange K⁺/H⁺ et le transport de phosphate dépendant du Na⁺ (Accardi, 2014; Preobraschenski *et al.*, 2014).

Malgré leur rôle clé dans la transmission excitatrice, très peu de composés ciblent efficacement les VGLUTs. Le développement d'outils pharmacologiques est crucial pour mieux comprendre l'implication fonctionnelle des VGLUTs en conditions normales et pathologiques.

Il existe : - des inhibiteurs compétitifs des VGLUTs (liaison directe au site actif) (**Figure 11**) :

- **les analogues d'acides aminés :**

Le (2S,4R)-4-méthylglutamate et le *trans*-ACPD sont les meilleurs analogues du glutamate. Ces molécules rentrent en compétition avec le glutamate, suggérant qu'elles reconnaissent le site de liaison du NT dans les VGLUTs. Par contre, elles modulent également l'activité des EAATs et des mGluRs avec une meilleure affinité (Winter & Ueda, 1993).

Le kynurénate est un composé endogène du SNC qui inhibent les iGluRs en plus d'inhiber la recapture du glutamate (Ganong *et al.*, 1983). Les acides 2,4-quinoléinedicarboxyliques (QDC) font également parti des quinoléines (Carrigan *et al.*, 2002).

- **les colorants azoïques**

Le bleu Trypan et le bleu Evans sont les meilleurs inhibiteurs compétitifs connus des VGLUTs (Roseth *et al.*, 1995; Fonnum *et al.*, 1998). Le *Chicago Blue Sky* présente les mêmes propriétés que le bleu Evans si ce n'est qu'il est moins efficace (Roseth *et al.*, 1995).

Le « brillant yellow » est un puissant inhibiteur compétitif et spécifique des VGLUTs avec un K_i de 12 nM. Il inhibe le transport de glutamate dans la VSs. Il ne bloque pas l'accumulation vésiculaire de GABA (Tamura *et al.*, 2014).

- un inhibiteur non compétitif (liaison à d'autres sites que le site actif) qui est le rose bengale puisqu'il inhibe de façon dose-dépendante la V-ATPase (Bole & Ueda, 2005; Pietrancosta *et al.*, 2010).

- un inhibiteur indirect naturel qui est le facteur protéique nommé IPF. Il est capable de bloquer la recapture du glutamate et du GABA de façon indirecte (Gegelashvili & Schousboe, 1997; Tamura *et al.*, 2001).

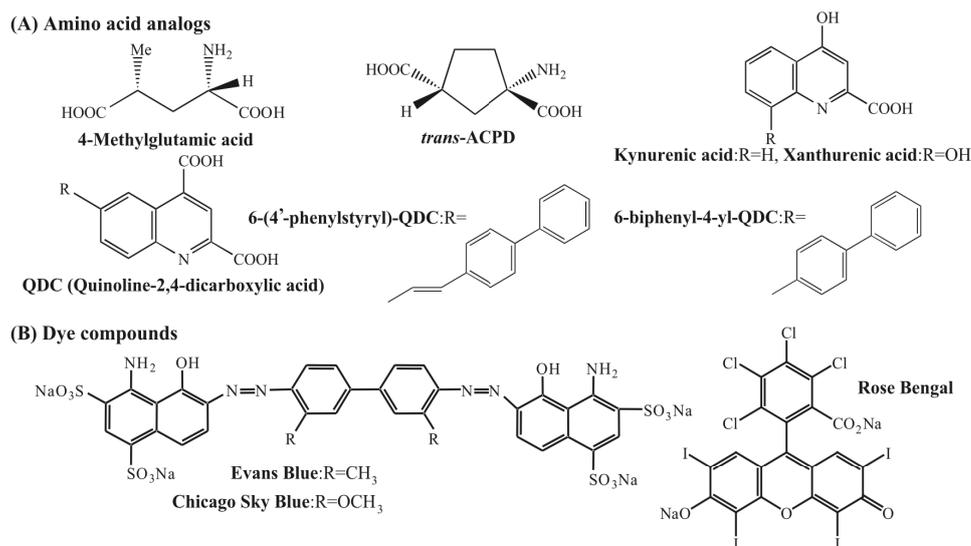


Figure 11. Structures des molécules qui inhibent les VGLUTs.
 (A) Analogues des aminoacides (B) Les colorants azoïques (d'après Shigeri *et al.*, 2004).

II.4. Distribution anatomique de VGLUT1 et VGLUT2

Les deux isoformes, VGLUT1 et VGLUT2, sont exprimées dans les neurones glutamatergiques classiques. Comme le montre la **Figure 12**, les neurones qui synthétisent ces deux isoformes présentent des distributions quasi complémentaires au niveau du SNC de rongeur. En effet, VGLUT1 est essentiellement présent dans les structures corticales alors que VGLUT2 est principalement présent dans les structures sous-corticales du SNC (**Figure 12**). Ils sont présents sur des VSs localisées dans des terminaisons synaptiques formant des contacts asymétriques (Bellocchio *et al.*, 1998; Herzog *et al.*, 2001; Kaneko *et al.*, 2002).

L'ARNm codant VGLUT1 est principalement transcrit dans le bulbe olfactif, les couches II-VI du cortex cérébral, l'hippocampe, le subiculum, les couches granulaires du cervelet et la matière grise périaqueducale. Il est également détecté en très faible quantité dans le septum latéral et certains noyaux thalamiques. L'ARNm de VGLUT2 est, quant à lui, fortement exprimé dans les régions sous-corticales allant du thalamus à la moelle épinière. Il est surtout présent au niveau du thalamus, de l'habénula latérale et médiane et du noyau sous-thalamique. L'ARNm est observé en quantité plus modérée dans les noyaux ventro-médian, arqué et supraoptique de l'hypothalamus (Ni *et al.*, 1994; Aihara *et al.*, 2000; Herzog *et al.*, 2001; Fremeau *et al.*, 2002; Liguz-Leczna & Skangiel-Kramska, 2007) (**Figure 12 a**).

Au niveau protéique, VGLUT1 est retrouvé dans le cortex cérébral, l'hippocampe (sauf dans 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; Fremeau *et al.*, 2001; Kaneko *et al.*, 2002). Il est également présent au niveau du thalamus, des fibres parallèles du cervelet, du noyau pédonculo-pontin et de l'hypothalamus ainsi que du tronc cérébral inférieur et de la moelle épinière dorsale et ventrale (Varoqui *et al.*, 2002). VGLUT2 est présent dans les couches I et IV du cortex, l'amygdale, le thalamus, le caudé-putamen, le globus pallidus, les colliculi inférieurs et supérieurs, la substance noire, le tronc cérébral, le bulbe rachidien, la moelle épinière et les fibres grimpances des cellules de Purkinje (Fremeau *et al.*, 2001; Fujiyama *et al.*, 2001; Herzog *et al.*, 2001; Kaneko *et al.*, 2002; Varoqui *et al.*, 2002; Landry *et al.*, 2004) (**Figure 12 b**). Durant le développement post-natal du cervelet, de l'hippocampe et du cortex de souris, un changement de proportion entre VGLUT2 et VGLUT1 est observé (aussi appelée « VGLUT2-VGLUT1 *switch* ») (Miyazaki *et al.*, 2003; Boulland *et al.*, 2004; Herzog *et al.*, 2004a).

VGLUT1 et VGLUT2 sont également retrouvés dans des neurones connus comme étant non glutamatergiques. En effet, dans le néocortex, VGLUT1 et VIAAT sont co-exprimés dans un sous-ensemble de terminaisons axonales formant des synapses symétriques et asymétriques (Fattorini *et al.*, 2009). L'ARNm codant pour VGLUT1 et VGLUT2 est présent dans les motoneurones cholinergiques de la corne dorsale de la moelle épinière (Herzog *et al.*, 2004b). Le transcrite de VGLUT2 est également présent dans les neurones noradrénergiques des groupes A1 et A2 et des neurones adrénérgiques des groupes C1, C2 et C3 de la medulla du rat (Stornetta *et al.*, 2002a; Stornetta *et al.*, 2002b). Il est également retrouvé dans les neurones dopaminergiques mésencéphaliques aux stades précoces du développement avec son expression qui diminue chez l'adulte (Descarries *et al.*, 2008; Mendez *et al.*, 2008).

Différentes études ont rapporté la présence de VGLUTs dans les astrocytes, expliquant pourquoi ces cellules ont la capacité de libérer du glutamate par exocytose (Fremeau *et al.*, 2002; Bezzi *et al.*, 2004; Montana *et al.*, 2004; Ni & Parpura, 2009; Ormel *et al.*, 2012). Mais ces observations sont controversées. En effet, des études récentes ont montré que les VGLUTs n'étaient pas exprimés par les astrocytes (Cahoy *et al.*, 2008; Juge *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013).

VGLUT1 et VGLUT2 sont exprimés de façon complémentaire dans différents types cellulaires de la rétine. En effet, VGLUT1 est exprimé par les photorécepteurs et les cellules bipolaires alors que VGLUT2, quant à lui, est exprimé dans les corps cellulaires des cellules

ganglionnaires et des cellules horizontales et dans certains cônes de la rétine de souris (**Figure 13**) (Mimura *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2004; Gong *et al.*, 2006; Wassle *et al.*, 2006; Stella *et al.*, 2008).

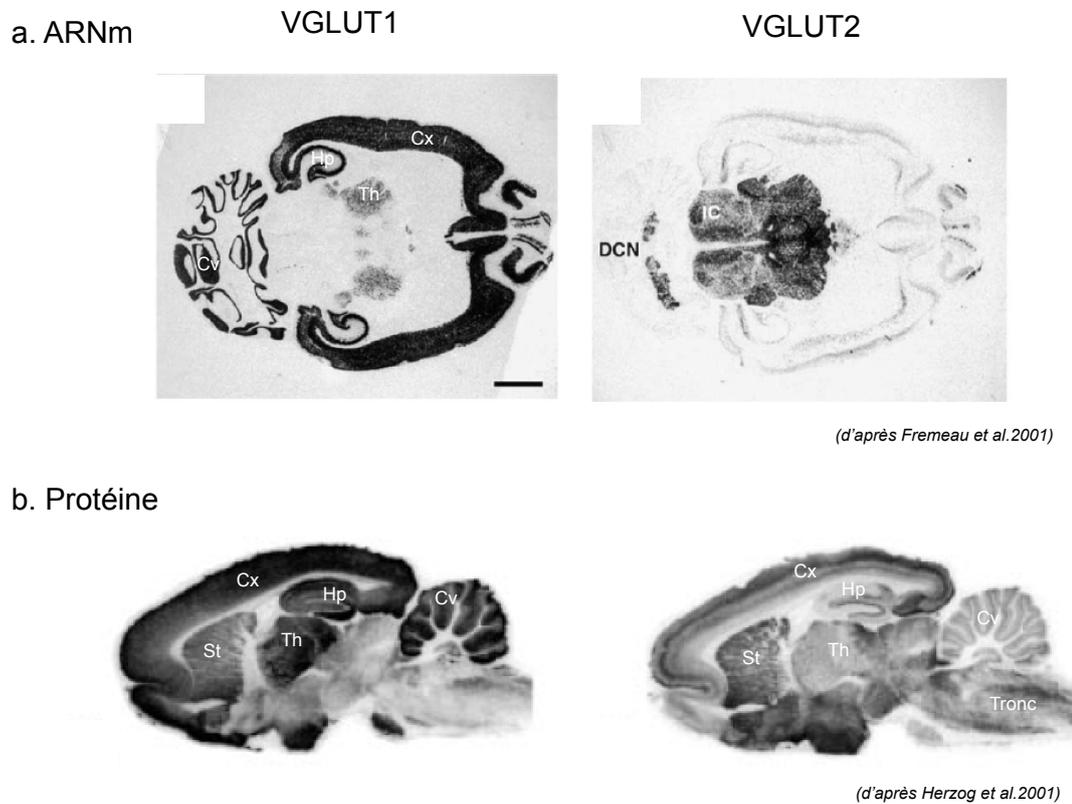
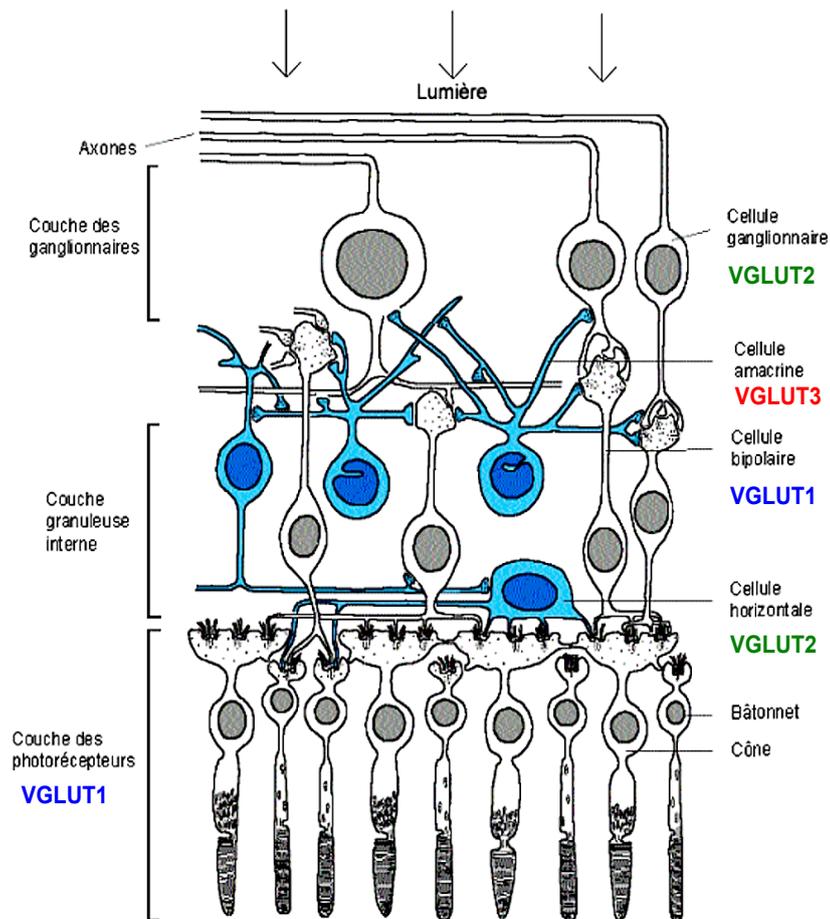


Figure 12. Distribution régionale des ARNm (a) et protéines (b) de VGLUT1 et VGLUT2.

(a) L'ARNm codant VGLUT1 est massivement exprimé dans le cortex (Cx), l'hippocampe (Hp) et le cervelet (Cv). Une expression beaucoup plus faible est détectée dans le thalamus (Th). Le transcrite de VGLUT2 est localisé dans les régions sous-corticales formant un continuum du thalamus au tronc cérébral (DCN = Deep cerebellar nuclei). (b) Les protéines VGLUT1 et VGLUT2 sont présentes dans l'ensemble des régions du SNC avec des intensités différentes (St = striatum).

L'étude des souris n'exprimant plus VGLUT1 (VGLUT1-KO) a permis de confirmer que VGLUT1 est essentiel à la perception visuelle. Les souris VGLUT1-KO naissent aveugles mais certaines fonctions visuelles sont conservées. C'est le cas du réflexe de contraction des pupilles en réaction à la lumière ; fonction paradoxalement médiée par VGLUT2. VGLUT2 est dominant dans le noyau géniculé basolatéral et les tubercules quadrijumeaux (colliculi supérieur). VGLUT1 et VGLUT2 se partagent donc différentes tâches dans la transmission rétinienne, avec VGLUT1 qui permet la libération de glutamate par exocytose et VGLUT2 qui assurerait probablement d'autres fonctions (**Figure 13**) (Freneau *et al.*, 2001; Land *et al.*, 2004; Gong *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2007).



2

Figure 13. Les différents types cellulaires de la rétine.

Les bâtonnets et les cônes (exprimant VGLUT1) sont des photorécepteurs qui sont activés par la lumière. L'information est transmise aux cellules bipolaires (VGLUT1-positives) et aux cellules horizontales (exprimant VGLUT2). Les cellules bipolaires contactent les cellules ganglionnaires (VGLUT2-positives) dont les axones forment le nerf optique. Les cellules amacrines exprimant VGLUT3 contactent à la fois les cellules bipolaires et les cellules ganglionnaires. Le circuit photorécepteur-bipolaire-ganglionnaire permet une transmission verticale de l'information visuelle alors que les cellules horizontales et amacrines traitent l'information de façon horizontale.

Dans le système auditif, l'expression de VGLUT1 et VGLUT2 est complémentaire dans le noyau cochléaire (Zhou *et al.*, 2007; Zeng *et al.*, 2009). Les terminaisons axonales co-exprimant les deux VGLUTs sont fréquemment trouvées dans les cellules granulaires du noyau cochléaire ventral (VCN) et dans les cellules fusiformes et la couche profonde du noyau cochléaire dorsal (DCN) mais très rarement dans le centre du VCN (Li *et al.*, 2003; Fyk-Kolodziej *et al.*, 2011). Plusieurs études suggèrent une co-expression de ces deux VGLUTs dans le complexe de l'olive supérieure (SOC) (Billups, 2005; Blaesse *et al.*, 2005).

Enfin, VGLUT1 et VGLUT2 sont présents dans un certain nombre d'organes périphériques. Ils sont exprimés sur les granules sécrétant le glucagon dans les cellules α

des îlots de Langerhans ainsi que dans les cellules F (Bai *et al.*, 2003; Hayashi *et al.*, 2003). Au niveau de l'estomac, VGLUT2 est exprimé principalement au niveau de la poche gastrique mais aussi au niveau des muqueuses et du pylore (Hayashi *et al.*, 2003). Le gène de VGLUT1 a pu être caractérisé dans les ostéoclastes. En effet, l'expression de VGLUT1 a été détectée dans des vésicules sécrétoires de transcytose présentes dans les ostéoclastes. De plus, les souris VGLUT1-KO présentent une ostéoporose (Hinoi *et al.*, 2002; Morimoto *et al.*, 2006). Des études immunohistochimiques ont mis en évidence l'expression de récepteurs du glutamate dans les spermatides (intermédiaires de la spermatogénèse) suggérant la présence d'un système glutamatergique et donc la présence des VGLUTs (Hayashi *et al.*, 2003; Redecker *et al.*, 2003).

Ces deux transporteurs vésiculaires du glutamate ont une distribution complémentaire et large que ce soit au niveau cérébral ou dans de nombreux organes périphériques. Durant le développement, il peut y avoir une compensation d'expression entre ces deux transporteurs (« VGLUT2-VGLUT1 *switch* »). En effet, les VGLUT1-KO survivent jusqu'à trois semaines après la naissance car l'absence de VGLUT1 au cours de ces trois premières semaines de vie postnatale est en partie compensée par la présence ubiquitaire plus précoce de VGLUT2 (Wojcik *et al.*, 2004). Cependant, une équipe a réussi à maintenir en vie un grand nombre de souris VGLUT1-KO bien au-delà de trois semaines en appliquant des conditions d'élevage adaptées (Fremeau *et al.*, 2004). Ces souris présentaient un retard global de croissance, un aspect émacié, étaient aveugles et semblaient présenter des troubles neurologiques moteurs. VGLUT1 ne paraît donc pas absolument essentiel au maintien des fonctions vitales de l'organisme. Par contre, la délétion de VGLUT2 conduit à la mort des souris VGLUT2-KO dès la naissance à cause de la perte du contrôle de la respiration et du système nerveux autonome. VGLUT2 assure donc la majeure partie de la transmission glutamatergique dans les centres nerveux de régulation autonome de l'organisme (Moechars *et al.*, 2006; Wallen-Mackenzie *et al.*, 2006).

III. Le transporteur vésiculaire du glutamate 3 : VGLUT3

VGLUT3 est le dernier des transporteurs vésiculaires du glutamate à avoir été identifié ; d'abord chez le rat par notre équipe en 2002 (Gras *et al.*, 2002) puis par une autre équipe la même année (Fremeau *et al.*, 2002). Par la suite, les orthologues de souris,

homme, hamster doré et poisson zèbre ont été clonés (Schafer *et al.*, 2002; Takamori *et al.*, 2002; Mintz & Scott, 2006; Obholzer *et al.*, 2008).

VGLUT3 est structurellement très similaire à VGLUT1 et VGLUT2 (plus de 70% d'identité) et ses caractéristiques fonctionnelles, biochimiques, énergétiques et pharmacologiques sont les mêmes que ces derniers (Reimer *et al.*, 2001; Fremeau *et al.*, 2002; Gras *et al.*, 2002; Takamori *et al.*, 2002). Contrairement à VGLUT1 et VGLUT2 qui sont exprimés dans des synapses glutamatergiques asymétriques classiques, VGLUT3 est localisé aussi bien sur des vésicules se trouvant dans des synapses asymétriques (excitatrices) que dans des synapses symétriques (inhibitrices). On le retrouve également dans des varicosités modulatrices (Gras *et al.*, 2002). VGLUT3 présente une distribution atypique et différente de celle de VGLUT1 et VGLUT2. En effet, il est présent dans des sous-populations de neurones décrits préalablement comme non-glutamatergiques. VGLUT3 définit donc clairement un sous-système glutamatergique particulier qui semble jouer un rôle différent de celui des systèmes utilisant VGLUT1 et VGLUT2.

III.1. Répartition anatomique de VGLUT3

La distribution de VGLUT3 est à la fois restreinte à une population de neurones et étendue à un ensemble de terminaisons présentes dans le cerveau. Contrairement à VGLUT1 et VGLUT2, les neurones exprimant VGLUT3 sont peu nombreux. De plus, VGLUT1 et VGLUT2 sont essentiellement exprimés dans les terminaisons présynaptiques alors que VGLUT3 est également observé dans les corps cellulaires et les dendrites proximales de certains neurones (Gras *et al.*, 2002; Herzog *et al.*, 2004a). Cette répartition témoigne de l'implication de VGLUT3 dans la libération du glutamate au niveau somato-dendritique et d'un trafic membranaire différent de celui de VGLUT1 et VGLUT2 (Zilberter, 2000; Harkany *et al.*, 2004). Ces observations suggèrent que VGLUT3 pourrait jouer d'autres rôles que celui de transporteur vésiculaire du glutamate. L'acheminement de VGLUT3 vers différents compartiments cellulaires peut, par conséquent, contribuer à de nouveaux modes de signalisation par le glutamate ou à d'autres rôles encore non-identifiés.

Contrairement à VGLUT1 et VGLUT2 qui sont parfois présent dans les mêmes terminaisons axonales, VGLUT3 est rarement associé aux autres isoformes de VGLUTs (Boulland *et al.*, 2004).

Comme le montrent les études d'hybridation *in situ*, l'ARNm codant pour VGLUT3 est présent en grande quantité dans les noyaux du raphé (**Figures 14 et 15**). Le striatum, le

core et le *shell* de l'accumbens, le pallidum ventral et les tubercules olfactifs présentent également une quantité importante du transcrit de VGLUT3 (Gras *et al.*, 2002; Boulland *et al.*, 2004; Herzog *et al.*, 2004a; Nickerson Poulin *et al.*, 2006). Enfin, une expression plus discrète et dispersée de ce transcrit est observée dans l'hippocampe et le cortex cérébral. On ne détecte aucune trace de l'ARNm de VGLUT3 dans le thalamus, le septum et la substance noire (Schafer *et al.*, 2002; Herzog *et al.*, 2004a) (**Figure 14 et 15**).

Dans le SNC, la protéine VGLUT3 est présente dans certaines couches corticales (II, V et VI), le septum latéral, le bulbe olfactif, les tubercules olfactifs, l'ensemble du striatum dorsal et ventral, l'hippocampe (couche pyramidale et granulaire), les noyaux basolatérales, et basomédian de l'amygdale, la substance noire compacte, l'aire tegmentale ventrale, le noyau interpedonculaire et les noyaux du raphé dorsal et médian (Schafer *et al.*, 2002; Herzog *et al.*, 2004a; Tatti *et al.*, 2014) (**Figure 14 et 15**).

VGLUT3 est très peu présent dans des neurones purement glutamatergiques mais il est largement exprimé par les interneurons cholinergiques du striatum, certains interneurons GABAergiques de l'hippocampe et du cortex cérébral et par les neurones sérotoninergiques des noyaux du raphé (El Mestikawy *et al.*, 2011; Schafer *et al.*, 2002; Herzog *et al.*, 2004a). Cette expression dans des neurones décrits préalablement comme non glutamatergiques le distingue des autres VGLUTs (**Tableau 4**).

VGLUT3 délimite donc un nouveau sous-ensemble de neurones utilisant deux neurotransmetteurs classiques.

Une étude a montré également la présence de VGLUT3 dans une sous-population d'astrocytes dans plusieurs régions du SNC, incluant le cervelet et le striatum, ainsi que dans les oligodendrocytes (Fremeau *et al.*, 2002; Boulland *et al.*, 2004). Mais, ces résultats sont controversés par d'autres études et semblent être dus à un marquage non-spécifique (Schafer *et al.*, 2002; Herzog *et al.*, 2004a; Gras *et al.*, 2008).

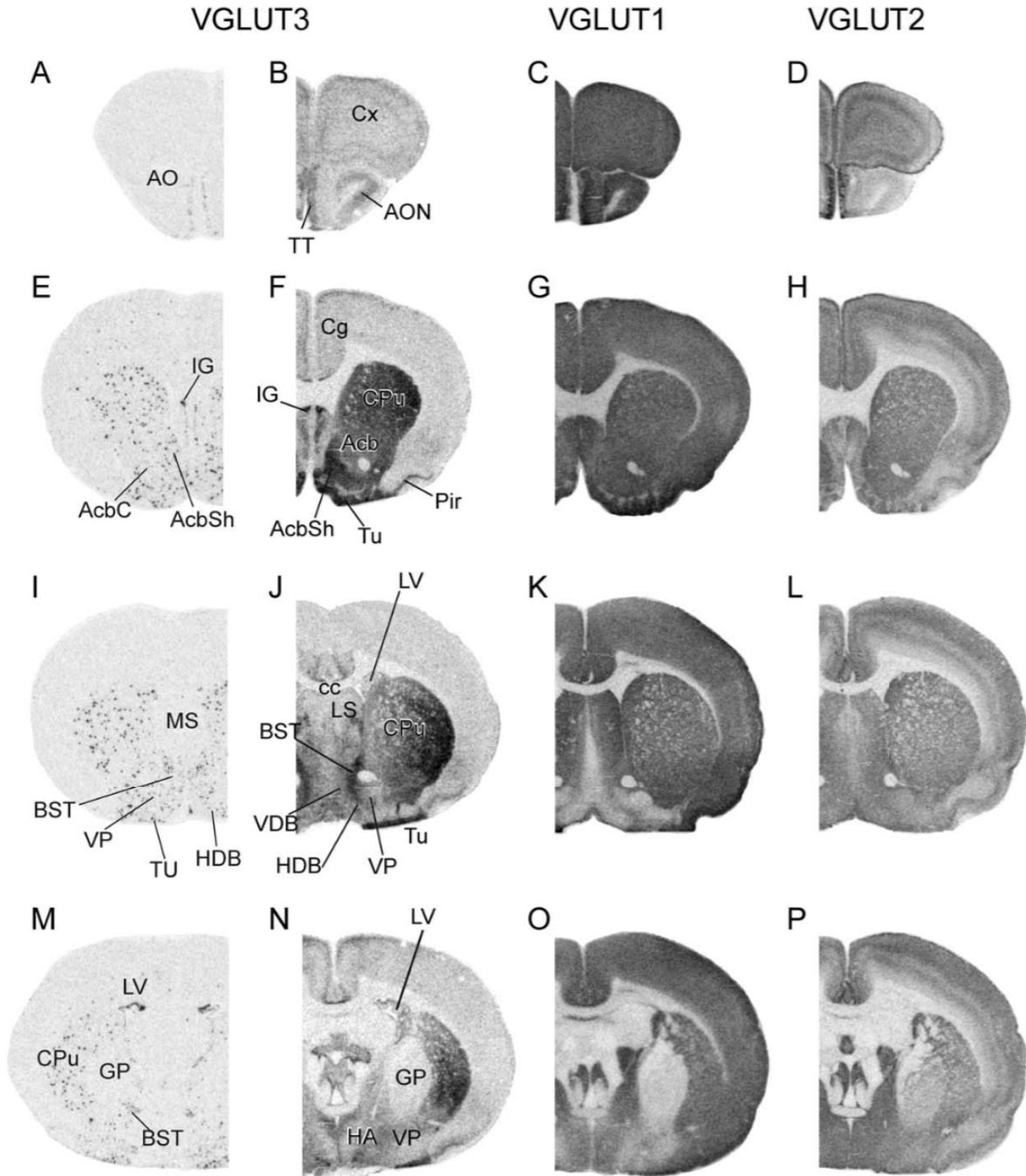
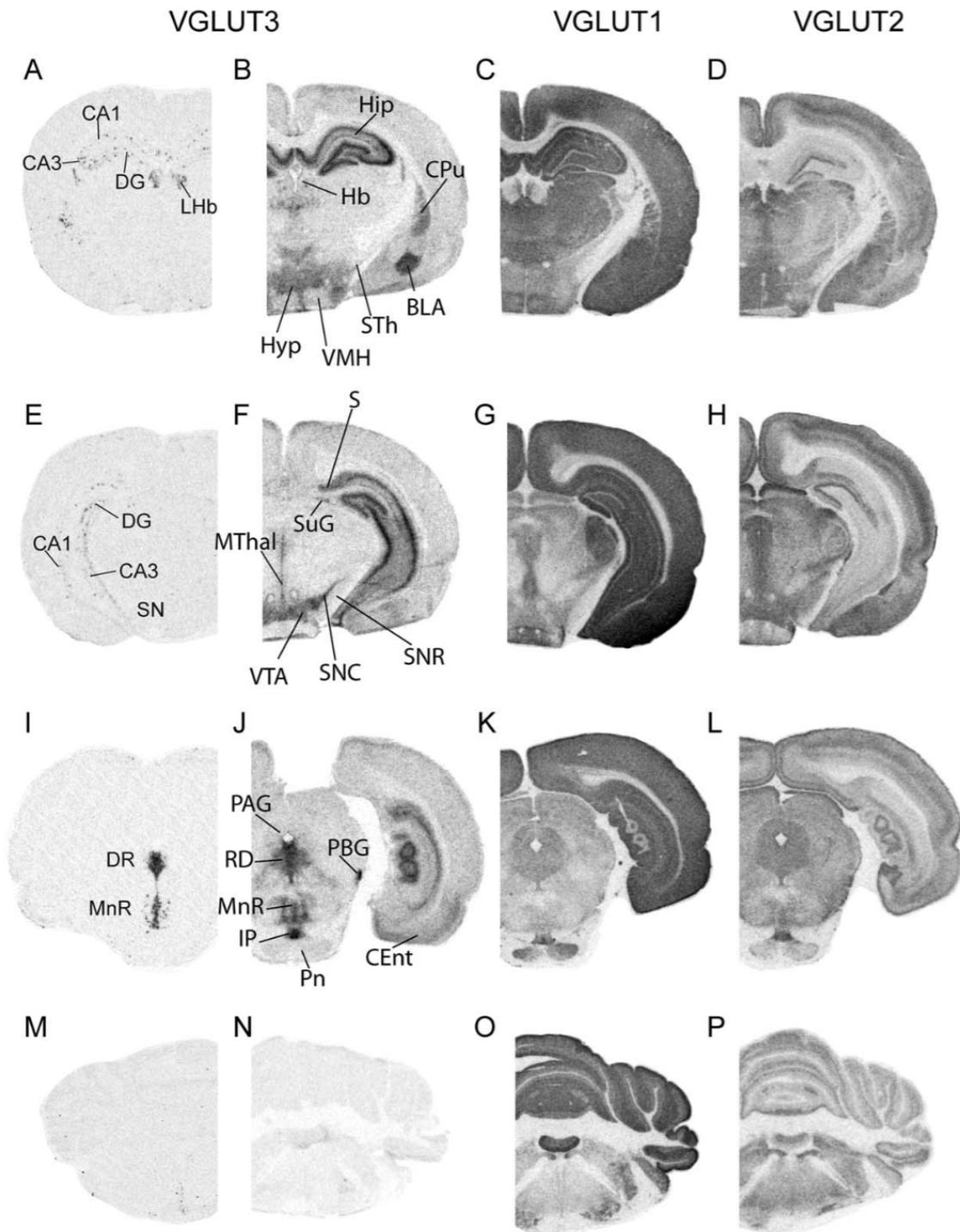


Figure 14. Distribution régionale de l'ARNm et de la protéine VGLUT3.

Comparaison du profil de distribution de VGLUT1-3 dans le cerveau de rat. Visualisation de l'expression du transcrite de VGLUT3 par hybridation *in situ* (A, E, I, M) et de la protéine de VGLUT3 (B, F, J, N), VGLUT1 (C, G, K, O) et VGLUT2 (D, H, L, P) par immunohistoautoradiographie (d'après Herzog et al., 2004).



2

Figure 15. Distribution régionale de l'ARNm et la protéine de VGLUT3.
 Suite de la figure 14 (d'après Herzog et al., 2004).

Tableau 4. Distribution anatomique de l'ARNm de VGLUT3 et de sa protéine dans le SNC.
(d'après El Mestikawy et al., 2011)

Type neuronal	Expression de l'ARNm	Localisation des protéines	
		Corps cellulaire	Terminaisons
Acétylcholine	Striatum, cerveau antérieur basal	Striatum, cerveau antérieur basal	Striatum, amygdale
GABA	Cortex cérébral Hippocampe Amygdale	Cortex cérébral, hippocampe, cellules de Purkinje, noyaux des corps trapézoïdes	Cortex cérébral, hippocampe, cellules de Purkinje, olive supérieure, amygdale
Sérotonine	Raphé dorsal et médian	Raphé dorsal et médian	Cortex cérébral, hippocampe, bulbe olfactif, amygdale, aire tegmentale, Moelle épinière

III.2. VGLUT3 dans les interneurons cholinergiques du striatum

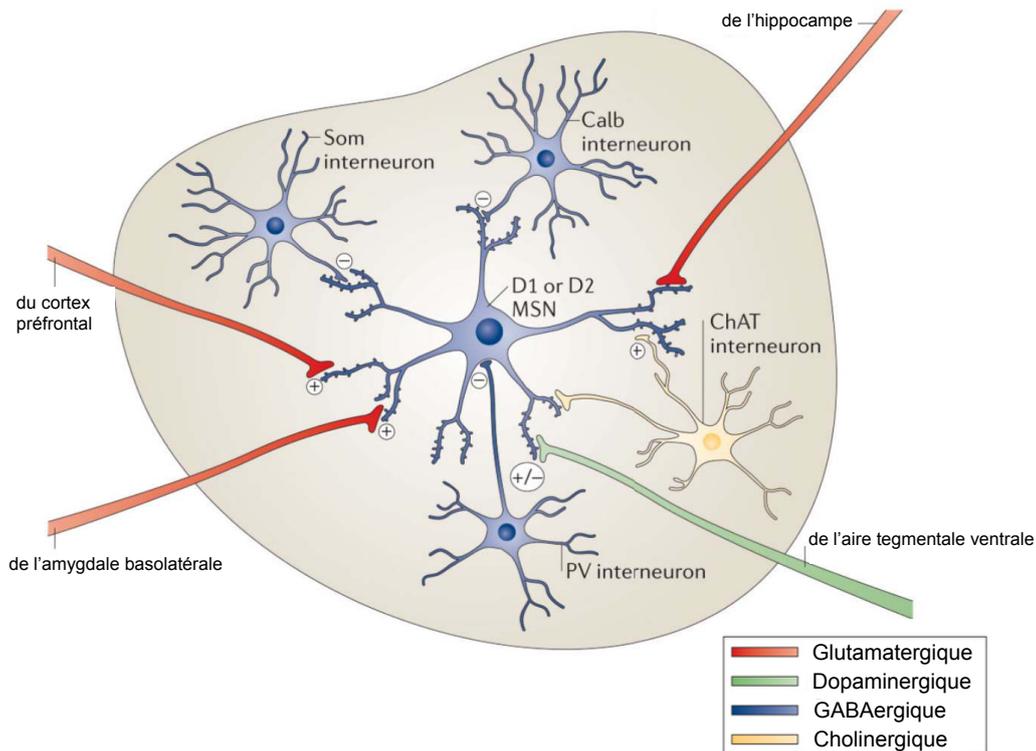
L'ensemble des noyaux constituant le système cholinergique est localisé dans le prosencéphale et le tronc cérébral. Dans ce système, VGLUT3 est exclusivement exprimé au niveau du striatum et de l'amygdale (Boulland *et al.*, 2004; Nickerson Poulin *et al.*, 2006). Le striatum est d'ailleurs, une des structures du cerveau où l'expression de VGLUT3 est la plus forte (**Figure 14**) (Gras *et al.*, 2002; Herzog *et al.*, 2004a). Il constitue la structure la plus volumineuse des ganglions de la base. Il en est d'ailleurs la principale porte d'entrée. Le striatum dispose d'une organisation neurochimique complexe (Alheid, 1990).

A l'échelle cellulaire, il est composé d'un ensemble de neurones plutôt homogène. Les neurones striataux peuvent être regroupés en deux grandes catégories selon la présence ou non d'épines sur leurs dendrites (**Figure 16**) :

- des neurones de projection efférents GABAergiques appelés les neurones épineux de taille moyenne (*Medium Spiny Neurons* ou MSN). Ils représentent 95% des neurones striataux. Ils possèdent un corps cellulaire ovoïde de grosseur moyenne (20-25 µm) à partir duquel émerge des dendrites chargées d'épines et un long axone (Kemp & Powell, 1971;

Parent *et al.*, 1995). Ils reçoivent la plupart des afférences du striatum et sont aussi les neurones efférents du striatum.

- d'interneurones cholinergiques (1-2% des neurones striataux) et GABAergiques non épineux. Ils possèdent un court axone qui reste confiné au striatum. Ces interneurones forment une catégorie plus hétérogène que les neurones de projection, que ce soit au niveau morphologique ou neurochimique.



?

Figure 16. Composition neuronale du striatum.

Les neurones épineux de taille moyenne (MSN) reçoivent des afférences glutamatergiques du cortex, de l'hippocampe, de l'amygdale basolatérale et dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale. Ils sont modulés par des interneurones GABAergiques qui expriment soit la parvalbumine (*PV interneuron*), soit la somatostatine (*Som interneuron*) soit la calbindine (*Calb interneuron*) et par des interneurones cholinergiques (*ChAT interneuron* ou *TANs*). (Figure modifiée de Russo & Nestler, 2013).

Les interneurones GABAergiques non épineux peuvent être subdivisés en trois sous groupes :

- ceux exprimant la parvalbumine et possédant un taux de décharge rapide,
- ceux exprimant la somatostatine avec un taux de décharge lent,
- ceux exprimant la calbindine.

Les interneurones cholinergiques striataux sont la seule source d'Acétylcholine (ACh) dans le striatum. Ils sont appelés TANs pour « *Tonically Active Neurons* » (Pisani *et al.*, 1997; Calabresi *et al.*, 2000). Ils ont un grand corps cellulaire (20 à 50 µm de diamètre) et leurs axones qui font très peu de synapses présentent des boutons en passant (Descarries & Mechawar, 2000). Les TANs ne représentent qu'environ 2% de la population neuronale du striatum mais ils régulent fortement la transmission synaptique et la plasticité à long-terme striatale à travers les récepteurs muscariniques et nicotiniques (Wang *et al.*, 2006; Sullivan *et al.*, 2008; Higley *et al.*, 2009).

L'ARNm de VGLUT3 est exprimé dans les somas des TANs situés dans le striatum dorsal, ventral et la partie striatale des tubercules olfactifs (Gras *et al.*, 2002; Nickerson Poulin *et al.*, 2006).

VGLUT3 est présent dans le corps cellulaire et les dendrites des TANs où il colocalise avec la choline acétyltransférase (ChAT), enzyme qui permet la synthèse d'Acétylcholine à partir de choline et d'acétyl-coenzyme A (**Figure 17**). La ChAT est un marqueur spécifique des neurones cholinergiques.

VGLUT3 et le transporteur vésiculaire de l'ACh (VACHT) sont présents au sein d'une large majorité de varicosité des TANs. L'activation optogénétique des TANs déclenche des courants glutamatergiques aussi bien que des courants nicotiniques (Higley *et al.*, 2011; Nelson *et al.*, 2014). Or, la présence de VGLUT3 est nécessaire pour observer les réponses glutamatergiques. Les TANs ont donc la capacité de libérer de l'ACh et/ou du glutamate.

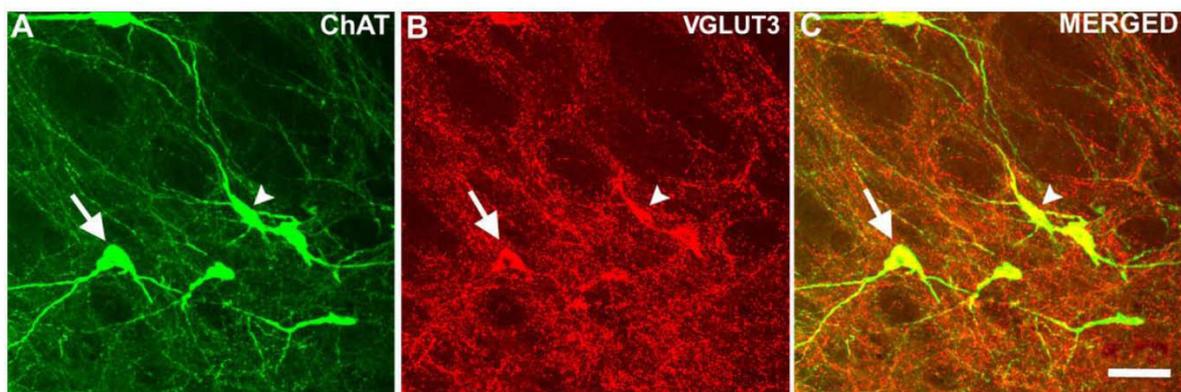


Figure 17. Les interneurones cholinergiques striataux expriment VGLUT3

(A-C) Les neurones positifs pour la ChAT (A, en vert) expriment aussi VGLUT3 (B, en rouge). La colocalisation est visible sur la superposition des images confocales A et B en C. Echelle : C = 50 µm (d'après Nickerson Poulin *et al.*, 2006).

Au niveau ultrastructural, dans les terminaisons présynaptiques des TANs, VGLUT3 et VACHT seraient localisés sur les mêmes VSs (Gras *et al.*, 2008). La colocalisation de

VGLUT3 et VAcHT sur les mêmes VSs a des conséquences fonctionnelles importantes. En effet, la présence de VGLUT3 permet d'augmenter la quantité d'ACh accumulée dans la VS ainsi que la quantité libérée (Gras *et al.*, 2008). De plus, les souris n'exprimant plus VGLUT3 (VGLUT3-KO) présentent un phénotype hypocholinergique dans le striatum (Gras *et al.*, 2008). Cette étude montre que VGLUT3 augmente l'activité de VAcHT. Ce couplage fonctionnel entre deux transporteurs vésiculaires de NT distincts a été appelé « synergie vésiculaire » (El Mestikawy *et al.*; Gras *et al.*, 2008) (voir III.5).

Ainsi, VGLUT3 aurait au moins deux fonctions dans les TANs : d'une part, il confère la capacité de libérer du glutamate, et d'autre part, il augmente l'accumulation vésiculaire et la libération d'ACh.

Dans le striatum, VGLUT3 jouerait également un rôle dans la sensibilité à la cocaïne. En effet, les souris VGLUT3-KO présentent une hypersensibilité locomotrice induite par la cocaïne (Gras *et al.*, 2008; Sakae *et al.*, 2015). Notre équipe et ses collaborateurs ont montré que les souris VGLUT3-KO consomment beaucoup plus de cocaïne que les souris sauvages. Dans le noyau accumbens de ces souris mutantes:

- la quantité de dopamine (DA) libérée est fortement augmentée en raison de l'absence d'activation des récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluRs),
- la cascade de signalisation D1-dépendante est hyper réactive,
- la densité des épines dendritiques est augmentée dans les MSNs D1-positifs,
- la transmission synaptique glutamatergique cortico-accumbens est augmentée dans les MSNs D1-positifs.

Les TANs utilisent donc le glutamate pour réduire la quantité de dopamine libérée et ainsi inhiber le système de récompense alors qu'ils utilisent l'ACh pour le stimuler (Sakae *et al.*, 2015).

Chez l'homme, sur une cohorte de 250 individus « polytoxicomanes », 5% des sujets présentaient une mutation de la séquence codante de *VGLUT3*. Ce taux n'est que de 0,5% dans une population témoin sans antécédents psychiatriques. Cette étude identifie donc VGLUT3 comme un régulateur de la dépendance aux drogues et un facteur de vulnérabilité à l'addiction (Sakae *et al.*, 2015).

De plus, il semblerait que l'expression de VGLUT3 dans le noyau accumbens soit régulée par les récompenses naturelles (comme l'eau, la nourriture) et la douleur. En effet, l'expression de VGLUT3 est augmentée suite à une administration chronique de sucrose chez le rat et diminuée lors d'une douleur chronique (Tukey *et al.*, 2013).

VGLUT3 exerce donc une influence importante sur le réseau striatal mais son rôle est encore partiellement incompris à l'heure actuelle.

III.3. VGLUT3 dans les neurones GABAergiques

Le GABA est le principal neurotransmetteur inhibiteur du SNC des vertébrés (Watanabe *et al.*, 2002). Ce NT, qui est activateur lors du développement embryonnaire, ne devient inhibiteur qu'à l'âge adulte (Ben-Ari, 2002).

Les interneurons GABAergiques forment une famille vaste et complexe. En effet, ils présentent une forte diversité morphologique et électrophysiologique (pour revue (*Petilla Interneuron Nomenclature et al.*, 2008)). Dans le cortex et l'hippocampe, les terminaisons nerveuses des interneurons dits « en corbeille » (*basket cells*) entourent les corps cellulaires et les dendrites proximales des neurones glutamatergiques pyramidaux. Ces interneurons GABAergiques sont divisés en deux groupes : ceux exprimant la parvalbumine (PV, protéine liant le calcium) et ceux qui expriment la cholécystokinine (CCK, neuropeptide) (Somogyi *et al.*, 2004).

L'ARNm de VGLUT3 n'est exprimé que dans certains interneurons GABAergiques du cortex cérébral, de l'hippocampe et de l'amygdale (Herzog *et al.*, 2001; Fremeau *et al.*, 2002; Gras *et al.*, 2002; Schafer *et al.*, 2002; Omiya *et al.*, 2015). Dans ces interneurons GABAergiques, VGLUT3 est présent :

- dans le soma où il colocalise avec l'acide glutamique décarboxylase (GAD, enzyme qui catalyse la décarboxylation du glutamate en GABA) (**Figure 18**),
- dans la partie proximale des dendrites et dans les terminaisons axonales où il colocalise avec le transporteur vésiculaire du GABA (appelé VGAT ou VIAAT) (Herzog *et al.*, 2004a; Somogyi *et al.*, 2004).

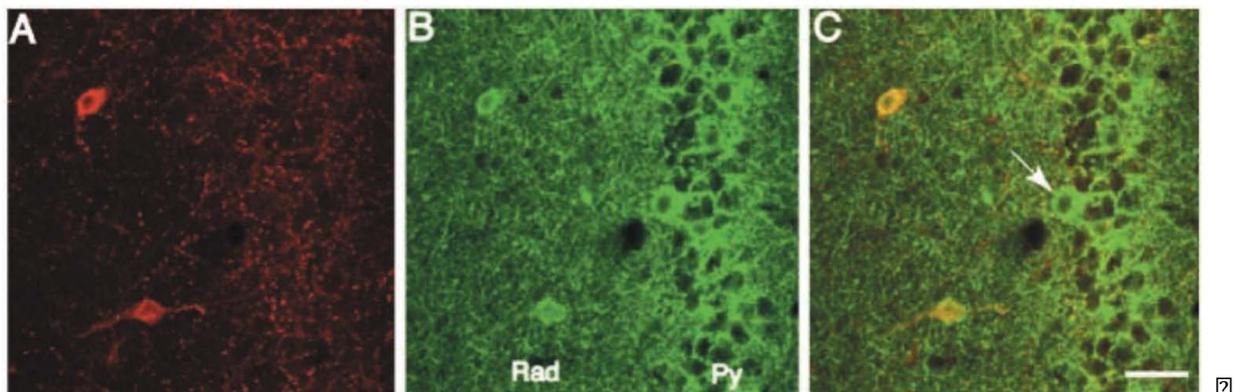


Figure 18. Les interneurons GABAergiques expriment VGLUT3.

(A-C) Un sous-ensemble de neurones VGLUT3-positif (A, en rouge) sont aussi positifs pour la GAD (B, en vert). (C) Superposition des images A et B montrant la colocalisation de VGLUT3 et GAD. La flèche blanche montre un interneurone positif pour la GAD mais pas pour VGLUT3. Echelle : C = 50 μ m (d'après Fremeau *et al.*, 2002).

De plus, la protéine VGLUT3 est enrichie dans les interneurons en corbeille CCK-positifs du cortex cérébral, de l'hippocampe et de l'amygdale (**Figure 19**) et les interneurons GABAergiques produisant la préprotachykinine B (PPTB, précurseur de la neurokinine B) du néocortex (Somogyi *et al.*, 2004; Hioki *et al.*, 2010; Omiya *et al.*, 2015).

Dans l'amygdale, VGLUT3 est, en effet, présent dans les interneurons en corbeille CCK-positifs exprimant le récepteur aux cannabinoïdes CB1. Dans cette région, ces interneurons forment des synapses particulières puisqu'elles s'invaginent dans les cellules pyramidales, cellules exprimant le récepteur métabotrope du glutamate mGluR5. Ces synapses invaginées libéreraient du GABA, glutamate et CCK. Le glutamate libéré modulerait les fonctions neuronales et synaptiques via un mode de transmission volumique en agissant sur les mGluR5 qui sont largement distribués sur la surface extrasynaptique et somato-dendritique des cellules pyramidales (Omiya *et al.*, 2015). Mais son rôle dans ce circuit reste encore mal compris.

VGLUT3 est également présent dans des interneurons GABAergiques de la strie terminale et du noyau médian du corps trapézoïde mais son rôle dans ces interneurons reste encore à élucider (Gillespie *et al.*, 2005; Kudo *et al.*, 2012).

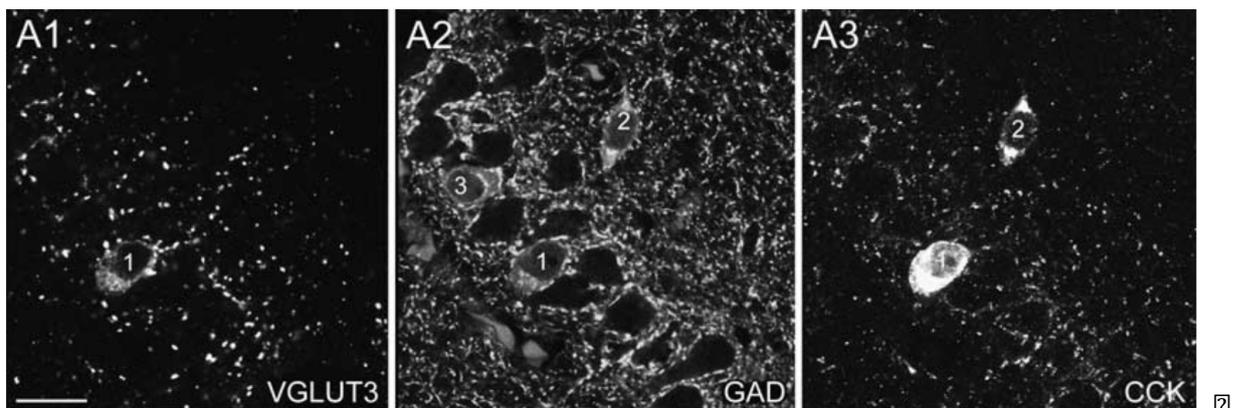


Figure 19. Les interneurons GABAergiques exprimant VGLUT3 sont CCK-positifs.

(A) Un corps cellulaire d'un interneurone (1) dans la couche CA1 de l'hippocampe est marqué par VGLUT3 (A1), la GAD (A2) et la CCK (A3) tandis que le corps cellulaire 2 est juste marqué par la GAD et le CCK. Le soma 3 est immunomarké seulement par la GAD et les corps cellulaires des cellules pyramidales ne sont pas immunomarkés par VGLUT3. Echelle : 20 μ m (d'après Somogyi *et al.*, 2004).

Il a été montré que VGLUT3 et VIAAT sont localisés sur les mêmes VSs dans le cortex cérébral et l'hippocampe. Ce résultat suggère que ces VSs sont capables de charger à la fois du GABA et du glutamate et donc de libérer dans la fente synaptique ces deux NTs (Zander *et al.*, 2010; Stensrud *et al.*, 2013; Fasano *et al.*, Submitted) (**Figure 20**). De plus, la libération de glutamate au niveau de la synapse GABAergique déclencherait une réponse glutamatergique du neurone postsynaptique par l'activation des récepteurs NMDA (Noh *et*

al., 2010; Case & Gillespie, 2011; Stensrud *et al.*, 2015). D'autres récepteurs au glutamate sont capables de transmettre l'information au niveau des synapses GABAergiques. Il a été montré que le récepteur métabotrope mGluR7 est présent au niveau des terminaisons synaptiques des interneurons en corbeille (Somogyi *et al.*, 2003) et qu'il peut inhiber présynaptiquement la libération de GABA (Summa *et al.*, 2013). De plus, une récente étude menée par notre équipe confirme ce résultat en montrant que VGLUT3, dans les interneurons GABAergiques de l'hippocampe inhiberait la libération de GABA à travers l'activation des récepteurs mGluR du groupe III (Fasano *et al.*, Submitted).

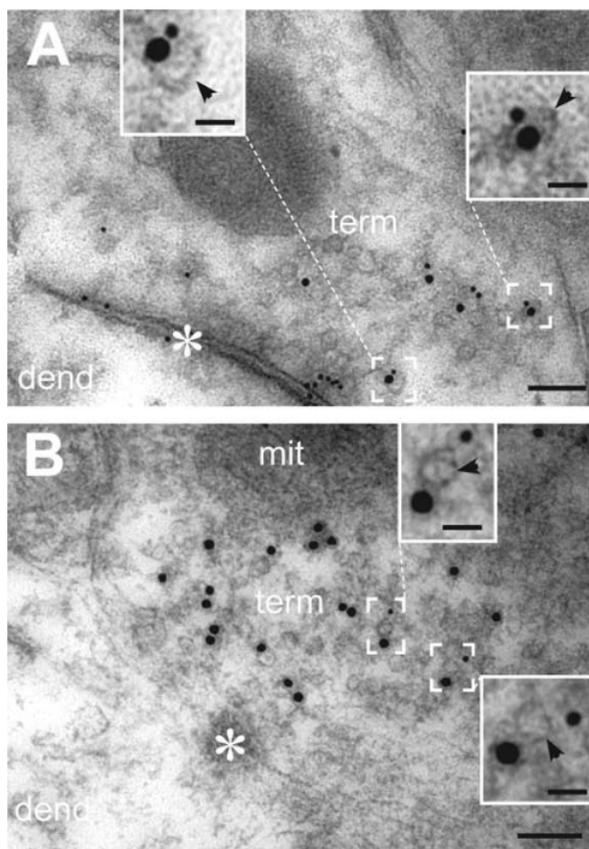


Figure 20. VGLUT3 et VIAAT sont localisés sur les mêmes vésicules.

(A-B) Double marquage en microscopie électronique (« immunogold ») pour VGLUT3 et VIAAT. (A) Micrographie électronique d'une terminaison (term) d'un interneurone GABAergique de la couche CA3 de l'hippocampe formant des synapses symétriques (repérées par un astérisque) sur les dendrites de neurones pyramidaux (dend). VIAAT (larges particules en or) et VGLUT3 (petites particules en or) sont colocalisés sur les mêmes vésicules (encadré, signalées par la tête de la flèche). (B) Terminaisons synaptiques (term) formant des synapses symétriques (astérisques) sur des dendrites (dend) dans le néocortex. Les encadrés sont des zooms de vésicules synaptiques composées de VGLUT3 et VIAAT. Mit = mitochondries. Echelle : A-B = 100 nm et dans les encadrés 25 nm. (d'après Stensrud *et al.*, 2013)

D'après Stensrud et collaborateurs, les terminaisons GABAergiques n'exprimant pas VGLUT3 ont une plus grande quantité de GABA que celles contenant VGLUT3 (Stensrud *et al.*, 2015). Le glutamate, étant accumulé dans les VSs par VGLUT3 serait moins disponible pour la production de GABA (Stensrud *et al.*, 2015). Cependant, ces interprétations basées uniquement sur des données anatomiques de microscopie électronique nécessiteraient d'être validées par d'autres approches.

La fonction exacte des réponses glutamatergiques dépendantes de VGLUT3 au niveau des synapses GABAergiques reste non résolue. Cependant, les interneurons GABAergiques du cortex sont bien connus pour avoir un impact majeur dans l'activité des

réseaux neuronaux. Les souris VGLUT3-KO fournissent le premier modèle de souris génétiquement modifiées présentant une épilepsie généralisée non convulsive avec des effets sur le comportement très faible. Ces souris présentent des crises (« *seizures* ») corticales spontanées (Seal *et al.*, 2008). Ces crises pourraient être causées par l'absence de VGLUT3 qui permettrait un rétrocontrôle inhibiteur glutamatergique sur la transmission GABAergique. Ces données suggèrent ainsi un rôle modulateur de VGLUT3 sur l'excitabilité corticale. Cependant, il faut noter que ces crises corticales spontanées n'ont jusqu'à présent pas été rapportées par de nombreux laboratoires possédant des lignées VGLUT3-KO.

III.4. VGLUT3 dans les neurones sérotoninergiques

La sérotonine (5-HT) est une amine biogène qui régule un grand nombre de fonctions cérébrales. Elle est présente dans des groupes de neurones épars et restreints. En effet, le système sérotoninergique est constitué de neurones distribués en 9 groupes le long de la ligne médiane du tronc cérébral. Les groupes les plus caudaux (B1 à B4), qui comprennent les noyaux des raphés magnus, obscurus, pallidus et pontis envoient des projections descendantes 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) (Hensler, 2006; Michelsen *et al.*, 2007) (**Figure 21**). Les RD et RM, malgré leur petite taille et le peu de neurones qu'ils contiennent, projettent de façon diffuse mais ségréguée dans l'ensemble du cerveau, jusqu'aux bulbes olfactifs (Gaspar *et al.*, 2003). En effet, les projections de la partie antérieure du RD se dirigent vers le striatum alors que la partie caudale du RD projette dans le septum latéral et la substance noire (Molliver, 1987; Hensler, 2006; Waselus *et al.*, 2006). Les terminaisons du RD se retrouvent au niveau du hile du gyrus denté tandis que les terminaisons du RM sont présentes dans l'ensemble de l'hippocampe.

Le système sérotoninergique semble relativement homogène sur le plan anatomique et structural. Les RD et RM contiennent des neurones sérotoninergiques, GABAergiques et quelques neurones dopaminergiques (Michelsen *et al.*, 2007). Une population de neurones purement glutamatergiques n'exprimant que VGLUT3 se projetant vers l'hippocampe et le septum a été décrite (Gras *et al.*, 2002; Mintz & Scott, 2006; Juge *et al.*, 2009; Hioki *et al.*, 2010). Dans ces neurones, VGLUT3 joue un rôle dans les fonctions de thermorégulation dont l'induction de la fièvre et il pourrait également être impliqué dans le contrôle du métabolisme énergétique (Nakamura *et al.*, 2004).

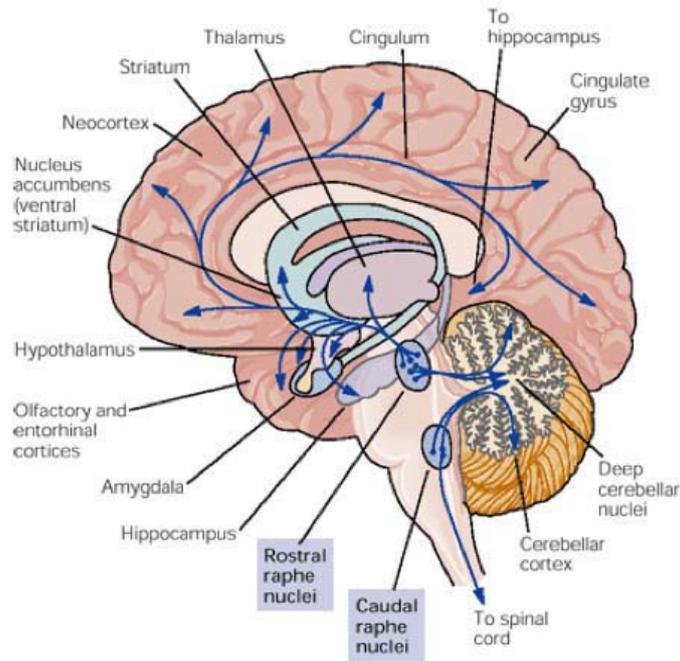


Figure 21. Voies sérotoninergiques chez l'Homme.

Les groupes de neurones rostraux (*Rostral raphe nuclei*) innervent le cerveau antérieur et le cervelet alors que les groupes de neurones caudaux (*Caudal raphe nuclei*) projettent sur le cervelet, la moelle épinière et le système nerveux périphérique (d'après *Principle of neural science, Kandel, 2000*).

Les neurones sérotoninergiques sont caractérisés par un patron de décharge lent et régulier à l'âge adulte (Lanfume *et al.*, 1999). Cette caractéristique associée au peu de contacts synaptiques différenciés des terminaisons sérotoninergiques (Descarries & Mechawar, 2000) permet une libération diffuse et constante de 5-HT (aussi appelée transmission volumique) dans de nombreuses régions du cerveau (Descarries & Mechawar, 2000).

La sérotonine (5-HT) est impliquée dans de nombreux aspects du fonctionnement du cerveau adulte. Son rôle dans le système limbique et donc dans le contrôle de l'humeur chez l'Homme, est un de ceux qui a suscité le plus de recherches. Parmi les troubles de l'humeur, l'anxiété et la dépression sont extrêmement répandues et pourraient être la seconde cause de maladies invalidantes d'ici 2020 (Cryan & Holmes, 2005). L'implication de la 5-HT, et plus généralement des monoamines, dans les troubles anxieux-dépressifs chez l'Homme est soulignée par l'importance prise par la pharmacopée 5-HT dans le traitement de ces pathologies. En effet, un des traitements de choix de la dépression passe par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la recapture de la 5-HT (SSRI : *Selective Serotonin Reuptake Inhibitor*) qui ciblent son transporteur plasmique (SERT). Mais 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.

Une forte proportion des neurones sérotoninergiques des noyaux du RD et RM exprime l'ARNm de VGLUT3. Dans les neurones 5-HT, on trouve VGLUT3 au niveau des corps cellulaires et des dendrites de ces neurones (Gras *et al.*, 2002; Mintz & Scott, 2006; Commons, 2009; Jackson *et al.*, 2009; Amilhon *et al.*, 2010; Soiza-Reilly & Commons, 2011). Dans les neurones qui l'expriment, il semble que VGLUT3 ne soit pas présent dans toutes les terminaisons 5-HT (Fremeau *et al.*, 2002; Schafer *et al.*, 2002; Amilhon *et al.*, 2010; Gagnon & Parent, 2014). Cette observation conforte l'existence d'un mécanisme complexe d'adressage des différents types de VSs vers les terminaisons axonales des neurones sérotoninergiques (Gagnon & Parent, 2014). VGLUT3 est détecté au niveau de certaines terminaisons sérotoninergiques dans le cortex cérébral et l'hippocampe (Schafer *et al.*, 2002; Shutoh *et al.*, 2008; Amilhon *et al.*, 2010) (**Figure 22**).

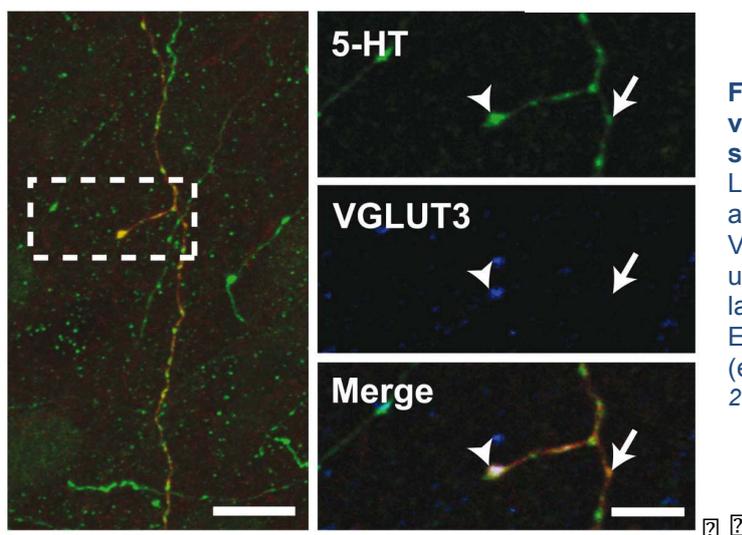


Figure 22. Colocalisation de 5-HT (en vert) et VGLUT3 (en bleu) dans un segment axonal du cortex moteur. La tête de flèche montre une varicosité axonale contenant de la 5-HT et VGLUT3 tandis que la flèche indique une terminaison axonale contenant de la 5-HT mais dépourvue de VGLUT3. Echelle : à gauche 10 μ m et à droite (encart) 5 μ m (d'après Gagnon et Parent, 2014)

Les terminaisons qui expriment à la fois la 5-HT et VGLUT3 sont rarement SERT-positives (Hioki *et al.*, 2004; Amilhon *et al.*, 2010). Les varicosités sérotoninergiques du bulbe olfactif, de l'amygdale et de l'aire tegmentale ventrale expriment également VGLUT3 (Shutoh *et al.*, 2008; Zhang & Morales, 2010).

En 1990, Kaneko et collaborateurs décrivent la présence de la glutaminase activée par le phosphate et formulent l'hypothèse que les neurones 5-HT pourraient utiliser le glutamate comme co-transmetteur (Kaneko *et al.*, 1990). Par la suite, Johnson rapporte la libération de glutamate par des neurones sérotoninergiques en microculture et une activation des récepteurs AMPA (Johnson, 1994). Dans une étude plus récente, une stimulation optogénétique de fibres axonales provenant des neurones des noyaux du raphé induit des

réponses synaptiques médiées par les récepteurs AMPA dans les interneurons GABAergiques de l'hippocampe (Varga *et al.*, 2009). Ces observations suggèrent qu'une proportion de neurones sérotoninergiques sont capables de libérer du glutamate et de la 5-HT dans leurs différentes régions cibles. Ceci pourrait jouer un rôle significatif dans la plasticité neuroadaptative qui a lieu pendant le développement et les maladies neurologiques.

Grâce à l'utilisation de souris VGLUT3-KO, Amilhon et collaborateurs ont montré que la présence de VGLUT3 facilitait : 1) la capture de 5-HT par le transporteur vésiculaire des monoamines de type 2 (VMAT2) et 2) la libération de 5-HT dans l'hippocampe et le cortex cérébral. Les souris VGLUT3-KO présentent un phénotype anxieux. Par contre, l'absence de VGLUT3 ne semble pas affecter les autres comportements régulés par la 5-HT comme l'agressivité et la résignation (Amilhon *et al.*, 2010). Les observations d'Amilhon et collaborateurs suggèrent que VGLUT3 délimite un sous-groupe de neurones 5-HT impliqué dans la régulation de certains troubles de l'humeur.

Le rôle de VGLUT3 dans la réponse au stress hypoxique chez les nouveaux-nés a été étudié anatomiquement, biochimiquement et électrophysiologiquement par Miot et collaborateurs (Miot *et al.*, 2012). L'absence de VGLUT3 n'affecte pas l'organisation histologique du système respiratoire du tronc cérébral ou l'activité respiratoire dans des conditions normales. Par contre, les réponses respiratoires et thermogéniques sont perturbées en conditions extrêmes (froid, hypoxie). Ces résultats suggèrent que l'expression de VGLUT3 est nécessaire pour avoir une réponse optimale au stress hypoxique chez les nouveaux-nés (Miot *et al.*, 2012).

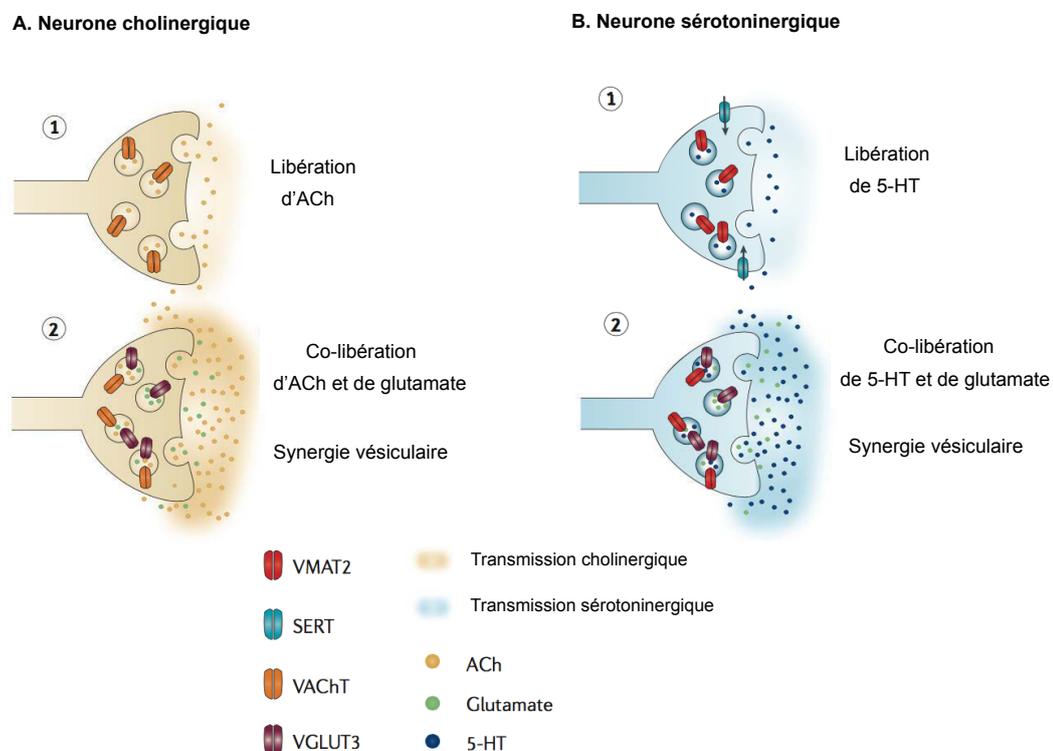
III.5. La synergie vésiculaire

En plus de permettre la libération de glutamate dans des neurones utilisant d'autres NT, la présence de VGLUT3 dans ces terminaisons axonales a d'autres conséquences fonctionnelles. En effet, elle permet d'augmenter l'accumulation du premier NT dans la VS et donc d'augmenter sa libération dans la fente synaptique. Cela a été démontré pour les interneurons cholinergiques du striatum et les neurones sérotoninergiques des noyaux du raphé qui expriment VGLUT3 (Gras *et al.*, 2008; Amilhon *et al.*, 2010).

L'existence de la synergie vésiculaire a été également suggéré pour VGLUT2 dans les neurones dopaminergiques et les interneurons GABAergiques (Hnasko *et al.*, 2010; Zander *et al.*, 2010). Récemment, il a été montré que VGLUT2 et VIAAT étaient colocalisés

dans les mêmes terminaisons nerveuses des neurones de l'aire tegmentale ventrale projetant sur l'habenula latérale et que ces terminaisons libéraient du glutamate et du GABA (Root *et al.*, 2014).

En 2008, notre équipe a montré que VGLUT3 et VACHT étaient colocalisés sur les mêmes VSs striatales et que l'accumulation d'ACh radiomarquée au tritium était augmentée (+200%) en présence de glutamate dans les VSs VGLUT3-positives du striatum (Gras *et al.*, 2008). Cet effet n'est pas observé avec les vésicules du cortex, de l'hippocampe ou du tronc cérébral de rats sauvages et avec les vésicules striatales des souris VGLUT3-KO. De plus, les souris VGLUT3-KO présentent un phénotype hypocholinergique (Gras *et al.*, 2008). Cette coopération entre les deux transporteurs vésiculaires a été appelée la synergie vésiculaire (**Figure 23A**).



2

Figure 23. Synergie vésiculaire cholinergique (A) et sérotoninergique (B).

La présence de VGLUT3 augmente l'accumulation soit d'acétylcholine (ACh, A2) par VACHT soit de sérotonine (5-HT, B2) par VMAT2 dans les VSs et la libération de ces NT dans la fente synaptique. Il y a également libération de glutamate (point vert) (d'après El Mestikawy *et al.*, 2011).

Les expériences réalisées sur les souris VGLUT3-KO ont également permis de montrer que la synergie vésiculaire entre VGLUT3 et VMAT2 avait lieu dans les terminaisons 5-HT de l'hippocampe et du cortex prélimbique (Shutoh *et al.*, 2008; Amilhon *et al.*, 2010). Or comme nous l'avons vu, les terminaisons sérotoninergiques VGLUT3-positives ne contiennent pas SERT (Shutoh *et al.*, 2008; Amilhon *et al.*, 2010). Cela suggère que ces

terminaisons ont la capacité de délivrer localement un signal fort et prolongé de 5-HT à travers une libération du NT augmentée (par la synergie vésiculaire) et d'une recapture réduite (par l'absence de SERT). Cela suggère que la force de transmission de la 5-HT varie dans l'espace et le temps selon la composition en transporteurs membranaires et vésiculaires des terminaisons synaptiques des neurones sérotoninergiques (**Figure 23B**).

Le mécanisme sous-jacent la synergie vésiculaire entre le glutamate et d'autres NT est encore mal compris. Il a été proposé que la présence des VGLUTs résulte d'une plus forte acidification de la vésicule (augmentation du gradient de pH) (El Mestikawy *et al.*, 2011). Cela permettrait à VMAT2 et VACHT d'accumuler une plus grande quantité de leur NT respectif dans les VSs puisque ce sont des transporteurs qui utilisent essentiellement l'énergie générée par le ΔpH du gradient de proton (Gras *et al.*, 2008; Hnasko *et al.*, 2010). Cependant, les autres anions transportés par les VGLUTs (chlore, Pi) pourraient jouer un rôle dans la synergie vésiculaire (**Figure 24**).

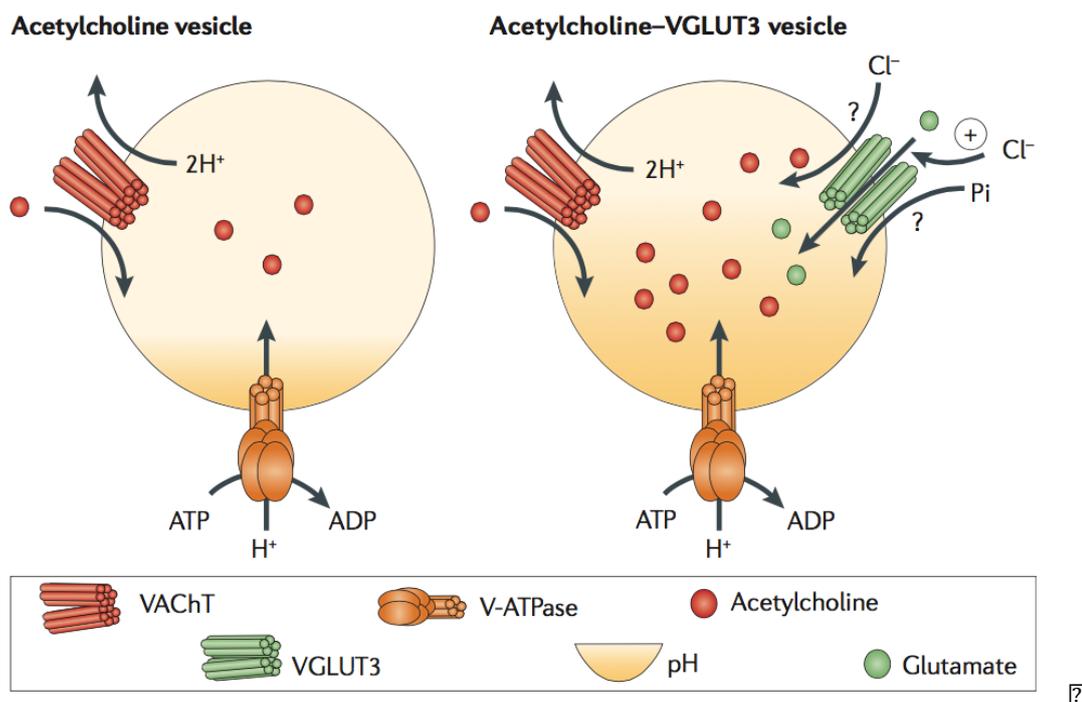


Figure 24. Mécanisme moléculaire proposé pour la synergie vésiculaire.

L'accumulation vésiculaire de NT se fait grâce à la création d'un gradient électrochimique (μH^+) à travers la membrane dépendant de l'activité de la V-ATPase. La capture d'ACh et de sérotonine à travers VACHT et VMAT2, respectivement, est dépendante du gradient de pH (ΔpH). Au contraire, la fonction des VGLUTs dépend du gradient électrique ($\Delta\psi$), la deuxième composante du gradient électrochimique. L'accumulation du GABA dans les VSs dépend des deux composantes du gradient électrochimique. Les propriétés stochiométriques de VACHT et VMAT2 sont : entrée d'une molécule pour deux protons expulsés. Cela a pour conséquence une rapide dissipation du ΔpH . La présence de VGLUT sur ces vésicules entrainerait une plus grande acidification de la vésicule, permettant ainsi à VACHT et VMAT2 d'accumuler plus de NT dans la lumière de la vésicule (schéma de droite). Le rôle des anions transportés par VGLUT dans la synergie vésiculaire est encore inconnu (d'après El Mestikawy *et al.*, 2011).

III.6. VGLUT3 hors du cerveau

III.6.a. VGLUT3 dans la moelle épinière et dans la racine dorsale

En plus d'assurer de nombreuses fonctions dans le cerveau, le glutamate est impliqué dans les circuits nociceptifs de la moelle épinière. Dans la corne dorsale, le glutamate est libéré par les fibres afférentes primaires des ganglions de la racine dorsale (DRG) et par des interneurons locaux excitateurs. Il participe à la transmission sensorielle (pour revue (Millan, 1999)). De plus, la libération de glutamate est impliquée dans le contrôle moteur à travers une modulation directe ou indirecte de l'activité des motoneurons (Kiehn *et al.*, 2000; Nishimaru *et al.*, 2005).

Dans la moelle épinière, contrairement à VGLUT1 et VGLUT2, VGLUT3 a une distribution beaucoup plus restreinte. L'ARNm de VGLUT3 est présent dans les cornes dorsales et ventrales de la moelle, ainsi que dans les ganglions de la racine dorsale (Oliveira *et al.*, 2003; Landry *et al.*, 2004). Au niveau protéique, VGLUT3 est présent dans la matière grise spinale, beaucoup plus faiblement que VGLUT1 et VGLUT2, et dans la matière blanche, seulement quelques fibres sont détectées (Oliveira *et al.*, 2003; Landry *et al.*, 2004).

VGLUT3 est exprimé dans une petite sous-population de neurones dans le DRG dont les afférences projettent dans la lamina I et dans la couche profonde de la lamina II de la corne dorsale de la moelle épinière (Seal *et al.*, 2009). Grâce aux souris VGLUT3-KO, les auteurs ont démontré que VGLUT3 était impliqué dans les mécanismes d'hypersensibilité suite au trauma, aux blessures des nerfs et aux inflammations (Seal *et al.*, 2009).

III.6.b. VGLUT3 dans le tractus solitaire

VGLUT3 a été détecté dans les cellules et les fibres du noyau du tractus solitaire (NTS). Il est présent dans des neurones nitroxydergiques du NTS ainsi que dans les neurones projetant sur le NTS via le nerf aortique dépresseur. Dans ces neurones, VGLUT3 et l'oxyde nitrique synthase neuronale (nNOS) sont colocalisés au niveau périsonatique et dans les terminaisons (**Figure 25**). Le NTS et les noyaux environnants sont impliqués dans le contrôle des réflexes cardiovasculaires. Le nerf aortique dépresseur véhicule les informations de pression et de pH sanguins. Le glutamate et l'oxyde nitrique (NO) pourraient donc participer à la régulation des fonctions cardiaques (Lin & Talman, 2005; 2006; Lin *et al.*, 2012).

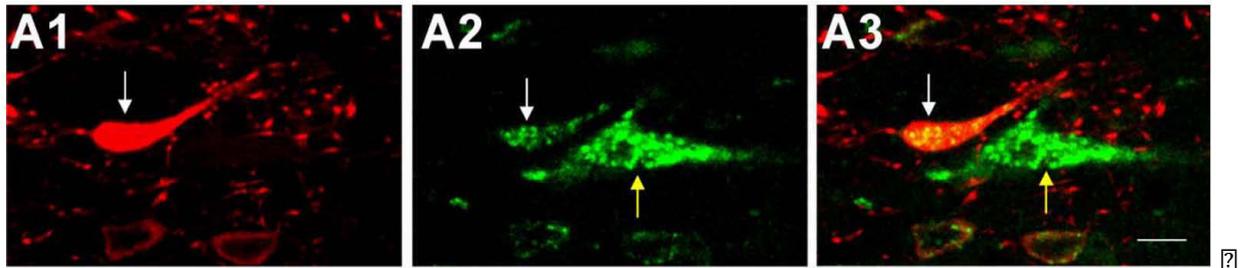


Figure 25. VGLUT3 est présent dans les neurones nitroxydergiques du NTS.

Images confocales de cellules du NTS immunomarquées pour VGLUT3 (A1, en rouge) et pour la nNOS (A2, en vert). (A3) Superposition des images A1 et A2. La flèche blanche indique un neurone doublement marqué par VGLUT3 et nNOS apparaissant en jaune dans l'image A3. La flèche jaune indique une cellule seulement marquée par VGLUT3. Echelle : 5 μm (d'après Lin et Talman, 2005).

III.6.c. VGLUT3 dans les organes périphériques

VGLUT3 est aussi présent dans des organes périphériques. En effet, les analyses par northern blot ont établi son expression dans le foie et de manière très faible dans les reins (Fremeau *et al.*, 2002; Gras *et al.*, 2002). Dans ces organes, VGLUT3 pourrait véhiculer une transmission glutamatergique locale ou servir à tamponner les excès cytoplasmiques de glutamate. Certains auteurs rapportent la présence de VGLUT3 dans le muscle squelettique (Boulland *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2004).

III.6.d. VGLUT3 dans la rétine

La rétine permet de convertir la lumière en signal électro-chimique par des cellules hautement spécialisées, les photorécepteurs (cônes et bâtonnets) et ainsi transmettre les informations visuelles au SNC. Les photorécepteurs et les cellules bipolaires de la rétine libèrent du glutamate au niveau de synapses à ruban dans les couches plexiformes externes et internes (OPL et IPL, respectivement) ce qui provoque le traitement du signal le long des voies visuelles ON et OFF. Les cellules amacrines (ACs), qui régulent le transfert des signaux entre les cellules bipolaires et les cellules ganglionnaires, libèrent du GABA ou de la glycine (Wassle *et al.*, 2009; Masland, 2012) (**Figure 13**). Ces cellules constituent la majorité des interneurons inhibiteurs que possède la rétine. Elles possèdent une remarquable diversité morphologique et moléculaire. En effet, l'œil de la souris contient plus de 50 types différents de cellules amacrines (Pourcho & Goebel, 1985; Mosinger *et al.*, 1986; MacNeil & Masland, 1998; Marc & Liu, 2000). Le rôle de ces cellules n'est pas encore très bien compris. La récente découverte de la présence de VGLUT3 dans une sous-population de cellules amacrines situées dans la couche plexiforme interne chez le rat, la souris, le

macaque et le pigeon indique que ces cellules pourraient être le premier type de cellules amacrines excitatrices décrit dans la rétine (**Figure 13**) (Fremeau *et al.*, 2002; Haverkamp & Wassle, 2004; Johnson *et al.*, 2004; Gong *et al.*, 2006; Stella *et al.*, 2008; Grimes *et al.*, 2011; Atoji & Karim, 2014). Les ACs VGLUT3-positives constituent un petit sous-ensemble (environ 1%) de la totalité des ACs dans la rétine des mammifères. Elles possèdent de forts taux de glycine, expriment le transporteur plasmique de la glycine (GlyT1 chez le rat) et forment des contacts synaptiques en face desquels sont présents des récepteurs glycinergiques (**Figure 26**) (Haverkamp & Wassle, 2004). En revanche, ces cellules n'expriment pas le transporteur vésiculaire de la glycine, VIAAT ni les autres NTs que l'on retrouve dans les cellules amacrines (*i.e.*, GABA, ACh et/ou dopamine) (Haverkamp & Wassle, 2004). L'expression de VGLUT3 dans ces cellules est observée au bout de 10 jours après la naissance dans le corps cellulaire et de 15 jours après la naissance dans les prolongements, contrairement à VGLUT1 et VGLUT2 qui apparaissent plus tôt dans le développement (Stella *et al.*, 2008). Chez l'homme, VGLUT3 est restreint à quelques cellules ganglionnaires de la rétine (Gong *et al.*, 2006).

Les ACs VGLUT3-positives reçoivent des informations directement des cellules bipolaires par les récepteurs NMDA et elles établissent des contacts synaptiques avec les cellules ganglionnaires de la rétine. Le récepteur métabotrope au glutamate mGluR4 est exprimé au niveau de ces synapses (Johnson *et al.*, 2004; Grimes *et al.*, 2011). Ces cellules répondent aux augmentations de lumière (voie ON) ainsi qu'aux réductions de lumière (voie OFF).

Récemment, il a été montré que les ACs VGLUT3-positives étaient capables de libérer du glutamate de façon dépendante du calcium, contredisant ainsi la vision conventionnelle que les ACs sont seulement inhibitrices. Les ACs VGLUT3-positives fourniraient donc une entrée glutamatergique excitatrice aux cellules ganglionnaires ON-OFF et à celles sélectives de la direction d'un stimulus en mouvement (Lee *et al.*, 2014).

Chez les souris VGLUT3-KO, l'excitation synaptique des cellules ganglionnaires appelées W3 est diminuée et les réponses aux mouvements des objets sont supprimées (Seal *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2015). Les ACs VGLUT3-positives agiraient comme des détecteurs d'objets en mouvement. En effet, les mouvements d'objets seraient, en premier, détectés par les ACs VGLUT3-positives, qui fourniraient l'entrée excitatrice sélective aux cellules ganglionnaires W3 auxquelles elles sont connectées (Kim *et al.*, 2015).

Les propriétés physiologiques et les caractéristiques anatomiques des ACs VGLUT3-positives suggèrent que ces interneurons jouent un rôle dans la désinhibition du signal et /ou l'inhibition croisée entre les voies parallèles dans la rétine mais leurs rôles et leurs

interactions avec les cellules ganglionnaires de la rétine durant le traitement sensoriel restent encore mal compris.

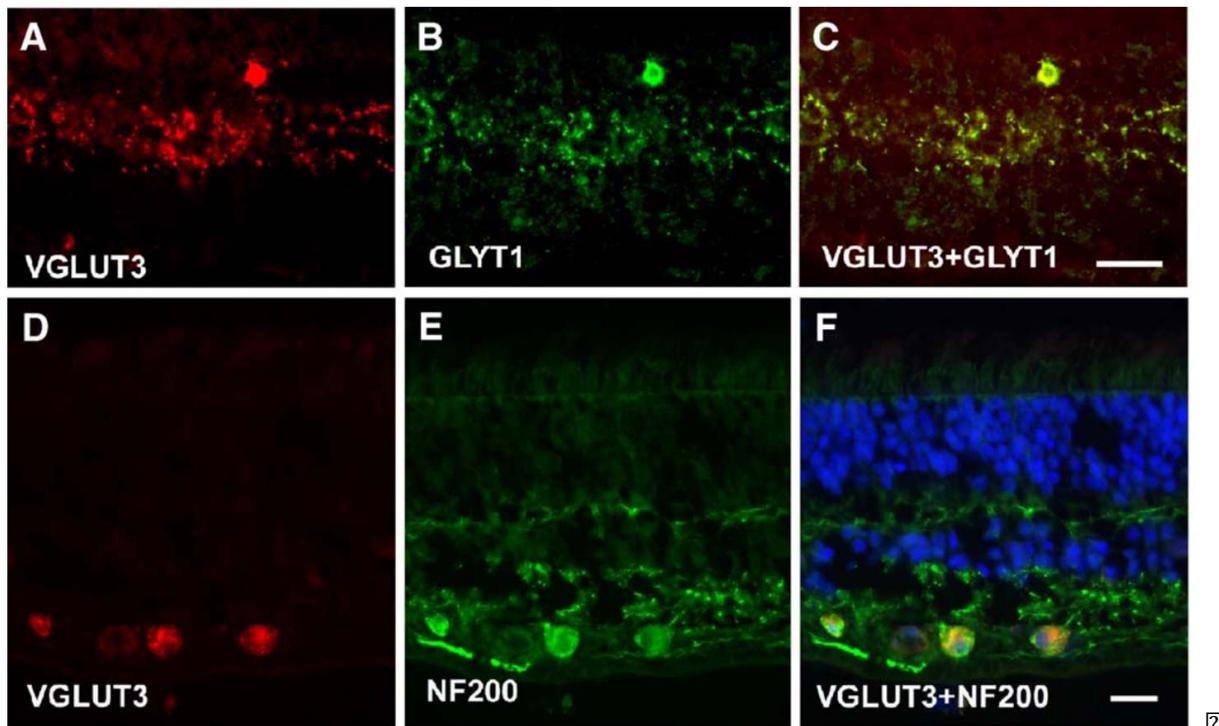


Figure 26. Distribution de VGLUT3 dans la rétine de rat et d'Homme.

Section de la rétine de rat immunomarquée avec VGLUT3 (A) et le transporteur de la glycine 1 (GLYT1) (B). L'image de superposition (C) démontre la totale colocalisation de VGLUT3 et GLYT1 dans la rétine de rat. En D et E, section de la rétine d'homme immunomarquée par VGLUT3 (D) et les neurofilaments 200 (NF200) qui marquent spécifiquement les cellules ganglionnaires (E). Le marquage VGLUT3-positif observé en D est présent dans les cellules ganglionnaires NF200-positives de la rétine humaine (colocalisation en F). Les noyaux des cellules sont marqués par le DAPI (en bleu, F). Echelle : 10 μm (d'après Gong et al., 2006).

IV. VGLUT3 dans le système auditif

L'audition est un de nos sens les plus performants. Ses mécanismes qui sont l'aboutissement de millions d'années d'évolution sont, à ce titre, extrêmement complexes et perfectionnés. En contrepartie, l'audition est un sens fragile qui subit l'attaque du temps de manière irréversible.

Le système auditif humain a des capacités remarquables puisque sa sensibilité s'étend sur une plage de fréquences audibles allant de 20 Hz à 20 kHz. De plus, les capacités de discrimination aussi bien en fréquence qu'en intensité sont excellentes. Cette sensibilité est

étonnante au vu du faible nombre de cellules sensorielles dont dispose la cochlée (3500 cellules ciliées internes) en comparaison avec les millions de cellules photosensibles de l'œil.

La complexité de fonctionnement de la chaîne de traitement que constitue l'oreille permet la transformation des vibrations aériennes en messages nerveux intégrables par le SNC. L'oreille humaine (**Figure 27**) est subdivisée en trois éléments de nature et de fonction différentes mais complémentaires : oreille externe, oreille moyenne et oreille interne.

Captées par l'oreille externe, les vibrations acoustiques sont transmises par l'oreille moyenne au milieu liquidien de la cochlée, organe de l'audition de l'oreille interne. Au sein de la cochlée, les vibrations provoquent la mise en mouvement des liquides et des différentes membranes qui la constituent. Ces mouvements provoquent à leur tour l'inclinaison des stéréocils des cellules ciliées déclenchant ainsi l'activation des fibres nerveuses des neurones du ganglion spiral. Ces dernières transmettent alors un message électrique vers le cortex cérébral en passant par différents relais dont le noyau cochléaire, le complexe olivaire supérieur, les noyaux du lemniscus latéral, le colliculus inférieur, le thalamus puis le cortex auditif.

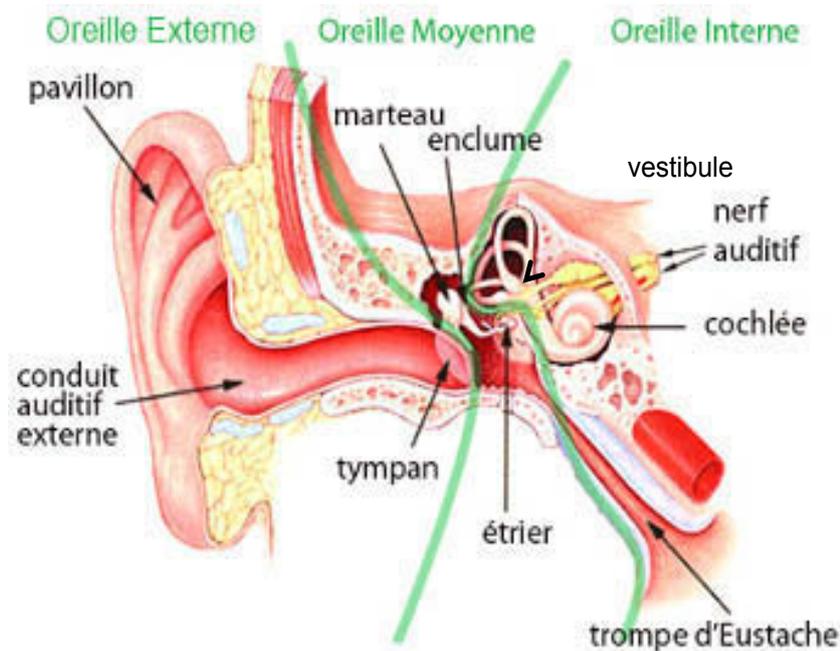


Figure 27. Schéma de l'appareil auditif humain.

L'organisation de l'oreille humaine est représentative de celles de tous les mammifères. L'oreille externe est constituée du pavillon, du conduit auditif externe et de la face externe du tympan. Son rôle est de capter les ondes sonores. L'oreille moyenne qui met en relation le tympan avec la fenêtre ovale de la cochlée correspond à la face interne du tympan et à la chaîne des osselets (étrier, l'enclume et le marteau). L'oreille interne est formée par la cochlée, organe de l'audition et les organes de l'équilibre. La trompe d'Eustache met en relation l'oreille moyenne avec la cavité buccale et permet d'équilibrer les pressions de part et d'autre du tympan (*adaptée de www.annuaire-audition.com*).

IV.1. Oreille externe et moyenne

L'oreille externe est constituée chez les mammifères par le pavillon et le conduit auditif externe (**Figure 27**). Elle capte les vibrations et les transmet vers l'oreille moyenne dont les osselets, localisés entre le tympan et la fenêtre ovale de la cochlée, assurent l'adaptation d'impédance nécessaire pour que les vibrations sonores soient transmises sans réflexion aux milieux liquidiens de l'oreille interne. L'oreille moyenne est une cavité remplie d'air qui communique avec le pharynx par la trompe d'Eustache afin d'équilibrer les pressions (**Figure 27**).

L'oreille externe assure principalement une fonction de protection du tympan, d'amplification des sons et permet la localisation des sources sonores. L'oreille moyenne, quant à elle, est essentielle à la transmission sonore puisqu'elle constitue un adaptateur d'impédance sans lequel une grande partie de l'énergie acoustique serait perdue. Elle permet également de protéger, par réflexe, l'oreille interne contre les sons de fort niveau, en mettant en jeu les muscles stapédiens (de l'étrier). Ces muscles en se contractant, augmentent la rigidité de la chaîne tympano-ossiculaire et réduisent ainsi la transmission sonore vers l'oreille interne. Mais cette protection est néanmoins limitée en durée, en fréquence et en niveau.

IV.2. Oreille interne

L'oreille interne comporte deux organes sensoriels : le vestibule, organe de l'équilibre et la cochlée, organe de l'audition (**Figure 27**).

L'oreille interne est l'organe principal de l'audition car elle permet la transformation du signal acoustique en message nerveux. Son anatomie et sa physiologie très complexes sont à l'origine des capacités auditives très performantes dont disposent les mammifères.

La cochlée qui est encapsulée dans la capsule optique permet la propagation des ondes de pression générées par les sons. Elle est constituée d'un ensemble de trois tubes remplis de liquide et enroulés en spirale autour d'un axe osseux, le modiolus :

- les rampes tympanique et vestibulaire remplies par la périlymphe
- le canal cochléaire rempli d'endolymphe, situé entre les rampes vestibulaire et tympanique.

Les rampes tympaniques et vestibulaires communiquent entre elles à l'apex de la cochlée par un petit trou nommé hélicotreme. Elles sont isolées de l'oreille moyenne au

niveau du pôle basal de la cochlée par les membranes de la fenêtre ovale pour la rampe vestibulaire et de la fenêtre ronde pour la rampe tympanique. Ces deux rampes encadrent le canal cochléaire. La rampe tympanique et le canal cochléaire sont séparés par la membrane basilaire qui porte l'organe de Corti (**Figure 28 et 30**).

Les vibrations sonores transmises par les osselets mettent en vibration la membrane de la fenêtre ovale propageant ainsi l'onde de pression générée par les sons le long de la cochlée.

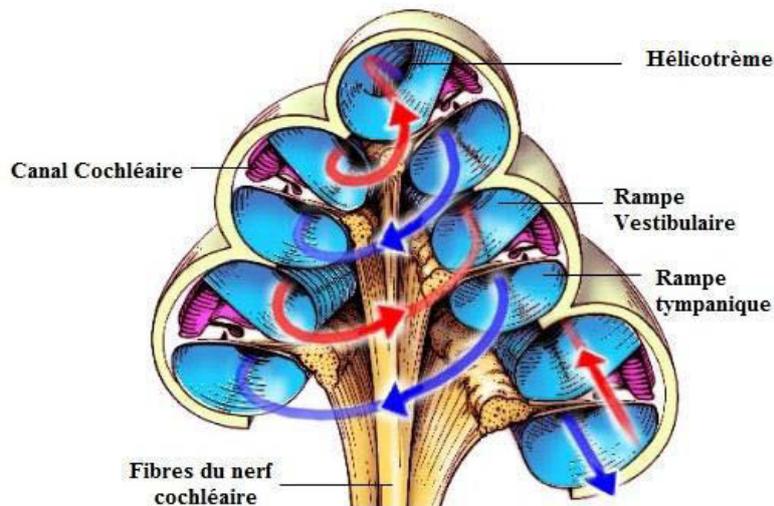


Figure 28. Section axiale de la cochlée de mammifère.

La cochlée est formée de trois canalicules enroulés en spirale autour d'un axe osseux. Les rampes vestibulaire et tympanique communiquent entre elles au niveau de l'hélicotrème situé à l'apex de la cochlée et sont remplies de périlymphe (bleu). Elles entourent le canal cochléaire qui est rempli d'endolymphe (prune). L'organe de Corti se trouve entre le canal cochléaire et la rampe tympanique. Il repose sur la membrane basilaire qui le sépare de la rampe tympanique. La flèche rouge vient de la fenêtre ovale et la flèche bleue aboutit à la fenêtre ronde. Les éléments nerveux (représentés en jaune) sont le ganglion spiral et les fibres du nerf cochléaire ou auditif (*d'après S. Blatrix, www.cochlea.eu*).

L'organe sensoriel essentiel pour l'audition est l'organe de Corti. Il se trouve entre le canal cochléaire et la rampe tympanique. Il est composé de cellules sensorielles appelées les cellules ciliées, de fibres nerveuses et de structures annexes ou de support qui reposent sur la membrane basilaire (**Figure 29 et 30**).

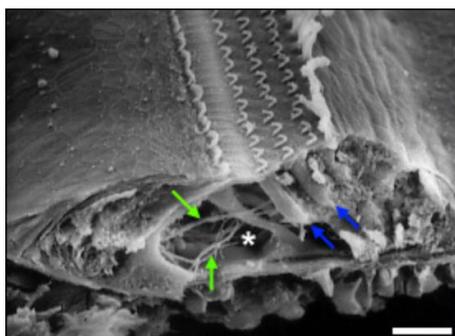


Figure 29. Image de microscopie à balayage de l'organe de Corti.

La surface (avec les stéréocils) des cellules ciliées et l'intérieur de l'organe de Corti sont visibles. Les flèches bleues indiquent les corps cellulaires de 2 CCEs, l'astérisque le tunnel de Corti traversé par des fibres nerveuses (flèches vertes). Echelle : 20 μm (*d'après M Lenoir*).

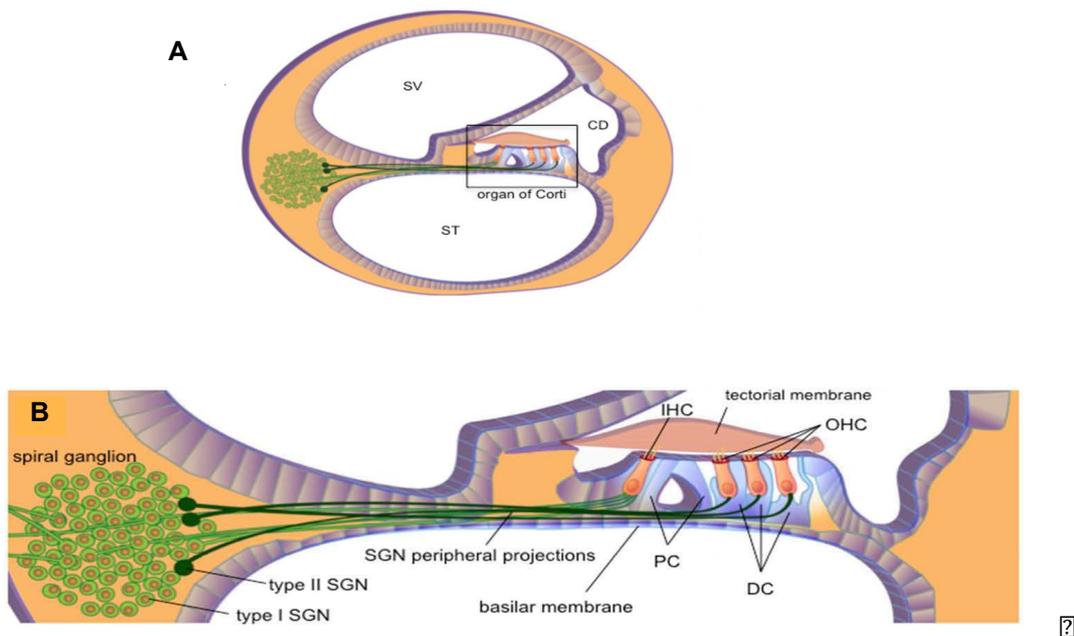


Figure 30. Représentation schématique d'une section transversale de cochlée (A) avec un zoom sur l'organe de Corti (B).

(A) La rampe tympanique (ST) et la rampe vestibulaire (SV) entourent le canal cochléaire (CD) dans lequel se trouve l'organe de Corti. (B) L'organe de Corti est composé d'une rangée de cellules ciliées internes (CCI ou IHC) et de trois rangées de cellules ciliées externes (CCE ou OHC). La membrane tectoriale (tectorial membrane), flottant dans l'endolymphe coiffe les stéréocils des cellules ciliées. La CCI est entourée de cellules de soutien (PC). Les CCE sont ancrées sur les cellules de Deiters (DC). Les fibres nerveuses des neurones de type I ou II du ganglion spiral (SGN peripheral projections) gagnent ou quittent l'organe de Corti au travers de la membrane basilaire (basilar membrane). Les neurones de type I et II qui se connectent respectivement aux CCI ou aux CCE ont leur corps cellulaire dans le ganglion spiral (spiral ganglion) (d'après Delacroix & Malgrange, 2015).

Les cellules sensorielles ont pour rôle d'assurer la transduction des informations mécaniques en signaux électrochimiques. Elles possèdent à leur pôle apical une centaine de stéréocils répartis en trois rangées de tailles différentes. Les stéréocils baignent dans l'endolymphe et le corps cellulaire dans le compartiment périlymphatique. Les stéréocils sont reliés entre eux par des liens transversaux et par des liens terminaux (*tip-links*) directement impliqués dans la transduction de l'information. En effet, à l'extrémité basse des *tip-links*, on retrouve des canaux sensibles à l'étirement qui s'ouvrent lors de la déflexion des cils provoquant ainsi un influx de cations qui dépolarise la cellule ciliée. En effet, ces stéréocils sont mis en mouvement par les mouvements de la membrane basilaire. Leurs mouvements déclenchent l'ouverture des canaux sensibles à l'étirement permettant ainsi l'entrée de potassium dans les cellules sensorielles et la génération de potentiels de récepteurs. Il s'ensuit une libération de NT et la transmission de l'information sonore au SNC par les fibres nerveuses du ganglion spiral (Fettiplace & Kim, 2014).

Il existe deux types de cellules sensorielles :

- les cellules ciliées externes (CCE) qui sont 12 500 par cochlée.
- les cellules ciliées internes (CCI), dont le nombre par cochlée est de 3 500

Leur nombre est fixé très tôt dans le développement (10 semaines de gestation chez l'Homme). Chez les mammifères, les cellules ciliées endommagées ou détruites au cours de la vie ne sont pas remplacées. Par contre, chez les non mammifères, ces cellules peuvent se régénérer après qu'elles aient été endommagées ou perdues (Corwin & Oberholtzer, 1997; Brignull *et al.*, 2009; Rubel *et al.*, 2013)(pour revue(Monroe *et al.*, 2015)). Elles diffèrent par la forme de leur corps cellulaire (en poire pour la CCI et en cylindre pour la CCE), l'arrangement des stéréocils (en ligne pour la CCI et en W pour la CCE) ainsi que par les connexions qu'elles établissent avec le SNC et leurs fonctions. Elles reçoivent une double innervation, afférente et efférente (**Figure 31**).

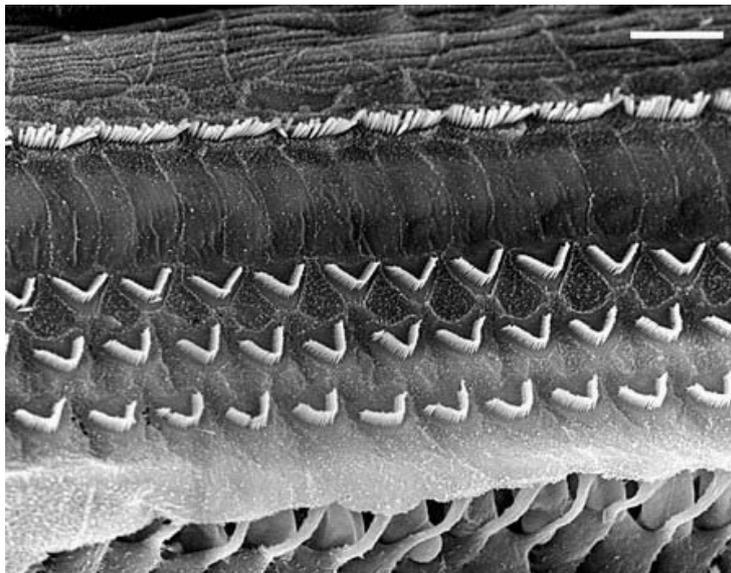


Figure 31. Microscopie à balayage de l'arrangement des cellules ciliées à la base de la cochlée. Vue de surface des CCI (rangée du haut) et des CCE (3 rangées du bas) séparées par les piliers. Les stéréocils des CCI sont rangés en ligne alors que ceux des CCE sont en W. Sous les CCE, une cassure permet d'apercevoir les piliers des cellules de Deiters. Echelle : 15 μm (d'après M Lenoir).

IV.2.a. Les cellules ciliées externes

Disposées en trois rangées du côté externe du tunnel de Corti, les CCE sont des cellules sensorielles tout à fait uniques. Elles sont au nombre de 12 000 chez l'Homme. Elles ont une taille variable de forme cylindrique et sont plus grandes à l'apex qu'à la base de la

cochlée. Leurs stéréocils sont disposés en W, les plus longs étant ancrés dans la membrane tectoriale (**Figure 29 et 31**).

Les CCE ont pour rôle d'amplifier et d'améliorer la sélectivité en fréquence de la transduction effectuée par les CCI. Par leurs contractions rapides, les CCE modulent la transduction du signal en amplifiant les mouvements de la membrane basilaire en un point précis dépendant de la fréquence de la stimulation. L'action d'amplificateur cochléaire des CCE est responsable de la fine sensibilité et de l'excellente discrimination des fréquences de l'audition des mammifères (Ashmore, 1987; Ashmore & Gale, 2004; Dallos *et al.*, 2008).

Les CCE ont une organisation synaptique correspondant à leurs propriétés électro-contractiles. Très richement innervées par les terminaisons du système efférent médian qui régulent leur électromotilité, elles sont connectées au SNC par le système afférent spiral (neurone de type II) dont le rôle est encore assez flou (**Figure 30 et 32**) (Spoendlin, 1972; Kiang *et al.*, 1982; Robertson, 1984). Les neurones de type II constituent 5% de la population neuronale du ganglion spiral (Spoendlin, 1967). Ces neurones ne sont pas myélinisés (Romand & Romand, 1984; Brown, 1987). Chaque neurone de type II établit des synapses avec une dizaine de CCE différentes, appartenant généralement à la même rangée (Perkins & Morest, 1975; Simmons & Liberman, 1988). Récemment, il a été montré que la synapse entre les CCE et les afférences de type II est glutamatergique. La probabilité de libération des vésicules dans les CCE est faible (Weisz *et al.*, 2009; Weisz *et al.*, 2012). La fréquence et l'amplitude des courants post-synaptiques excitateurs dans les neurones de type II sont bas et ont une cinétique très lente. Il est donc nécessaire de sommer plusieurs stimulations pour produire un potentiel d'action dans les afférences des neurones de type II (Weisz *et al.*, 2009; Weisz *et al.*, 2012; Weisz *et al.*, 2014). Les récepteurs AMPA ne sont pas responsables de cette réponse puisqu'ils ne sont pas présents dans les neurones de type II (Matsubara *et al.*, 1996; Liberman *et al.*, 2011). Par contre, Fujikawa et collaborateurs ont récemment montré que les récepteurs Kainate avec les sous-unités GluK2/GluK5 étaient présents sur les neurones de types II (Fujikawa *et al.*, 2014).

L'innervation efférente des CCE est assurée par les fibres provenant du système olivocochléaire efférent médian (MOC). L'ACh libéré par le système MOC agirait comme un système de rétrocontrôle pour optimiser l'amplification cochléaire en modulant l'activité des CCE (Liberman & Brown, 1986; LePage, 1989; Wersinger & Fuchs, 2011; Elgoyhen & Katz, 2012). D'autres NT et neuromodulateurs agissent sur la synapse efférente comme le GABA, le CGRP (Maison *et al.*, 2006; Maison *et al.*, 2009; Wedemeyer *et al.*, 2013). Ce système permet d'assurer une protection aux fortes intensités de stimulation en réduisant les gains de

sensibilité et de sélectivité en fréquence dus à l'activité des CCE (Puel *et al.*, 1988; Maison *et al.*, 2002). D'ailleurs, il a été récemment montré que la voie CCE-neurone primaire de type II jouerait un rôle dans le réflexe olivocochléaire éfférent qui est responsable d'un ajustement dynamique de la sensibilité de l'audition et de la sélectivité des fréquences (Froud *et al.*, 2015).

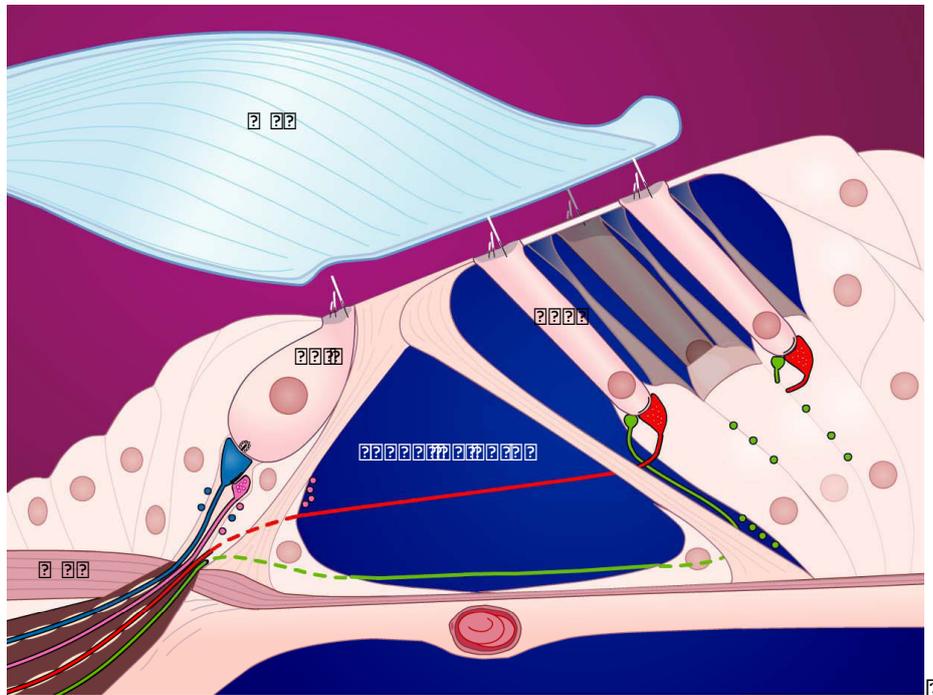


Figure 32. Représentation schématique des innervations afférentes et efférentes des CCE et des CCI.

Les CCE contactent synaptiquement les terminaisons dendritiques de petite taille des neurones ganglionnaires de type II (en vert) formant le système afférent. Elles sont innervées par des grosses terminaisons axoniques de neurones du complexe olivaire supérieur médian (MSO, en rouge). Les CCI sont connectées aux neurones auditifs primaires de type I du ganglion spiral (en bleu). Le système efférent (en rose) est issu de petits neurones de l'olive supérieure latérale et vient contacter les dendrites de la fibre afférente du neurone de type I. La membrane tectoriale (MT) est représentée en bleu clair. L'organe de Corti repose sur la membrane basilaire (MB) (d'après S Blatrix, Pujol 1999).

IV.2.b. Les cellules ciliées internes

Les CCI sont les véritables cellules sensorielles de la cochlée. Une cochlée humaine possède 3 000 à 3 500 CCI. Elles sont disposées en une seule rangée du côté interne du tunnel de Corti (**Figure 29 et 31**). Elles codent la fréquence et l'intensité de la stimulation sonore en message nerveux qui est ensuite véhiculé au cerveau par les fibres du nerf auditif (Moser & Beutner, 2000; Glowatzki & Fuchs, 2002). Dans la cochlée, les cellules sont ordonnées en fonction de leur fréquence caractéristique, ce que l'on appelle tonotopie. En effet, les cellules ciliées (CC) répondent à des fréquences différentes en fonction de leur

position le long de la cochlée. Cette organisation tonotopique est reproduite à tous les niveaux du système auditif central jusqu'au cortex avec un degré variable de précision. Les CCI répondant aux fréquences élevées se trouvent à la base de la cochlée et celles répondant aux basses fréquences sont à l'apex (**Figure 33**).

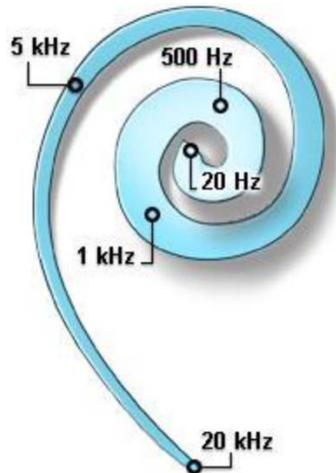


Figure 33. Organisation tonotopique de la cochlée.

Quelques fréquences caractéristiques sont indiquées en bleu. Les cellules ciliées se trouvant à la base de la cochlée détectent les hautes fréquences (20 kHz, 5kHz) alors que celles situées à l'apex détectent les basses fréquences (500 Hz, 20 Hz). On observe un gradient d'élargissement de la membrane basilaire depuis la base (20 kHz) jusqu'à l'apex (20 Hz) (d'après R Pujol).

Les CCI sont connectées à la totalité des neurones de type I dont les axones constituent 95% du nerf auditif (les 5% restants sont les axones des neurones de type II) (Spendlin, 1967). Une CCI forme des synapses avec 10 à 20 dendrites des neurones de type I du ganglion spiral (Meyer *et al.*, 2009). L'ensemble du neurone de type I du ganglion spiral est myélinisé sauf son unique branche périphérique qui perd sa myéline à l'entrée de l'organe de Corti. Ces neurones se connectent par un seul bouton dendritique à une seule CCI (**Figure 32**) (Kiang *et al.*, 1982; Liberman, 1982).

L'innervation efférente provenant de la voie olivo-cochléaire latérale (LOC) du tronc cérébral établit des contacts avec les dendrites afférentes des neurones de type I du nerf auditif, juste sous le bouton synaptique connecté à la CCI (**Figure 32**) (Warr & Guinan, 1979). Ces neurones efférents libèrent plusieurs NT comme l'ACh, le GABA, la dopamine et des neuromodulateurs comme la dynorphine, les enképhalines, le CGRP (Eybalin & Pujol, 1984; Altschuler *et al.*, 1985; Altschuler *et al.*, 1986; Lu *et al.*, 1987; Eybalin *et al.*, 1988; Drescher *et al.*, 2006). La dopamine pourrait d'ailleurs jouer un rôle important puisqu'elle maintient une inhibition partielle de l'activité des neurones auditifs primaires, les protégeant ainsi des effets néfastes d'une hyperexcitation (Ruel *et al.*, 2001; Ruel *et al.*, 2006).

IV.2.c. Les synapses à ruban

La neurotransmission entre les CCI et les neurones de type I du ganglion spiral se fait grâce à des synapses à ruban, structures synaptiques hautement spécialisées qui permettent une libération de NT rapide et soutenue (Safieddine *et al.*, 2012). Les caractéristiques fonctionnelles des synapses à ruban sont très importantes pour le codage fiable et précis des informations acoustiques (Parsons & Sterling, 2003). Les CCE forment également des synapses à ruban avec les neurones de type II du ganglion spiral. Mais la densité de ces synapses (1-2 par CCE) est beaucoup plus faible que pour les CCI car toutes les CCI font des synapses à ruban avec les neurones primaires de type I. La fonction des synapses à ruban des CCE-neurones de type II reste encore mal comprise (Knirsch *et al.*, 2007; Weisz *et al.*, 2009; Weisz *et al.*, 2012; Weisz *et al.*, 2014).

La synapse à ruban contient un ruban présynaptique qui est une structure dense aux électrons. Ces rubans présynaptiques, ancrés à la membrane plasmique dans la zone active et face à la densité postsynaptique, sont entourés de vésicules synaptiques (Nouvian *et al.*, 2006) (**Figure 33**). Il a été suggéré que les rubans présynaptiques concentrent le *pool* de vésicules synaptiques RRP au voisinage des canaux calciques de type $Ca_v1.3$ permettant ainsi une libération rapide, synchronisée de plusieurs vésicules et un rapide réapprovisionnement en vésicules après l'exocytose (Khimich *et al.*, 2005; Buran *et al.*, 2010; Frank *et al.*, 2010; Safieddine *et al.*, 2012). Dans la cochlée adulte, chaque zone active contient un seul ruban synaptique et est connectée par la terminaison dendritique d'un seul neurone auditif primaire de type I (Liberman, 1982). Les synapses à ruban ont une vitesse d'exocytose qui les classe parmi les synapses les plus rapides. Ainsi, dans la cellule auditive, 1400 vésicules par seconde peuvent fusionner en chaque site actif, un chiffre à comparer avec celui de 7 à 20 vésicules en moyenne par zone active et par seconde dans les synapses conventionnelles (non à ruban). Il est intéressant de noter que dans les CCI, la fusion intéresse plusieurs vésicules synaptiques simultanément. En effet, en moyenne 4 à 6 vésicules et au maximum 22, fusionnent de façon coordonnée dans les CCI. Lorsque l'intensité de la stimulation sonore augmente, ni le nombre de vésicule qui fusionne lors de chaque événement unitaire, ni leur cinétique de fusion ne varient. Seule la probabilité de survenue de ces événements unitaires c'est-à-dire leur fréquence se modifie. Les cellules dont la fréquence caractéristique est élevée, ont davantage de rubans (**Figure 34**).

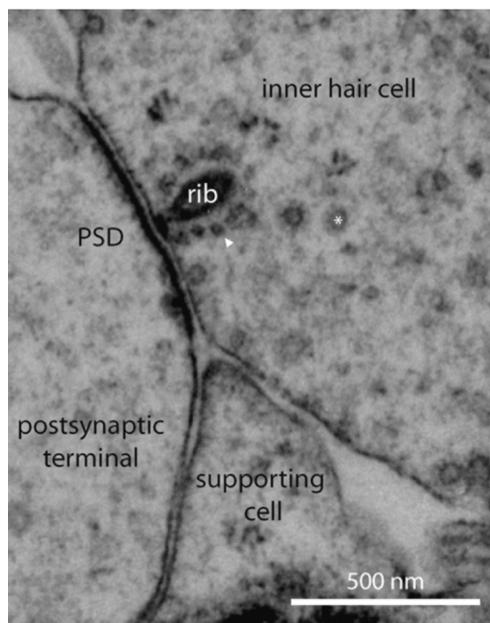


Figure 34. Synapse à ruban visualisée en microscopie électronique à transmission.

Le ruban (rib) est ancré dans la membrane plasmique d'une CCI (*inner hair cell*) et fait face à la densité postsynaptique (PSD) de la terminaison dendritique du neurone de type I (*postsynaptic terminal*). La tête de la flèche et l'astérisque indique une VS associée au ruban ou libre dans le cytoplasme, respectivement. Une cellule de support est visible (*supporting cell*) (d'après *Nouvian et al., 2006*).

Contrairement aux synapses conventionnelles du SNC, les synapses à ruban des CCI adultes n'utilisent pas les mêmes protéines pour la libération du NT dans la fente synaptique. En effet, malgré une détection des ARNm des SNAREs neuronales (SNAP 25, syntaxine-1 et synaptobrevine), l'exocytose des VS aux CCI se fait sans l'utilisation de ces protéines (*Nouvian et al., 2011*). De plus, ces synapses n'expriment ni la synaptophysine qui régule la machinerie synaptique (*Gil-Loyzaga & Pujol, 1988*), ni la synaptotagmine 1 et 2 qui sont les détecteurs calciques de la fusion vésiculaire des synapses conventionnelles, ni les complexines (*Strenzke et al., 2009; Beurg et al., 2010; Reisinger et al., 2011*). En revanche, les CCI expriment d'autres protéines qui semblent spécifiques aux synapses à ruban comme la protéine RIBEYE (**Figure 35**).

La protéine RIBEYE est le composant majeur des rubans synaptiques. Elle joue un rôle essentiel dans la formation de l'unité structurale du ruban et elle n'est présente que chez les vertébrés (*Schmitz et al., 2000; Magupalli et al., 2008; Regus-Leidig et al., 2009; Sheets et al., 2011*). Le ruban synaptique est ancré à la membrane plasmique grâce à la protéine Bassoon (*Khimich et al., 2005*). En effet, lorsque Bassoon est invalidé dans les CCI, les rubans synaptiques ne sont plus ancrés à la membrane plasmique mais flottent dans le cytoplasme (*Khimich et al., 2005*). Piccolo est également une protéine structurale de la zone active des CCI (*Fenster et al., 2000; Gundelfinger & Fejtova, 2012; Hallermann & Silver, 2013*). Les synapses à ruban expriment aussi l'isoforme courte de Piccolo appelée Piccolino (*Regus-Leidig et al., 2013*). On retrouve aussi la présence de la GTPase Rab 3 au niveau des VSs et des rubans synaptiques (*Uthaiyah & Hudspeth, 2010*). Cette GTPase est impliquée dans divers processus tels que l'amarrage, l'amorçage et la fusion des VSs (*Ng &*

Tang, 2008). Les isoformes RIM (*Rab interacting protein molecule*) sont également exprimées dans les synapses à ruban des CCI matures et permettraient le regroupement des canaux calciques dans la zone active des CCI (Jung *et al.*, 2015). La « *cysteine-string protein* » (CSP) a été retrouvée associée aux VSs des CCI, notamment avec les VSs associées aux rubans synaptiques (Eybalin *et al.*, 2002). Les CCI expriment l'otoferline qui jouerait le rôle de senseur calcique coordonnant la fusion des VSs à l'influx calcique provenant de l'activation des canaux calciques Cav1.3 (Roux *et al.*, 2006). Il a été montré après invalidation du gène *Otof*, qu'otoferline serait essentielle à l'exocytose des VSs dans les CCI et participerait au réapprovisionnement des VSs au voisinage des zones actives mais le rôle de cette protéine reste encore mal compris (Roux *et al.*, 2006; Pangrsic *et al.*, 2010). Les mutations du gène *Otof* peuvent provoquer des neuropathies auditives (Varga *et al.*, 2003; Varga *et al.*, 2006). L'harmonine est une protéine cytoplasmique d'échafaudage présente dans les CCI. Il a été montré que cette protéine régule les courants de mécanotransduction et les signaux calciques des CCI (Grillet *et al.*, 2009; Michalski *et al.*, 2009; Gregory *et al.*, 2011). De plus, cette protéine est impliquée dans le syndrome d'Usher de type 1, la forme la plus fréquente et la plus sévère de surdité-cécité héréditaire, caractérisée par une surdité congénitale profonde associée à une atteinte vestibulaire et à une rétinopathie pigmentaire (Petit, 2001; El-Amraoui & Petit, 2005).

Les synapses à ruban entre les CCI et les neurones primaires de type I afférents sont glutamatergiques (Eybalin, 1993; Puel, 1995; Ruel *et al.*, 2007). Le glutamate libéré agit sur des récepteurs AMPA de type GluR2, GluR3, GluR4 se trouvant très concentrés à la périphérie de la densité postsynaptique des dendrites des neurones primaires de type I (Sobkowicz *et al.*, 1982; Matsubara *et al.*, 1996; Ruel *et al.*, 2000; Eybalin *et al.*, 2004). La forte densité des récepteurs AMPA à distance des sites préférentiels de libération permet d'assurer une réponse rapide et soutenue à la libération de glutamate ainsi qu'une meilleure détection du glutamate à faible concentration et donc limiter la perte d'informations (Glowatzki & Fuchs, 2002). Pour éviter des effets excitotoxiques dus à l'accumulation de glutamate dans la fente synaptique, ce dernier est récupéré par le transporteur du glutamate EAAT1 présent sur les cellules de support (Furness & Lawton, 2003; Glowatzki *et al.*, 2006). Les récepteurs Kainate (GluK2/GluK5) et NMDA sont aussi présents au niveau de ces synapses (Niedzielski & Wenthold, 1995; Ruel *et al.*, 2008). La PSD des synapses à ruban des CCI contient aussi des molécules retrouvées dans les synapses conventionnelles comme PSD95, PSD93 et Shank (Davies *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2012).

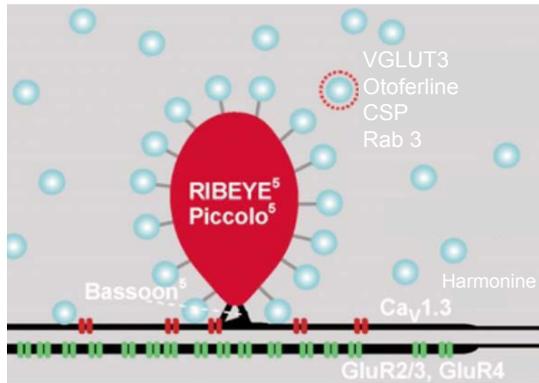


Figure 35. Composition moléculaire d'une synapse à ruban d'une CCI.

Les protéines RIBEYE et Piccolo jouent un rôle important dans la formation du ruban synaptique qui est ancré à la membrane plasmique grâce à la protéine Bassoon. Les VSs contiennent VGLUT3, l'otofériline, la CSP et Rab3. Ces deux dernières joueraient un rôle dans l'exocytose des VSs. Le calcium pénètre dans la cellule grâce aux canaux calciques Cav1.3. L'harmonine est une protéine d'échafaudage. Le glutamate libéré va agir sur les récepteurs AMPA (GluR2/3, GluR4) (*adapté de Nouvian et al., 2006*).

Le glutamate est accumulé dans les VSs des CCI par VGLUT3. Il est le seul des trois transporteurs vésiculaires du glutamate à être présent dans les CCI. Par contre, VGLUT3 n'est pas exprimé dans les CCE (**Figure 36 et 37**) (Ruel *et al.*, 2008; Seal *et al.*, 2008). VGLUT1 et VGLUT2 sont exprimés dans les neurones du noyau cochléaire (Zhou *et al.*, 2007; Ruel *et al.*, 2008). L'inactivation du gène codant pour VGLUT3 entraîne une surdité profonde chez les souris (Ruel *et al.*, 2008; Seal *et al.*, 2008). En effet, ces souris ne présentent pas de réponse nerveuse à une stimulation sonore. Cela indique donc un défaut de transmission dans les voies auditives. Effectivement, un défaut de transmission au niveau de la synapse des CCI est responsable de la surdité observée chez les souris VGLUT3-KO (Obholzer *et al.*, 2008; Ruel *et al.*, 2008; Seal *et al.*, 2008). Ces souris présentent une diminution du nombre de neurones auditifs primaires de type I mais elles ont, par contre, conservé une exocytose régulée des VSs. Le cycle des VSs demeure normal suggérant ainsi que les propriétés et les événements synaptiques ne sont pas affectés en absence de libération de glutamate (Ruel *et al.*, 2008). On peut donc en conclure que chez les souris VGLUT3-KO l'absence de libération de glutamate est due à la perte du remplissage en glutamate des VSs, suggérant ainsi une implication directe de VGLUT3 dans la libération de glutamate par les CCI. La perte de VGLUT3 produit des changements morphologiques précoces chez les souris VGLUT3-KO comme une réduction progressive du nombre de neurones dans le ganglion spiral et de la taille du noyau cochléaire (Seal *et al.*, 2008). Ces résultats suggèrent un rôle développemental important de VGLUT3 et de la libération de glutamate.

VGLUT3 est observé dans l'ensemble des compartiments des CCI, aussi bien au pôle apical qu'au pôle basal. Cela suggère un rôle pour VGLUT3 au niveau du domaine baso-latéral (en plus de sa fonction classique au niveau des rubans) (**Figure 36**). VGLUT3 est exprimé par les CCI à partir du 19ème jour de vie embryonnaire chez la souris (Seal *et*

al., 2008) et son expression augmente jusqu'au 60ème jour après la naissance puis diminue avec l'âge (Peng *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2015).

Chez les souris VGLUT3-KO, le gène *Slc17a8* sauvage (codant VGLUT3) peut être ré-exprimé par transfert viral (Akil *et al.*, 2012). En effet, cette insertion virale a permis aux souris VGLUT3-KO de retrouver une audition fonctionnelle partielle (Akil *et al.*, 2012). Deux semaines après l'injection d'AAV1-VGLUT3 (*adeno-associated virus type 1*) dans la cochlée, les fonctions auditives semblent restaurées chez les souris VGLUT3-KO. Ce résultat constitue une avancée importante vers la thérapie génique pour le traitement des surdités humaines (Akil *et al.*, 2012; Martin & Raphael, 2012).

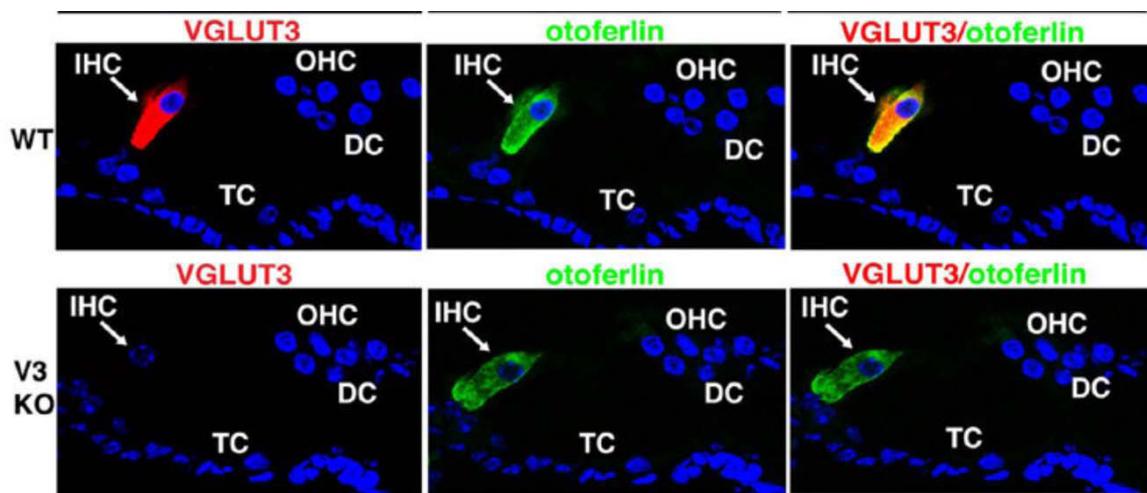


Figure 36. Expression de VGLUT3 et de la protéine Otoferline dans l'organe de Corti.

Les souris sauvages (WT) n'expriment VGLUT3 (en rouge) que dans les CCI (IHC). Il n'y a pas d'expression de VGLUT3 dans les CCE (OHC) et le tunnel de Corti (TC). Dans les CCI, VGLUT3 colocalise avec l'otoferline (en vert). Les souris VGLUT3-KO (V3 KO) n'expriment plus VGLUT3 dans les CCI mais l'expression de l'otoferline est la même que celle observée chez les souris sauvages. Les noyaux des cellules sont marqués en bleu par le DAPI (d'après Seal *et al.*, 2008).

En 2008, il a été établi que le gène *Slc17a8* codant VGLUT3 est responsable de la surdité de perception non syndromique dominante DFNA25 (Ruel *et al.*, 2008). Il s'agit là de la première mutation d'un VGLUT associée à une pathologie humaine. Une mutation dans l'exon 5 conduisant au remplacement d'une alanine en position 211 de la séquence d'acides aminés de la protéine par une valine a été identifiée et appelée p.A211V. Cette alanine est très conservée chez les orthologues de VGLUT3 ainsi que chez les trois VGLUTs humains. Cette alanine est au cœur d'une séquence peptidique (KWAPPLER) qui semble engagée dans une ou des fonctions importantes (Ruel *et al.*, 2008). Les sujets humains présentant cette mutation développent une surdité précoce (pénétrance de 77% pour les plus de 20 ans et pénétrance de 80% pour les plus de 30 ans). Cette surdité s'apparente, d'un point de vue

clinique, à la presbycousie. Il s'agit d'une perte de l'audition liée à l'âge, bilatérale et symétrique, touchant surtout les hautes fréquences.

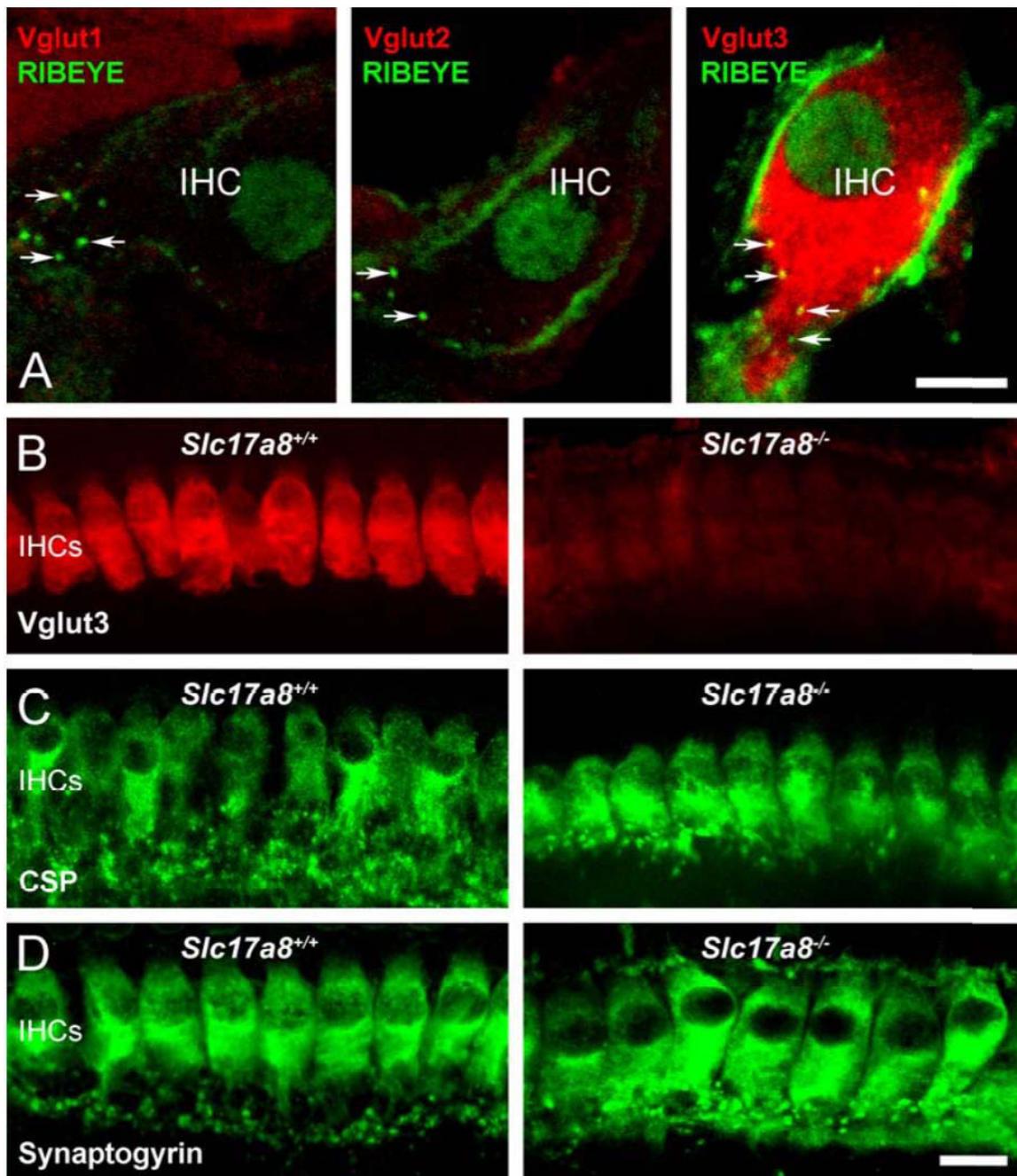


Figure 37. Expression de VGLUT3 dans les CCI.

Microscopie confocale d'une section transversale réalisée au niveau de la partie basale d'une cochlée de souris adulte. La protéine Ribeye (point vert signalé par des flèches) est exprimée au niveau du pôle basal de la CCI. Seul VGLUT3 est présent dans les CCI et il est exprimé dans toute la cellule (sauf dans le noyau). Ni VGLUT1 ni VGLUT2 ne sont présents dans la CCI. (B-D) Microscopie confocale de préparations entières de CCI au niveau de la partie basale de la cochlée de souris sauvage (*Slc17a8*^{+/+}) ou de souris VGLUT3-KO (*Slc17a8*^{-/-}). La délétion complète du gène *Slc17a8* abolit complètement l'immunomarquage de VGLUT3 (B). La perte de VGLUT3 n'a pas d'effet sur l'expression de protéines synaptiques comme la *cysteine-string protein* (CSP, C) et la *synaptogyrine* (Synaptogyrin, D). Echelle : A = 5 μ m, B-D = 25 μ m (d'après Ruel et al., 2008).

Problématique

VGLUT3 est un transporteur vésiculaire du glutamate atypique, de part sa distribution et ses fonctions. En effet, contrairement à VGLUT1 et VGLUT2 qui sont spécifiques des neurones glutamatergiques « classiques » corticaux et sous-corticaux, VGLUT3 est présent dans des sous-populations de neurones utilisant d'autres NT que le glutamate comme les interneurones cholinergiques striataux, certains interneurones GABAergiques du cortex et de l'hippocampe et les neurones sérotoninergiques des noyaux du raphé (Gras *et al.*, 2002). De plus, VGLUT3 est le seul des trois transporteurs vésiculaires à être adressé au niveau somato-dendritique (Herzog *et al.*, 2004). VGLUT3 semblent donc avoir de part sa distribution des fonctions différentes au sein du neurone. D'une part, il permet l'accumulation de glutamate dans les vésicules synaptiques, d'autre part grâce à cette accumulation de glutamate, il permet d'augmenter le chargement du premier NT dans la vésicule. Ce mécanisme a été appelé la synergie vésiculaire (El Mestikawy *et al.*, 2011). De plus, il semblerait que les VGLUTs soient impliqués dans la stabilité des VSs et leur transport (Herzog *et al.*, 2011; Siksou *et al.*, 2013).

Dans la cochlée, la synapse entre les CCI de l'organe de Corti et les neurones de type I du ganglion spiral est une synapse purement glutamatergique qui exprime seulement VGLUT3. Cette synapse est le premier relais du système auditif. Cela a pour conséquence la surdité des souris VGLUT3-KO (Ruel *et al.*, 2008; Seal *et al.*, 2008). Le travail mené par l'équipe du Pr Puel a permis de découvrir l'implication de VGLUT3 dans une pathologie héréditaire de l'audition chez l'homme (surdité de type DFNA25). Une mutation ponctuelle (p.A211V) du gène codant VGLUT3 humain est, en effet, responsable de cette surdité qui est progressive et qui touche les hautes fréquences en premier. Cette surdité est très proche cliniquement de la presbyacousie. Il s'agit de la première mutation d'un VGLUT associée à une pathologie humaine (Ruel *et al.*, 2008).

Mon travail de thèse a consisté à caractériser l'impact de cette mutation p.A211V sur le SNC. Cette étude a été réalisée sur une lignée de souris exprimant la mutation humaine appelée VGLUT3^{A224V/A224V}. Des approches de biologie moléculaire et cellulaire, anatomiques, biochimiques et comportementales ont été utilisées afin de caractériser les conséquences de cette mutation sur le SNC et nous permettre de mieux comprendre le fonctionnement et les rôles de VGLUT3 dans le SNC.

Le système auditif de cette souris est étudié en collaboration avec l'équipe du Pr Puel à Montpellier afin de caractériser son phénotype auditif et d'acquérir une meilleure compréhension des rôles de VGLUT3 dans la cochlée.

Résultats

I. Article

I.1. Résumé des principaux résultats

L'objectif de cette étude était de caractériser les effets sur le SNC de la mutation p.A211V de VGLUT3 identifiée chez l'homme. Ces travaux ont été réalisés *in vitro* sur cellules BON et cultures primaires de neurones d'hippocampe et *in vivo* à l'aide d'une lignée de souris génétiquement modifiée pour exprimer cette mutation (appelée VGLUT3^{A224V/A224V}). Voici un bref résumé des résultats principaux obtenus.

- Cette mutation ne modifie pas l'expression du transcrit codant VGLUT3.
- L'expression de la protéine mutée est diminuée de 70%. Cette diminution n'est observée qu'au niveau des terminaisons synaptiques alors qu'au niveau du soma, l'expression n'est pas altérée.
- Aucune accumulation de la protéine mutée n'est observée dans le golgi ou système de maturation des protéines.
- La fonction de transporteur de VGLUT3 semble peu affectée par cette mutation.
- Les souris VGLUT3^{A224V/A224V} ne présentent aucun des phénotypes observés chez une souris n'exprimant plus VGLUT3 (VGLUT3^{-/-}). En effet, nous n'avons observé ni une augmentation des phénotypes anxieux ni une augmentation de locomotion suite à l'injection de drogue.
- La microscopie de super-résolution STED (pour *Stimulated emission depletion*) permet de remarquer une diminution du nombre de vésicules VGLUT3-positives dans les terminaisons synaptiques du cerveau des souris VGLUT3^{A224V/A224V}.

En conclusion, l'étude de cette mutation nous permet de constater qu'elle entraîne, d'une part, une baisse massive de VGLUT3. D'autre part, il semble que seulement 20-30% de VGLUT3 résiduel permettent de remplir la plupart des fonctions du transporteur. L'activité de VGLUT3 n'est donc pas linéairement corrélée à la quantité de transporteur.

I.2. Article : Characterization of a human point mutation of VGLUT3 (p.A211V) - implication for synaptic vesicles composition

Title:

Characterization of a human point mutation of VGLUT3 (p.A211V) - implication for synaptic vesicles composition

Abbreviated title:

VGLUT3 p.A211V mutation

Lauriane Ramet^{1,2,3}, Tiphaine Bersot^{1,2,3}, Johannes Zimmermann⁴, Katlin Silm^{1,2,3}, Odile Poirel^{1,2,3}, Diana Yae Sakae^{1,2,3}, Etienne Herzog⁵, Nicolas Pietrancosta^{6,7}, Stéphanie Daumas^{1,2,3}, Véronique Bernard^{1,2,3}, Christian Rosenmund⁴, Salah El Mestikawy^{1,2,3,8*}

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMR-S 1130, F-75005, Paris, France

²Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR 8246, F-75005, Paris, France

³Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie (UPMC) Paris 06, Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS), UM119 Neurosciences Paris Seine, F-75005, Paris, France

⁴Neurocure NWFZ, Charite Universitaetsmedizin, 10117 Berlin, Germany

⁵Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 5297, Institut interdisciplinaire de Neurosciences, Université Bordeaux 2, 33077 Bordeaux, France

⁶Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR 8601, 75006 Paris, France

⁷Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité

⁸Douglas Hospital Research Center, Department of Psychiatry, McGill University, 6875 boulevard Lasalle Verdun, QC, Canada

*Correspondence should be addressed to Salah El Mestikawy, Inserm U 1130, CNRS UMR 8246, Université Pierre et Marie Curie UM 119, 7 quai Saint Bernard, 75005, Paris, France.

E-mail: salah.el_mestikawy@upmc.fr

Key words: vesicular glutamate transporter 3 (VGLUT3), point mutation (p.A211V), VGLUT3^{A224V/A224V}, synaptic vesicles, central nervous system, STED

Number of pages: 56

Number of: Figures: 11
 Tables: 2
 3D models: 0

Conflict of Interests: The authors declare no competing financial interests.

Acknowledgements

This research was supported by funds from Fondation pour la Recherche médicale (*Équipe* FRM DEQ20130326486), Agence Nationale pour la Recherche (ANR), Fédération pour la Recherche sur le Cerveau, Labex (Bio-Psy Laboratory of Excellence), INSERM, CNRS and UPMC.

LR received a PhD fellowship from the French Research Ministry and was funded by a fellowship from FRM (FDT20140930909). We thank Géraldine Toutirais from the Service de Microscopie Électronique of the Institut de Biologie Paris-Seine (Université Pierre et Marie Curie, Paris).

We thank Christoph Biesemann for lentiviruses constructs and l'*École des Neurosciences de Paris* (ENP) ("Network for Viral Transfer") for producing lentiviruses. We thank Valérie Nicolas from the *Plateforme d'imagerie cellulaire of the Institut Paris Saclay d'Innovation Thérapeutique* (UMS IPSIT Université Paris-Sud – US 31 INSERM – UMS 3679 CNRS, Châtenay-Malabry) for her help with STED microscopy.

Abstract

The atypical vesicular glutamate transporter type 3 (VGLUT3) is expressed by a small population of neurons using other neurotransmitters than glutamate such as cholinergic interneurons from the striatum, subpopulation of hippocampal and cortical basket cells and serotonergic neurons. In addition, VGLUT3 is used in inner ear cells from the auditory system. A missense mutation (p.A211V) of the gene that encodes VGLUT3 (*Slc17a8*) is responsible for a progressive form of deafness named DFNA25. In this study, we investigated the consequences of the p.A211V mutation in cell systems as well as in the central nervous system of a mutant mouse line. The mutation drastically decreased VGLUT3 expression (-70%) in BON cells as well as in neuronal cultures and in terminals from the knockin mice. We measured VGLUT3-p.A211V activity by: i) vesicular uptake in BON cells, ii) electrophysiological recording of isolated neurons and iii) the capacity of VGLUT3 to stimulate serotonergic accumulation in cortical synaptic vesicles. The mutated isoform appeared almost as active as the native VGLUT3. Furthermore, the mutant mice displayed none of the behavioral alteration previously reported in VGLUT3 knockout mice. These observations suggested that VGLUT3 global activity (glutamate uptake, release and behavioral integration) is not linearly correlated to VGLUT3 quantity. Finally, we used super-resolution microscopy to analyze how the mutation altered VGLUT3 distribution within terminals. Surprisingly, we observed a decrease of the VGLUT3-dependent fluorescent event per terminal. Therefore, contrary to prevailing views, reducing the expression of the transporter seemed to simultaneously reduce the number of VGLUT3-positive synaptic vesicles and the VGLUT3 copy number on vesicles. Unraveling the cellular mechanisms responsible for this complex sorting will be a key challenge for the full understanding of vesicular glutamate transporters involvement in normal and pathological conditions.

Significance Statement

VGLUT3 is an atypical member of the vesicular glutamate transporter family. A point mutation of VGLUT3 (VGLUT3-p.A211V) responsible for a progressive loss of hearing has been identified in humans. Here, we show that this mutation dramatically reduce VGLUT3 expression in terminals by -70% without altering its function. Furthermore, using Stimulated Emission Depletion (STED) microscopy, we found that reducing expression levels of VGLUT3 diminished the number of VGLUT3-positive vesicles at synapses. This unexpected finding challenges the more classic vision of a uniform decrease of transporter copies in synaptic vesicles. Therefore, the overall activity of VGLUT3 is not proportional to the level of VGLUT3 expression. These data will be key to interpret the role of VGLUTs in human pathologies.

INTRODUCTION

Glutamate is the major excitatory neurotransmitter in the Central Nervous System (CNS). Its accumulation within synaptic vesicles is an essential step for excitatory neurotransmission in the brain. This function is performed by three vesicular glutamate transporters name VGLUT1, VGLUT2 and VGLUT3 (for review see (S. El Mestikawy et al., 2011)). Hence VGLUT1-3 are pivotal anatomical and functional markers of glutamatergic transmission. In addition to the filling of synaptic vesicles with glutamate, additional roles of the VGLUTs have recently been unraveled. First, the amount of glutamate packaged into synaptic vesicles as well as the amount of released glutamate have been claimed to be proportional to the density of VGLUT expression (R. W. Daniels et al., 2004; R. W. Daniels et al., 2006; D. Moechars et al., 2006; R. W. Daniels et al., 2011). Furthermore, VGLUTs influence the mobility of synaptic vesicles in the axon and their stability in the synapse as well as the intrinsic release probability of glutamatergic vesicles (M. C. Weston et al., 2011; L. Siksou et al., 2013; M. A. Herman et al., 2014).

The three subtypes of VGLUTs are structurally and functionally highly similar but are anatomically segregated to different brains structures. VGLUT1 and VGLUT2 are respectively used by cortical and subcortical classical excitatory terminals (E. E. Bellocchio et al., 2000; S. Takamori et al., 2000; R. T. Fremeau et al., 2001; E. Herzog et al., 2001; S. Takamori et al., 2001; H. Varoqui et al., 2002). In contrast, VGLUT3 is localized in small populations of neurons using others neurotransmitters than glutamate, such as cholinergic interneurons in the striatum, subsets of GABAergic interneurons in the hippocampus and cortex and serotonergic neurons in the dorsal and medial raphe nuclei (R. T. Fremeau et al., 2002; C. Gras et al., 2002; M. K. Schafer et al., 2002; S. Takamori et al., 2002; E. Herzog et al., 2004). At the cellular level, the three vesicular glutamate transporters are present in terminals. However, unlike VGLUT1 and VGLUT2, VGLUT3 is also observed in somato-dendritic compartment (E. Herzog et al., 2004). VGLUT3 facilitates the vesicular accumulation and release of acetylcholine (ACh), serotonin (5-HT) and GABA via a

mechanism called “vesicular synergy” (C. Gras et al., 2008; B. Amilhon et al., 2010; J. F. Zander et al., 2010). Moreover, VGLUT3 confers to “non-glutamatergic” cells the ability to release glutamate (V. Varga et al., 2009; M. J. Higley et al., 2011; A. B. Nelson et al., 2014). Mice that no longer express VGLUT3 (VGLUT3^{-/-}) display hypersensitivity to pain, increased anxiety and sensitivity to cocaine (C. Gras et al., 2008; R. P. Seal et al., 2009; B. Amilhon et al., 2010; C. Peirs et al., 2015). Interestingly, heterozygous mice (VGLUT3^{+/-}) display no particularly altered phenotypes.

VGLUT3 is expressed by sensory inner hair cells (IHCs) of the cochlea in the auditory system. Therefore, VGLUT3^{-/-} mice are profoundly deaf, due to the inability of IHCs to signal with glutamate at the first synapse in the auditory pathway (J. Ruel et al., 2008; R. P. Seal et al., 2008). A mutation in the gene that encodes VGLUT3 (*Slc17a8*) is responsible for an autosomal-dominant form of progressive, high-frequency nonsyndromic deafness named DFNA25 (J. Ruel et al., 2008). This mutation of VGLUT3 (p.A211V) causes progressive hearing loss in humans with a penetrance of 77% for patients aged 20 and older (J. Ruel et al., 2008). This was the first evidence of a VGLUT mutation associated with a human pathology.

The mutated alanine is part of peptide sequence (KWAPPLER) that is highly conserved among the three VGLUTs and their orthologs. The A211 alanine in human VGLUTs corresponds to position 224 in the mouse VGLUT3 sequence (A224). In this report, we generated knockin mice carrying the p.A211V mutation (VGLUT3^{A224V/A224V}) and investigated the effects of this mutation on the CNS. We observed that wild-type (WT or VGLUT3^{+/+}) and VGLUT3^{A224V/A224V} mice expressed similar levels of VGLUT3 mRNA. In contrast, the amounts of the VGLUT3-p.A211V mutated protein were dramatically reduced in nerve endings (-80%). Surprisingly, somato-dendritic levels of the protein were unaltered. Moreover, VGLUT3-dependent vesicular accumulation and synaptic release of glutamate were only minimally altered in VGLUT3^{A224V/A224V} mice. In mice, VGLUT3 deletion results in increased anxiety as well as basal or cocaine-induced locomotor activity (C. Gras et al., 2008; B. Amilhon et al.,

2010). Despite their massive loss of VGLUT3, VGLUT3^{A224V/A224V} mice displayed no such behavioral alterations.

Our present data show that 20-30% expression levels of VGLUT3 are apparently as efficient as 100% to fulfill its molecular, cellular and behavioral functions. These results strongly suggests, as already reported for VGLUT1 and VGLUT2 (S. Takamori et al., 2006), that multiple copies of VGLUT3 are present in the vesicular membrane. Interestingly, with Stimulated Emission Depletion (STED) super-resolution microscopy, we observed a diminution of VGLUT3-p.A224V-positive vesicles in terminals. Taken together, these observations demonstrate that the p.A211V mutation has complex effects on VGLUT3 expression and targeting. Characterization of the VGLUT3^{A224V/A224V} mouse line will clarify the physiology and the molecular function of the atypical vesicular glutamate transporter VGLUT3.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Animal care and experiments were conducted in accordance with the European Communities Council Directive for the Care and the Use of Laboratory Animals (86/809/EEC) and in compliance with the *Ministère de l'Agriculture et de la Forêt, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection Animale* (authorisation # 01482.01 from ethic comity Darwin #5). All efforts were undertaken to minimize the number of animals used in the course of the study and to ensure their well-being. Animals were housed in a temperature-controlled room ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) with free access to water and food under light/dark cycle of 12h (light 7:30 - 19:30).

Construction, genotyping and breeding of VGLUT3^{A224V/A224V} mice

The mutation p.A211V was described in two unrelated human families (J. Ruel et al., 2008). The alanine in position 211 of human VGLUT3 is part of a KWAPPLER motif and is highly conserved in all three VGLUTs among different species (J. Ruel et al., 2008). In mouse VGLUT1 and VGLUT3, this alanine is in position 198 and 224 respectively (Fig. 1A). A mouse line expressing the p.A224V mutation was generated by the *Institut Clinique de la souris* (Illkirch, France, <http://www.ics-mci.fr/>) and was named VGLUT3^{A224V/A224V}. A point mutation was introduced in exon 5 of the mouse *Slc17a8* gene: a GCG (coding for an alanine) was changed for a GTG (coding for a valine) (Fig. 1B). Mice were genotyped by PCR analysis of tail DNA with the following PCR primers: (p1) 5'-CGGAGGGGAAGC-CAGGAAAGGG-3' and (p2) 5'-GACAGCTCAGTGAGCTGTAGACCCAG-3' for the WT and the mutated allele giving respectively bands of 219 and 306 bp (Fig. 1C).

All experiments were carried out with WT, VGLUT3^{A224V/+}, VGLUT3^{A224V/A224V} or VGLUT3^{A224V/-} mice aged 10 days to 12 months and derived from crossing heterozygous VGLUT3^{A224V/+} (C57BL/6N genetic background) or VGLUT3^{+/-} (from VGLUT3^{-/-} mouse line, (D. Y. Sakae et al., 2015)) with VGLUT3^{A224V/+} (C57BL/6N) respectively. Male littermates were used for the behavior and females or males for anatomical and biochemical

experiments. Animals were randomly allocated to experimental groups. Whenever possible, investigators were blinded to the genotypes during experimental procedures. Animals were excluded from the experimental data only when they were detected by outlier test (Grubb's test-GraphPad Prism software).

Behavioral experiments

Spontaneous locomotor activity: Basal locomotor activity was assessed as previously described (C. Gras et al., 2008). Mice were placed individually in activity boxes (20 x 15 x 25 cm) where their horizontal and vertical activity were measured by photocell beams located across the long axis, 15 mm (horizontal activity) and 30 mm (vertical activity) above the floor. Each box was connected by an interface to a computer (Imetronic). Spontaneous locomotor activity was measured in 15 min intervals during five hours between 18:30 and 23:30 p.m.

Open Field (OF): The Open field test was performed in a white perplex arena (43 x 43 x 26 cm) located in a 10 lux illuminated room as previously reported (B. Amilhon et al., 2010). The virtual central compartment square represents 1/3 of the total arena. Mice were introduced into the central area and allowed to freely explore the open field for 360 sec. The duration, frequency and time course of various behaviors (exploration, walking, rearing, stretching, grooming) were measured in different regions of the open field (central vs. periphery zone). The time and number of entries in the center of the open field were evaluated as an index of anxiety-related response.

Elevated Plus Maze (EPM): EPM was used to measure unconditioned anxiety-like behavior (B. Amilhon et al., 2010). The EPM was placed into 10 lux ambient light. It consisted of two open arms, two enclosed arms and a central platform elevated 38,5 cm above the ground. After one hour of habituation in the testing room, animals were placed in the central area, facing one of the closed arms and tested for 360 sec. The total time spent in each compartment (open vs. closed arms) was recorded by video tracking (Viewpoint).

Cocaine-induced locomotor activity: Cocaine-induced locomotor activity was measured in a cyclotron, which consisted of a circular corridor with four infrared beams placed at 90° angles

(Imetronic). Activity was counted as the consecutive interruption of two adjacent infrared beams (1/4 of a tour). To assess acute cocaine-induced locomotion, animals were i) placed in the cyclotron during four hours for habituation, ii) injected with saline (NaCl 0.9%), placed back in the cyclotron for 60 min and iii) injected with cocaine (10 mg/kg, intraperitoneal (i.p)). Locomotion was recorded for 95 min following the cocaine injection.

Neuronal microculture and autapses electrophysiological recording

Hippocampi were harvested from postnatal day 0 (P0) to P2 VGLUT1^{-/-} mice of either sex (S. M. Wojcik et al., 2004). Neurons were plated on island cultures at a density of 2000-3000 neurons per 35 mm dish. Recordings were performed from 14 to 18 DIV neurons. VGLUT1^{-/-} autaptic neurons were infected with either VGLUT3 or VGLUT3-p.A211V. Standard extracellular solution contained the following (in mM): 140 NaCl, 2.4 KCl, 10 HEPES, 10 glucose, 4 MgCl₂, and 2 CaCl₂, pH 7.3. Internal solution contained the following: 135 KCl, 18 HEPES, 1 EGTA, 4.6 MgCl₂, 4 ATP, 0.3 GTP, 15 creatine phosphate, and 20 U/ml phosphocreatine kinase. Excitatory postsynaptic currents (EPSCs) were evoked by 2 ms depolarization at 0 mV, resulting in an unclamped action potentials. Readily releasable vesicle pool (RRP) size was assessed by pulsed (5 s) application of hypertonic sucrose solution (500 mM sucrose added to extracellular solution) and by integrating the transient inward current component. Vesicular release probability was computed by dividing charge of EPSC by the RRP charge. Current traces were analyzed using Axograph X (Axograph), Excel (Microsoft) and Prism (GraphPad). mEPSCs were detected by template function (Axograph; template: rise, 0.5 ms; decay, 3 ms; criteria range: rise, 0.15-1.5 m; decay, 0.5-5 ms).

In situ hybridization labeling of VGLUT3 mRNA

Regional *in situ* hybridization was performed as previously described (C. Gras et al., 2008; B. Amilhon et al., 2010; E. Vigneault et al., 2015). Mouse brains were rapidly dissected and frozen in isopentane at -30°C. Coronal brains sections (10 μm) were cut with a cryostat

(Leica) at -20°C, thaw-mounted on glass slides, fixed in formaldehyde 4%, washed with PBS, dehydrated in 50% and 70% ethanol and air-dried. Sections were incubated with a mixture of 9 antisense oligonucleotides specific for mouse VGLUT3 (5'-TCAGAAGCTGTCATCCTCTCTCAACTCCAG-3', 5'-GGCATCTTCCTCTTCATTGGTCCCATCGAT-3', 5'-CCCTTCTCCTCTCGATCCAGAATCAACAAA-3', 5'-ACTGCGCTTGCCCTGGAGGAACACTTGAAA-3', 5'-GCCGTAATGCACCCTCGCCGCAGAAGGGATAAAC-3', 5'-GGGCAGCCAAGCTCAGAATGAGCACAGCCTGTATCC-3', 5'-AGTCACAGATGTACCGCTTGGGGATGCCGCAGCAG-3', 5'-AGCCAGTTGTCCTCCGATGGGCACCACGATTGTC-3', 5'-CCACAATGGCCACTCCAA-GGTTGCACCGAATCCC-3'). These oligonucleotides were labeled with [³⁵S]-dATP (PerkinElmer) to a specific activity of 5×10^8 dpm/ μ g using terminal deoxynucleotidyl transferase (Promega). Sections were incubated during 18 h at 42°C, washed and exposed to a BAS-SR Fujifilm Imaging Plate for seven days. The plates were scanned with a Fuji Bioimaging Analyzer BAS-5000. Densitometry measurements were performed with MCIDTM analysis software. Densitometric analysis of 4-6 sections for each region was averaged per mice.

Immunautoradiographic labeling of VGLUT3

Immunautoradiography experiments were performed on fresh frozen mouse brain sections (10 μ m) as previously described (B. Amilhon et al., 2010; E. Vigneault et al., 2015). Brain slices were incubated with VGLUT3 rabbit polyclonal antiserum (1:20,000, Synaptic Systems) and then with anti-rabbit [¹²⁵I]-IgG (PerkinElmer). Sections were then washed in PBS, rapidly rinsed in water, dried and exposed to X-ray films (Biomax MR, Kodak) for five days. Standard radioactive microscales were exposed onto each film to ensure that labeling densities were in the linear range. Densitometry measurements were performed with MCIDTM analysis software on 4-6 sections for each region per mice.

Immunofluorescence

Immunofluorescence experiments were performed on BON cell, hippocampal primary neurons and brain slices as previously established (E. Herzog et al., 2001; C. Gras et al., 2002; E. Herzog et al., 2011). Cells or brain sections were incubated with anti-human VGLUT3 rabbit polyclonal antiserum (1:1000, (E. Vigneault et al., 2015)), anti-rodent VGLUT3 rabbit polyclonal antiserum (1:1000, (C. Gras et al., 2002)), anti-rodent VGLUT3 rabbit polyclonal antiserum (1:2000, Synaptic Systems), anti-rodent VGLUT1 rabbit polyclonal antiserum (1:2000, (E. Herzog et al., 2001)), synaptophysin mouse monoclonal purified IgG (1:2000, Synaptic system), bassoon mouse monoclonal antiserum (1:1000, Abcam) or PSD95 mouse monoclonal antiserum (1:1000, Abcam). Immunolabelings were revealed with anti-rabbit or anti-mouse secondary antisera coupled to Alexa Fluor 555 or Alexa Fluor 488 (1:2000, Invitrogen). Nuclei were labeled using DAPI (1:5000, Sigma). Cells and sections were observed with a fluorescence microscope equipped with an Apotome module (Zeiss, Axiovert 200 M) or a confocal Laser Scanning Microscope (Leica TCS SP5, Leica Microsystems). Fluorescence intensity in synaptic boutons of hippocampal neuronal cultures was quantified using the Macbiophotonics plugin for ImageJ (<http://www.macbiophotonics.ca/>). On brain slices, semi-quantification of VGLUT3 in the soma and terminals was performed with the ImageJ software.

Electron microscopy immunogold detection of VGLUT3

Electron microscopy experiments were performed on WT and VGLUT3^{A224V/A224V} mice as previously described (V. Bernard et al., 1999; E. Herzog et al., 2001). Briefly, animals were deeply anesthetized and perfused transcardially with a mixture of 2% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH7.4) and 0.2% glutaraldehyde. Brains were dissected, fixed overnight in 2% paraformaldehyde and stored in PBS until use. Sections (70 μ m) from midbrain including striatum were cut on a vibrating microtome (Leica, VT1000S). Sections were successively incubated in anti-VGLUT3 rabbit polyclonal antiserum (1:2000, Synaptic System), in goat anti-rabbit coupled to biotine (Vector laboratories) and in streptavidin

coupled to gold particles (0.8 nm in diameter; Nanoprobes; 1:100 in PBS/BSA-C). The signal of the gold immunoparticles was increased using a silver enhancement kit (HQ silver; Nanoprobes) for 2 min at RT in the dark. Finally, after treatment of sections with 1% osmium, dehydration and embedding in resin, ultrathin sections were cut, stained with lead citrate and examined in a transmission electron microscope (EM 912 OMEGA, ZEISS) equipped with a LaB6 filament at 80kV. Images were captured with digital camera (SS-CCD, 2kx2k, Veleta).

VGLUT3 immuno-detection by STED microscopy

STED microscopy experiments were performed on WT, VGLUT3^{A224V/+}, VGLUT3^{A224V/A224V}, VGLUT3^{A224V/-} and VGLUT3^{-/-} mice. Briefly, animals were deeply anesthetized and perfused transcardiacally with paraformaldehyde (2%). Brains were dissected, fixed over-night in 2% paraformaldehyde and stored in PBS until use. Sections (70 μ m) from midbrain including striatum were cut on a vibrating microtome (Leica, VT1000S). VGLUT3 was detected in axonal varicosities in mouse caudate putamen. In order to be sure that VGLUT3 was detected in varicosities, synaptophysin I, a synaptic vesicular protein, was co-detected with VGLUT3. Sections were successively incubated in a mixture of anti-VGLUT3 rabbit polyclonal antiserum (1:2000, Synaptic System) and anti-synaptophysin I mouse antiserum (1:2000, Synaptic System), in anti-mouse biotinylated secondary antibody (1:100, Vector Laboratories), and in a mixture of Streptavidin (1:100, BD HorizonTM V500, BD Biosciences) and Oregon Green 488 Goat Anti-Rabbit IgG (ThermoFisher Scientific), and mounted in Prolong gold (ThermoFisher Scientific).

Sections were observed using a SP8 gated-STED microscope (Leica Microsystems) equipped with a 592 nm depletion laser. BD HorizonTM V500 and Oregon Green 488 were excited at 470 nm and 514 nm, respectively. All acquisitions were performed using the same excitation laser power (50%). Alternatively, we have compared the effect of increased laser power on the number of spots (50, 75, 100%). Images were submitted to deconvolution (Huygens software, Scientific Volume Imaging), that permits the recovery of objects that are

degraded by blurring and noise. Finally, images were analysed using the ImageJ and Adobe Photoshop softwares. The number of synaptic vesicles per varicosity surface was quantified in each genotype (80, 76, 76, 90, 105 varicosities per animals were quantified in 4 WT, 3 VGLUT3^{A224V/+}, 4 VGLUT3^{A224V/A224V}, 3 VGLUT3^{A224V/-} and 2 VGLUT3^{-/-} mice, respectively).

Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)

FRAP experiments were performed to compare the mobility of VGLUT3-p.A211V with that of wild-type VGLUT3 at synapses. Experiments were performed as previously described (E. Herzog et al., 2011), using a SP5 Laser Scanning Microscope (Leica) with a 63X/1.32 numerical aperture oil-immersion objective and a thermal incubator set to 37°C surrounding the setup (Leica Microsystem). The pinhole was opened to 2,5 Airy units to enhance signal detection. A bleaching protocol was used to prevent spontaneous recovery of venus fluorescence as previously reported (T. B. McAnaney et al., 2005). Fluorescence recovery was monitored every 30 s during the first 5 min and then every 5 min during the next 70 min for the FRAP and every 5 s during 10 min for the Fast FRAP. The entire FRAP and Fast FRAP procedure was automated using the SP5 live data mode software. Image processing was automated using ImageJ macro commands. Integrated fluorescence intensities of six bleached and eight control boutons as well as one background area were extracted. The background signal was subtracted.

BON cell culture and transfection

Human carcinoid BON cells were maintained in 1:1 DMEM/F-12 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (PAA Laboratories, GE Healthcare Life Science), 100 units/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Life technologies) at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator as previously described (E. Herzog et al., 2001; C. Gras et al., 2002). BON cells were transfected using Lipofectamine 2000 (Life technologies) according to the manufacturer's instructions with the expression vector pcDNA3 (Invitrogen) containing the sequence coding for the human VGLUT3 or VGLUT3-p.A211V coupled to green fluorescent

protein (GFP) reporter (pcDNA3-IRES-GFP-VGLUT3 or -VGLUT3-p.A211V). Stable clones were selected using G418 antibiotics (Merck Millipore), flow cytometry was used to select GFP- and VGLUT3-positive cells. Stable clones expressing VGLUT3 or VGLUT3-p.A211V were maintained in culture medium containing G418 (0.6 mg/ml).

Hippocampal neuronal culture

Hippocampal cell cultures were prepared from newborn P0-P1 (P0 being the day of birth) C57BL/6 pups of either sex as previously described (L. Siksou et al., 2013). Briefly, hippocampi were dissected in Hanks balanced salt solution (ThermoFisher Scientific), and then incubated in papain for 55 min at 37°C and in trypsin inhibitor (Sigma Aldrich) for 15 min at 37°C to stop the reaction. Cells were mechanically dissociated and plated at 20 000 cells/cm² on poly-L-lysine-coated coverslips (Sigma-Aldrich). Cells were grown in Neurobasal A medium (Life technologies) containing 2% B27 supplement (ThermoFisher Scientific), 2 mM Glutamax (ThermoFisher Scientific) and 0.005% penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich). After two days in culture, neurons were transfected with lipofectamine expressing the VGLUT3-p.A211V in pcDNA3 or infected with lentiviral vectors containing either VGLUT3-venus or VGLUT3-p.A211V-venus inserts for expression under the control of the synapsin promoter (L. Siksou et al., 2013). Viral particles were diluted at 1:1000 in Neurobasal medium (Life technologies) containing Glutamax (ThermoFisher Scientific), B27 and penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich). The diluted virus solutions (respectively 50 μ l and 300 μ l for VGLUT3-venus and VGLUT3-p.A211V-venus expressing lentivirus) were incubated for 10 days with the primary neuronal cultures. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) imaging of live dissociated neuron cultures was performed at 17 days *in vitro* (DIV17).

Mutagenesis and Construction of VGLUT3-p.A211V and VGLUT1-p.A198V

To introduce point mutation in the WT alleles, we used the QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Statagene) and a set of complementary primers as previously described (S.

De Gois et al., 2015). All clones were sequenced in both directions and the plasmids were purified using a Plasmid Maxi Kit (Qiagen) before use.

Vesicular glutamate uptake assay with vesicles from stable BON clones

Synaptic vesicles from BON cells and [³H]L-glutamate uptake assays were performed as previously described (E. Herzog et al., 2001; C. Gras et al., 2002). The transport activity was started by addition of 20 μ l of vesicles (200 μ g of protein) to 180 μ l of uptake buffer containing ATP (2 mM, Sigma-Aldrich), L-glutamate (40 μ M pH 7.4, Sigma-Aldrich) and [³H]L-glutamate (6 μ Ci, PerkinElmer) with or without carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP, 50 μ M, Sigma-Aldrich). After 10 min at 37°C, the uptake assay was terminated by dilution with 3 ml of ice-cold 0.15 M KCl, rapid filtration through a 0.45 μ m pore size membrane filter (MF, Millipore), and three washes with 3 ml of ice-cold 0.15 M KCl. The radioactivity retained on filters was measured by scintillation counting. Each uptake measurement was performed in triplicate. All experiments were performed independently three times on three independent BON-VGLUT3 clones.

Vesicular [³H]5-HT uptake assay in mouse brain synaptic vesicles

Synaptic vesicles isolation from mouse cortex and uptake assays of [³H]5-HT were performed as previously described (B. Amilhon et al., 2010). Transport reaction was started by adding 10 μ l of cortical synaptic vesicles (25 μ g of protein) to 90 μ l of uptake buffer containing ATP (2 mM, Sigma-Aldrich) and [³H]5-HT (0.55 μ Ci, 50 nM, PerkinElmer), with or without 2 μ M reserpine (Sigma-Aldrich) or L-glutamate (10 mM, Sigma-Aldrich). After 10 min at 37°C, vesicular uptake was stopped by dilution in 3 ml of ice-cold 0.15 M KCl, rapid filtration through mixed cellulose esters filters (MF, Millipore), and three washes with 3 ml of ice-cold 0.15 M KCl. The radioactivity retained on filters was measured by scintillation counting. Each determination was performed in triplicate and independent experiments were performed seven times using different synaptic vesicle preparations.

Western blotting

Western blot experiments were conducted on BON cell extracts or on homogenates from different brain regions (cortex, striatum, hippocampus) as previously depicted (C. Gras et al., 2008; E. Vigneault et al., 2015). Nitrocellulose membrane (0.4 μm pore size, Invitrogen) were incubated overnight with anti-human VGLUT3 rabbit polyclonal antiserum (1:1000, (E. Vigneault et al., 2015)), anti-rodent VGLUT3 rabbit polyclonal antiserum (1:2000, Synaptic Systems), anti-rodent VGLUT1 rabbit polyclonal antiserum (1:5000, (E. Herzog et al., 2001)) and alpha-tubulin mouse monoclonal antiserum (1:20,000, Sigma-Aldrich) and then with IRDye 700/800 conjugated secondary antibodies (1:5000, Invitrogen). Membranes were scanned using Odyssey infrared imaging system (LI-COR). The integrated intensity was measured for each band, averaged for 5-7 samples.

Quantitative reverse transcription-PCR analysis

The expression of VGLUT3 transcript in stable BON cells was estimated by quantitative reverse transcription (RT-PCR) as previously described (C. Gras et al., 2002). Nucleic acids were extracted from 65×10^4 BON cells (Kit Rneasy Mini Kit, Qiagen). Reverse transcription was performed with the SuperScript® Reverse transcriptase kit (Life technologies) using 2 μg of the nucleic-acid extract. The cDNA amplification was performed with TaqTM DNA polymerase (Sigma-Aldrich) and the following primers 5'-ACTCTGAACATGTTTATTCCC-3' and 5'-CTTAGACTAACCACGTTGGC-3' (3 min. at 94°C followed by 30 sec. at 94°C, 30 sec. at 55°C and 40 sec at 72°C for 40 cycles). The RT-PCR products were separated on 1% agarose gel and viewed under UV light. The intensity quantification was performed with the ImageJ software.

Homology modeling of VGLUT3

A putative 3D structure of VGLUT3 was established based on X-ray crystal structure of the glycerol-3-phosphate transporter (GlpT) from *Escherichia coli*, a distant ortholog of vesicular glutamate carriers (J. Almquist et al., 2007). Secondary structures were predicted using the

membrane protein topology prediction method TransMembrane prediction using Hidden Markov Models (TMHMM) and Hidden Markov Model for Topology Prediction (HMMTOP) (A. Krogh et al., 2001; G. E. Tusnady and I. Simon, 2001). Sequence alignments were generated between human VGLUT3 (SWISS-PROT accession n°: Q8NDX2), and GlpT (P08194), using Clustal W (J. D. Thompson et al., 1994). Alignments were manually refined to avoid gaps in predicted (human VGLUT) and known (GlpT) secondary structure elements. VGLUT3 3D models were built from these alignments and from crystallographic atomic coordinates of GlpT (PDB ID: 1PW4) using the automated comparative modeling tool MODELER 9.0 (Discovery Studio 4.1, Accelrys Software Inc.). Three-dimensional model of the VGLUT3-p.A211V mutant was generated using Build mutant protocol (E. Feyfant et al., 2007). The mutant model was minimized using Adopted Basis Newton-Raphson (NR) algorithm, maximum step of 500 and as implicit solvent model a “generalized Born with Implicit Membrane (GBIM)”. A 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholine (POPC) membrane of 100 x 80 angstroms was added using software from Visual Molecular Dynamic (VMD 1.9.2, <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/vmd-1.9.2/>). Proteins were solvated and ions were added using the solvation and ionization package from VMD1.9.2. The structure was minimized using Adopted Basis Newton-Raphson (NR) algorithm, maximum step of 500 and implicit solvent model. The system was then equilibrated using a short Nanoscale Molecular Dynamic software program (NAMD) of 1 ns.

Statistics

All statistical comparisons were performed with Prism 5 (GraphPad software Inc.). Each statistical test was appropriately chosen for the relevant experimental design. To compare two groups, a non-parametric Mann Whitney test was performed. A one-way ANOVA, Kruskal-Wallis test or repeated-measures ANOVA were used for multiple group comparisons. All results are expressed as mean \pm SEM. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

RESULTS

The VGLUT3-p.A211V mutation reduces the expression level of VGLUT3 *in vitro*

To compare expression of native VGLUT3 and VGLUT3-p.A211V, both alleles were expressed in cultures of BON cells or hippocampal neurons. The transcripts coding for both isoforms were expressed at similar levels in BON cells when detected by RT-PCR (Fig. 2A; Mann Whitney test, $p > 0.05$, $n = 6$). In contrast, VGLUT3-p.A211V protein levels were markedly reduced relatively to the WT isoform when measured by western blot in BON cells (Fig. 2B; -64%, Mann Whitney test, $p = 0.0079$, $n = 5$) or in hippocampal neuronal cultures (Fig. 2C; -66%, Mann Whitney test, $p = 0.028$, $n = 4$). This decrease was also confirmed by immunofluorescence detection of VGLUT3 and VGLUT3-p.A211V in BON cells (Fig. 2D; F, G; -79%, Mann Whitney test, $p = 0.028$, $n = 4$) or in hippocampal neuronal cultures (Fig. 2E, H, I; -86%, Mann Whitney test, $p = 0.008$, $n = 5$). The same point mutation was then introduced into the coding sequence of VGLUT1 (VGLUT1-p.A198V). Interestingly, VGLUT1-p.A198V expression was dramatically reduced (Fig. 2J-L; -90%, Mann Whitney test, $p = 0.005$, $n = 6$). Therefore changing the alanine of the KWAPPLER motif for a valine is sufficient to markedly reduce the expression of vesicular glutamate transporters.

We then assessed whether VGLUT3-p.A211V was addressed to synaptic boutons on neuronal hippocampal cultures. Indeed, both VGLUT3 and VGLUT3-p.A211V were addressed to punctiform structures that co-localized with presynaptic markers such as synaptophysin or bassoon and apposed to PSD95 elements (Fig. 2M-R). Thus, the p.A211V mutation did not qualitatively alter the targeting of VGLUT3 to synaptic boutons.

Glutamate vesicular uptake and release are minimally altered by the p.A211V mutation

We, then, wondered whether and how the p.A211V altered the 3D structure of VGLUT3. These theoretical models were obtained using crystal structures of major facilitator superfamily (MFS) proteins (Fig. 3A-D), notably the Glycerol-3-Phosphate Transporter (GlpT) from *E. coli* (PDB ID: 1PW4, 19% identity; 39% similarity with VGLUT3) as a template (J.

Almqvist et al., 2007). As can be seen on Fig. 3A, on these putative 3D models, alanine 211 is strategically located on a small cytoplasmic loop (cytoplasmic loop 4, CL4) and at the top of the transporter pore. Switching a valine for an alanine in this position only minimally modified the 3D structure of the loop. However, the model predicted an interesting network of interaction. In particular, in WT isoform, A211 interacted with the N-terminal domain of VGLUTs through cysteine 57 hydrophobic binding as well as with leucine 214 in CL4. These interactions were lost with the p.A211V mutation. Therefore, the 3D model suggests that the alanine residue of WT (Fig. 3A, B) and valine residue of VGLUT3-p.A211V (Fig. 3C, D) faced the pore and hence could affect the entry of the glutamate into the lumen of synaptic vesicles. Therefore, [³H]L-glutamate accumulation was measured in vesicular fractions from BON cells expressing VGLUT3 or VGLUT3-p.A211V. A small but not significant reduction of vesicular glutamate uptake was observed with the VGLUT3-p.A211V isoform (Fig. 3E, Mann Whitney test, $p > 0.05$). Hence, despite a 60-80% reduction in expression, the mutated VGLUT3 appeared as efficient as the WT allele to perform glutamate translocation inside vesicles.

The capacity of glutamate release from neurons expressing the VGLUT3-p.A211V isoform was then evaluated by electrophysiological recordings.

We utilized autaptic hippocampal cultured neurons obtained from newborn VGLUT1^{-/-} mice that were rescued by lentiviral driven expression of either VGLUT3 or VGLUT3-p.A211V. After two weeks in culture, synaptic responses were evoked using standard approaches. The mean normalized EPSC peak amplitude was not different between VGLUT3 WT (n = 72) and VGLUT3-p.A211V (n = 73)(Fig. 3F). This is in contrast to EPSC responses from VGLUT1^{-/-} neurons that showed a severe reduction in synaptic response, demonstrating that VGLUT3 WT and the p.A211V mutant rescued responses equally well. We, next determined the readily releasable pool (RRP) size of VGLUT3, VGLUT3-p.A211V and VGLUT1^{-/-} neurons by applying hypertonic sucrose (500 mM during 5 s; (C. Rosenmund and C. F. Stevens, 1996)). The charge in VGLUT1^{-/-} neurons was reduced by 80% as expected (n = 73, $p < 0.01$ ((S. M. Wojcik et al., 2004)), VGLUT3 WT and VGLUT3-p.A211V neurons had similar RRP charge

(Fig. 3G). The expression levels of WT and VGLUT3-p.A211V rescues determined by immunofluorescence were not different (Fig. 3H). Moreover, facilitation of responses evoked in pairs of action potentials stimulation (25 ms interval, Fig. 3I) and the vesicular release probability were not different between VGLUT3 (n = 72) and VGLUT3-p.A211V (n = 73) (Fig. 3J). The release probability in the VGLUT1^{-/-} were reduced as expected (S. M. Wojcik et al., 2004; M. A. Herman et al., 2014). Analysis of spontaneous release activity demonstrated that mean frequency of mEPSCs was significantly different in all three groups (Fig. 3L). In hippocampal VGLUT3-p.A211V neurons, mEPSC frequency was reduced by almost 30% (Fig. 3L; VGLUT3, 8,5 Hz, n = 72; VGLUT3-p.A211V, 6 Hz, n = 77, $p < 0.005$). In VGLUT1^{-/-} neurons, mEPSC frequency was reduced by 80% (Fig. 3L; 1,8 Hz, n = 51, $p < 0.0005$), a finding consistent with the reduced RRP size (Fig. 3G) and previously published (S. M. Wojcik et al., 2004). The mean mEPSC amplitude was slightly reduced in VGLUT3-p.A211V neurons compared to WT (Fig. 3M; VGLUT3, n = 62; VGLUT3-p.A211V, n = 67; $p < 0.005$), mEPSCs charge was also slightly decreased in VGLUT3-p.A211V neurons compared to WT neurons (Fig. 3N; VGLUT3 WT, n = 62; VGLUT3-p.A211V, n = 67; $p < 0.005$). Taken together, the p.A211V does not alter the quantity of glutamate release, the RRP size and the release probability. In contrast, slightly effects were shown in spontaneous release activity.

The expression of VGLUT3-p.A224V is dramatically reduced in terminals from the mouse CNS

The p.A211V mutation is responsible for the DFNA25 progressive deafness (J. Ruel et al., 2008). In order to gain insight on the underlying mechanisms, we used a newly generated knockin mouse where the corresponding amino acid was mutated in the VGLUT3 mouse genome (VGLUT3^{A224V/A224V}, Fig. 1). First, the expression levels of VGLUT3 mRNA and protein were measured by *in situ* hybridization, immunautoradiography and western blot at different ages (P10, 3, 6 and 12 months) in WT, heterozygous and homozygous mice (Fig. 4). As can be seen on Fig. 4, the levels of VGLUT3 transcript were unaltered in the striatum, hippocampus and raphe area at all aged considered. In contrast, as already observed in cell

culture, the protein levels were markedly altered at various ages in the striatum, hippocampus and raphe of VGLUT3^{A224V/A224V} mice (Fig. 4 and Table I). In the striatum of VGLUT3^{A224V/A224V} mice, the levels of the mutant protein measured by immunohistochemistry were reduced by 76 to 85% compared to WT at all ages (Fig. 4A-H and Table I; Mann Whitney test for P10 and 12 months; Kruskal-Wallis test for 3 and 6 months; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). A similar decrease in the protein levels was seen in the hippocampus as well as the raphe nuclei with 69-76% and 50-74% reductions measured in the respective tissues at the same time points. Hence, the mean decrease across ages and brain areas in VGLUT3^{A224V/A224V} mice was 70,3% (SEM \pm 2.7, $n = 12$). Reduced VGLUT3-p.A224V levels were also measured in mice expressing only one copy of the mutated and one copy of the WT gene (3-and 6-month old heterozygous VGLUT3^{A224V/+} mice, Fig. 4 and Table I). In heterozygous mice, the mean decrease was 34% (SEM \pm 4.1, $n = 8$). These results were further confirmed by western blotting experiments performed in the cortex, striatum and hippocampus of 3 month-old VGLUT3^{A224V/+} and VGLUT3^{A224V/A224V} mice (Fig. 4I-J and Table II; Kruskal-Wallis test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). In summary, VGLUT3 expression was globally reduced by 70% in the brain of VGLUT3^{A224V/A224V} mice at all ages.

Unlike VGLUT1 and VGLUT2, which are almost exclusively present in nerve endings, VGLUT3 is present in both terminals and neuronal cell bodies (C. Gras et al., 2002; J. Somogyi et al., 2004). We, therefore, studied the cellular and subcellular distribution of VGLUT3-p.A224V in these cellular compartments (Fig. 5). The expression of VGLUT3-p.A224V was dramatically reduced in terminals from the striatum or the hippocampus (CA1) compared to the WT levels (Fig. 5A, B, C, striatum: -69%, Mann Whitney test, $p < 0.0001$, $n = 19$; Fig. 5E, F, G, hippocampus: -72%, Mann Whitney test, $p < 0.0001$, $n = 20$; 8 animals per genotype). However, surprisingly, VGLUT3 levels were similar in the soma of tonically active cholinergic interneurons (TANs) and hippocampal basket cells from WT and VGLUT3^{A224V/A224V} mice (Fig. 5D, H, Mann Whitney test, $p > 0.05$). Furthermore, using electron microscopy, we observed that in TANs, the WT as well as the VGLUT3-p.A224V

isoforms were distributed over similar subcellular organelles, including the endoplasmic reticulum (Fig. 5I, J). Taken together, these data suggested that the VGLUT3-p.A224V isoform was not abnormally accumulated in the soma of neurons and that its expression was massively reduced in terminals.

The mobility of the VGLUT3-p.A211V is minimally modified

The above-described results suggested that VGLUT3-p.A211V was either not properly trafficked or degraded in nerve endings. To test the first hypothesis, we used Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) to assess the mobility of VGLUT3 WT or VGLUT3-p.A211V in synaptic boutons as recently described (E. Herzog et al., 2011). Hippocampal neurons were transduced at DIV1 with a lentiviral vector expressing either the WT isoform of VGLUT3 or VGLUT3-p.A211V; both were tagged with the YFP derivative venus (Fig. 6A). VGLUT3-p.A211V transduction was adjusted to match expression levels of WT VGLUT3. Transduction of both isoforms yielded a punctate distribution of venus fluorescence reminiscent of presynaptic localization. A bleaching light pulse was applied to regions of interest (ROI) surrounding individual boutons in mature neurons after 17-21 days in culture (Fig. 6A). The exchange of bleached synaptic vesicles (SVs) and fluorescently labeled SVs from neurites surrounding the ROI were monitored during the next 75 minutes (Fig. 6A). VGLUT3-p.A211V fluorescence recovered to similar levels compared to the wild-type protein (Fig. 6A, B). An additional FRAP experiment with faster imaging rates in the first five minutes was performed in order to reveal possible differences in the initial recovery phase (Fig. 6B, fast FRAP inset). Kinetics of recovery seemed slightly different but these differences were not statistically significant. Yet the amplitude of recovery at 1 hour was similar for mutant and wild-type experiments (Fig 6C, Mann Whitney test, $p = 0.1129$). Therefore, the p.A224V mutation powerfully reduced VGLUT3 expression in terminals without altering its mobility.

The p.A224V mutation minimally altered behaviors of mutated mice

Mice lacking VGLUT3 (VGLUT3^{-/-}) demonstrate increased anxiety behavior as well as augmented basal and cocaine-induced locomotor activity (C. Gras et al., 2008; B. Amilhon et al., 2010; D. Y. Sakae et al., 2015). We, thus decided to characterize these behaviors in adult (3-4 month-old) male VGLUT3^{A224V/A224V} mice that have only 30% of VGLUT3 left. We, first assessed anxiety levels of WT and mutant animals in an open field or an elevated plus maze (Fig. 7A, B). Spontaneous as well as cocaine-induced locomotor activities were also measured (Fig. 7C, D). No significant differences between WT and VGLUT3^{A224V/A224V} mice were observed in any paradigm.

VGLUT3^{A224V/-} mice expressed only 20% of VGLUT3 but displayed no behavioral alteration

Despite a massive loss of VGLUT3 in their terminals, mice expressing two copies of the VGLUT3-p.A224V alleles (VGLUT3^{A224V/A224V}) displayed none of the two altered phenotypes reported in mice totally lacking VGLUT3 (VGLUT3^{-/-}, (C. Gras et al., 2008)). In order to obtain mouse with only one copy, the VGLUT3-p.A224V isoform, we, then crossed heterozygous VGLUT3^{+/-} mice with heterozygous VGLUT3^{A224V/+} mice.

As shown in Fig. 8A, the decrease of VGLUT3 expression was more pronounced in VGLUT3^{A224V/-} than VGLUT3^{A224V/A224V} in mice. In the striatum of 3-month-old VGLUT3^{A224V/-} mice, VGLUT3 expression was reduced by 78% (Mann Whitney test, $p = 0.012$ relatively to WT, $n = 8$), 83% of the protein was lost in the hippocampus (Mann Whitney test, $p = 0.012$ relatively to WT, $n = 8$) and 71% in the raphe (Mann Whitney test, $p = 0.028$ relatively to WT, $n = 4$). Therefore, mutant with one copy of the VGLUT3-p.A224V isoform displayed the lowest level of VGLUT3 expression among our panel of mutants.

We compared anxious behaviors of WT and VGLUT3^{A224V/-} mice in the open field and elevated plus maze and found no differences (Fig. 8B, C). We, then, inspected basal and cocaine-induced locomotor activity of WT and VGLUT3^{A224V/-} mice (Fig. 8D, E). During the first two hours, we recorded basal locomotor activity of mutant and WT mice and observed a

significant increase in the activity in VGLUT3^{A224V/-} mice (Fig. 8D, repeated-measures ANOVA, $F_{(1, 29)}=1.472$, $p < 0.05$; E, cumulative analysis, +41%, Mann Whitney test, $p = 0.0329$). In contrast, the locomotor activity levels after cocaine injections were similar in both genotypes (Fig. 8E, Mann Whitney test, $p > 0.05$).

Therefore, with only one copy of the VGLUT3-p.A224V isoform and only 20% VGLUT3 left, we started to detect minimal alteration mutant mice behaviors.

The point mutation p.A224V did not modify VGLUT3-dependent vesicular synergy over cortical [³H]5-HT accumulation

Finally, we investigated whether the p.A224V mutation was able to alter the vesicular accumulation of glutamate mediated by VGLUT3 in brain structures. VGLUT3 is a minor subtype when compared with VGLUT1 and VGLUT2. It is, therefore, not possible to directly assess VGLUT3 activity in brain tissues. However, it has been previously established that VGLUT3 accelerates 5-HT accumulation in cortical synaptic vesicles by a molecular process named vesicular synergy (B. Amilhon et al., 2010; S. El Mestikawy et al., 2011). Reserpine-sensitive vesicular uptake of [³H]5-HT was measure in the presence (+) or absence (-) of L-glutamate (Fig. 9). As previously reported (B. Amilhon et al., 2010), L-glutamate (10 mM) increased [³H]5-HT reserpine-sensitive accumulation by 27% (Fig. 9, Mann Whitney test, $p < 0.0001$, $n = 26$) in cortical synaptic vesicles from WT mice but had no effect on VGLUT3^{-/-} mice. Similarly as in WT, we observed a vesicular synergy on 5-HT vesicular uptake of +27% in VGLUT3^{A224V/+} mice (Mann Whitney test, $p = 0.0014$, $n = 7$), +22% in VGLUT3^{A224V/A224V} mice (Mann Whitney, $p < 0.0001$, $n = 19$) and +22% in VGLUT3^{A224V/-} mice (Mann Whitney test, $p < 0.001$, $n = 19$). The stimulatory effect of glutamate on 5-HT cortical vesicular uptake was not statistically different between WT and these three genotypes (one-way ANOVA, $p > 0.05$). We concluded from these observations that VGLUT3 activity was probably unaltered even in mice expressing only 20-30% of the transporter.

High resolution fluorescence microscopy suggested that the p.A224V mutation altered the number of VGLUT3-positive vesicles

The above-described results strongly suggested that the p.A224V mutation massively reduces the number of VGLUT3 copies in synaptic boutons. This decrease in copy number could result from either i) a reduction in the number of copies of the transporter on each vesicle or ii) the number of VGLUT3-positive vesicles in each terminal.

In an attempt to gain further insight on this issue, we used STED super resolution imaging of VGLUT3 in various genotypes.

The STED microscopic observations after the immunodetection showed spotty labeling of VGLUT3 and synaptophysin (Fig. 10A-E). The number of observed spots was maximum in WT mouse, virtually nil in VGLUT3^{-/-} and decreased regularly between VGLUT3^{A224V/+}, VGLUT3^{A224V/A224V} and VGLUT3^{A224V/-} mice. The quantification of VGLUT3 immunopositive spots demonstrated a decrease of 44% (Kruskal-Wallis test, $p = 0.029$), 79% (Kruskal-Wallis test, $p = 0.028$), 84% (Kruskal-Wallis test, $p = 0.025$) in VGLUT3^{A224V/+}, VGLUT3^{A224V/A224V} and VGLUT3^{A224V/-} mice, respectively (Fig. 10F). This decrease is significantly correlated with the VGLUT3 expression detected by immunautoradiography (Fig. 10G, linear regression, $r^2 = 0.9861$, $p = 0.0007$). Interestingly, increasing of the laser power did not increase the number of detected spots (Fig. 10H, Kruskal-Wallis test, $p > 0.05$) nor did it allow the detection of a population of spots with low intensity labeling.

Therefore, STED imaging suggested that diminishing the expression of VGLUT3 reduced the number of VGLUT3-positive vesicles. However, it was not possible with this method to determine whether or not the number of VGLUT3 copy per vesicle was reduced.

DISCUSSION

In two human families, a point mutation in the gene coding for VGLUT3 changes nucleotide c.632C/T (amino acid Alanine 211 changed for a Valine) and segregates with an early onset form of presbycusis (named DFNA25, (J. Ruel et al., 2008)). The VGLUT3-p.A211V (VGLUT3-p.A224V in rodent) point mutation is the first mutation of a VGLUT that was demonstrated to be responsible for a human pathology. The impact of this mutation on the auditory system of rodent is under current investigation (Miot et al., manuscript in preparation). The aim of the present study was to determine in cell cultures as well as in a genetic mouse model if and how the p.A211V mutation influence the central nervous system. Interestingly, the alanine in position 211 is part of a peptide sequence (KWAPPLER) that is conserved among VGLUTs and even present in a more distant relative named sialin. According to the theoretical model (Fig. 3A-D), the KWAPPLER motif is part of a small cytoplasmic loop that faces the pore of the transporter. Both the conservation and the localization of alanine 211 suggest its functional importance. Structurally, our 3D model predicted that changing the alanine for valine has little influence on the structure of VGLUT3. In line with this conclusion, glutamate vesicular accumulation in BON cells or evoked EPSCs observed in isolated neuronal cultures expressing the VGLUT3-p.A211V isoform were not different from the one observed with the WT isoform. Furthermore, indirect estimation of VGLUT3 activity in cortical synaptic vesicles (by measuring vesicular synergy) provided evidence that VGLUT3 ability to assure the uptake of glutamate was not different in the brain of WT or mutant (heterozygous or homozygous) mice.

However, both in cell cultures and in a genetic knockin mouse model, the p.A211V mutation have dramatic effect on the expression of the transporter. The average decrease of VGLUT3 across brain areas and ages was $70 \pm 2.7\%$. In human, the auditory loss is slow and age-dependent, with an onset between 20 and 30 year old. Interestingly, in the mouse brain the impact of the p.A224V mutation appears to be constant between P10 and 12 months old. This observation suggests that auditory loss could not be related to a decreased expression of VGLUT3.

In VGLUT3^{A224V/A224V} mice, the amounts of the mutated transporters are dramatically reduced in terminals from the hippocampus, striatum and the cortex. The point mutation had no effect on the mRNA or on protein levels in the soma and proximal dendrites of VGLUT3-positive neurons. This implies that the mutation is not altering transcription or translation steps of VGLUT3 synthesis. Furthermore, the mobility of VGLUT3-p.A224V was not changed in axons of VGLUT3^{A224V/A224V} mice. These results suggested that the VGLUT3-p.A224V protein was less stable or more rapidly degraded in terminals. Further investigations will be needed to clarify this issue.

We estimated the activity of VGLUT3-p.A224V i) directly, by measuring glutamate uptake in vesicles of BON cells and ii) indirectly by measuring electrical signaling of single neurons expressing the mutated transporter or by measuring vesicular synergy in cortical vesicles. In all cases, we found very minimal or no modification of VGLUT3 activity. These observations strongly contradict the notion that the number of VGLUT molecules present on a synaptic vesicle determines how much glutamate is loaded into the vesicle. Previous reports establish that mice completely lacking VGLUT3 demonstrate an increased anxiety and sensitivity to cocaine (C. Gras et al., 2008; B. Amilhon et al., 2010; D. Y. Sakae et al., 2015). Here, none of these phenotypes were observed with VGLUT3^{A224V/A224V} mice lacking more than 70% of VGLUT3 and moderate effects were monitored in locomotor activity with a mutant lacking up to 80% of VGLUT3 (VGLUT3^{A224V/-}). Our results show that despite a massive reduction of VGLUT3 amounts, its biochemical and integrated functions are unchanged. Therefore as depicted by the model on Fig. 11A, VGLUT3 expression is not linearly correlated with VGLUT3 activity. The threshold where a diminution of VGLUT3 level will start to impact on its function is situated in a narrow range between 25 and 0% (Fig. 11A).

Are these observations also valid for VGLUT1 and VGLUT2? Whether or not vesicular accumulation of glutamate catalyzed by VGLUT1 or VGLUT2 is or not proportional to the amount of transporters has been a matter of debates (for review see (K. Schuske and E. M. Jorgensen, 2004) and (R. T. Fremeau, Jr. et al., 2004; S. M. Wojcik et al., 2004)). Wojcik et al. report a decrease of mEPSC amplitude and frequency in neurons lacking VGLUT1 and

conversely an increased quantal size in neurons over-expressing VGLUT1 (S. M. Wojcik et al., 2004). These observations plead in favor of a linear relationship between VGLUT1 amounts and VGLUT1 activity. However, if glutamate vesicular loading and transmission were proportional to the copy number of VGLUTs, then heterozygous knockout mice (which express 50% of VGLUTs) should display 50% decrease of glutamatergic signaling and this should in turn impact on related behaviors. To our knowledge, no particular phenotype has been reported so far with VGLUT3^{+/-} heterozygous mice. Regarding VGLUT1, Fremeau et al. show that VGLUT1^{+/-} heterozygous mice displayed normal excitatory transmission (R. T. Fremeau, Jr. et al., 2004). In contrast, impaired mood regulation and memory were reported in VGLUT1^{+/-} heterozygous mice (R. M. Tordera et al., 2007; D. Balschun et al., 2010). VGLUT2^{+/-} heterozygous mice express only 50% of WT protein levels but demonstrate only discrete phenotypes in taste aversion, nociceptive responses and clonic seizures (D. Moechars et al., 2006; S. Leo et al., 2009; A. Schallier et al., 2009). However, these phenotypes are often shallow. Therefore, unlike the monoamine or the acetylcholine vesicular transporter, VMAT2 and VACHT (E. A. Fon et al., 1997; V. F. Prado et al., 2006), the activity of VGLUTs do not seem to be strictly proportional to the amount of transporter, at least in the 100-50% range.

Takamori and coworkers found that synaptic vesicles are decorated with 10 copies of VGLUT1 or 14 copies of VGLUT2 molecules (S. Takamori et al., 2006). Hence, there are multiple copies of VGLUT1-2 inserted in vesicular membranes. The exact number of copy of VGLUT3 present on individual synaptic vesicles is not yet determined. However, it can be reasonably assumed that, like VGLUT1 and VGLUT2, multiple copies of VGLUT3 are inserted in the membrane of synaptic vesicles. This redundancy of VGLUTs could buffer the effect of losing transporter copies. Indeed, Daniels et al. reported that in drosophila, reduced levels of DVGLUTs resulted in a reduction of mEPSC frequency with no change in quantal size (R. W. Daniels et al., 2006). They concluded that a single copy of DVGLUT was efficient enough to fill a vesicle with glutamate and maintain a normal quantal size. Indeed, recent data show that VGLUTs can very efficiently accumulate glutamate under the proper

concentration of Cl⁻ ions (S. Schenck et al., 2009; J. Preobraschenski et al., 2014).

As depicted in Fig. 11B, reducing VGLUT3 at synapses can be achieved by either reducing the number of copy per vesicles (model 1).

In the present study, we monitor a normal loading of [³H]L-glutamate in VGLUT3-p.A211V positive BON vesicles. However, a small decrease of mEPSC amplitude was observed in isolated neurons expressing the mutated isoform. This discrepancy between vesicular uptake and electrophysiological measurements can easily be explained by a difference in sensitivity of both methods. In line with this explanation, a small but not significant decrease was visible when glutamate uptake was performed with vesicles from BON cells expressing VGLUT3-p.A211V (see Fig. 11B).

According to models depicted in Fig. 11B, we suggests that VGLUT3-p.A211V-transfected neurons express vesicles with a low copy number that are consequently less efficient to upload glutamate than WT vesicles (Fig. 11B). If, as recently suggested, one copy of a VGLUT is enough to maintain the quantal size (S. M. Wojcik et al., 2004; R. W. Daniels et al., 2006; S. Schenck et al., 2009; J. Preobraschenski et al., 2014), then the molecular model 1 explains why vesicular accumulation of glutamate is slightly decreased and vesicular synergy is maintained in vesicle with reduced expression of VGLUT3. However, model 1 (Fig. 11B) is in conflict with STED imaging showing a decrease number of fluorescent event in synapses. Therefore, the STED observations and the reduced frequency of mEPSC are in agreement with the vesicular model 2. Our observations do not allow ruling out one of these models. A third model could better explain all experimental results. In this third model, three types of vesicles are found in synapses of VGLUT3^{A224V/A224V} mice: i) vesicles with no VGLUT3, ii) vesicles with the correct number of VGLUT3-p.A224V copies and iii) vesicles where VGLUT3 copies are uniformly decreased to a very low level in all vesicles. Model 3 would better describe experimental results If we hypothesize that: i) STED is not able to detect vesicles with very low VGLUT3 copy number and ii) VGLUT3-p.A224V vesicles have a small decrease of the quantal size.

The p.A211V mutation profoundly alters expression levels of VGLUT3, however, minimally

alter its functions. Our study unravels unexpected redistribution of VGLUT3 in synaptic vesicles of VGLUT3^{A224V/A224V} mice. Furthermore, it shows that the relationship between the number of VGLUT3 molecules and its molecular and physiological implication is not linear. Further experiments will be required to validate or invalidate one of the three models proposed in Fig. 11. Clarifying this question will be key for a full understanding of pathologies involving the VGLUTs.

REFERENCES

- Almqvist J, Huang Y, Laaksonen A, Wang DN, Hovmoller S (2007) Docking and homology modeling explain inhibition of the human vesicular glutamate transporters. *Protein Sci* 16:1819-1829.
- Amilhon B, Lepicard E, Renoir T, Mongeau R, Popa D, Poirel O, Miot S, Gras C, Gardier AM, Gallego J, Hamon M, Lanfumey L, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S (2010) VGLUT3 (vesicular glutamate transporter type 3) contribution to the regulation of serotonergic transmission and anxiety. *J Neurosci* 30:2198-2210.
- Balschun D, Moechars D, Callaerts-Vegh Z, Vermaercke B, Van Acker N, Andries L, D'Hooge R (2010) Vesicular glutamate transporter VGLUT1 has a role in hippocampal long-term potentiation and spatial reversal learning. *Cereb Cortex* 20:684-693.
- Bellocchio EE, Reimer RJ, Fremeau RT, Edwards RH (2000) Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science* 289:957-960.
- Bernard V, Levey AI, Bloch B (1999) Regulation of the subcellular distribution of m4 muscarinic acetylcholine receptors in striatal neurons in vivo by the cholinergic environment: evidence for regulation of cell surface receptors by endogenous and exogenous stimulation. *J Neurosci* 19:10237-10249.
- Daniels RW, Miller BR, DiAntonio A (2011) Increased vesicular glutamate transporter expression causes excitotoxic neurodegeneration. *Neurobiol Dis* 41:415-420.
- Daniels RW, Collins CA, Chen K, Gelfand MV, Featherstone DE, DiAntonio A (2006) A single vesicular glutamate transporter is sufficient to fill a synaptic vesicle. *Neuron* 49:11-16.
- Daniels RW, Collins CA, Gelfand MV, Dant J, Brooks ES, Krantz DE, DiAntonio A (2004) Increased expression of the *Drosophila* vesicular glutamate transporter leads to excess glutamate release and a compensatory decrease in quantal content. *J Neurosci* 24:10466-10474.
- De Gois S, Slama P, Pietrancosta N, Erdozain AM, Louis F, Bouvrais-Veret C, Daviet L, Giros B (2015) Ctr9, a Protein in the Transcription Complex Paf1, Regulates Dopamine Transporter Activity at the Plasma Membrane. *J Biol Chem* 290:17848-17862.
- El Mestikawy S, Wallen-Mackenzie A, Fortin GM, Descarries L, Trudeau LE (2011) From glutamate co-release to vesicular synergy: vesicular glutamate transporters. *Nat Rev Neurosci* 12:204-216.
- Feyfant E, Sali A, Fiser A (2007) Modeling mutations in protein structures. *Protein Sci* 16:2030-2041.
- Fon EA, Pothos EN, Sun BC, Killeen N, Sulzer D, Edwards RH (1997) Vesicular transport regulates monoamine storage and release but is not essential for amphetamine action. *Neuron* 19:1271-1283.
- Fremeau RT, Troyer MD, Pahner I, Nygaard GO, Tran CH, Reimer RJ, Bellocchio EE, Fortin D, Storm-Mathisen J, Edwards RH (2001) The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron* 31:247-260.
- Fremeau RT, Burman J, Qureshi T, Tran CH, Proctor J, Johnson J, Zhang H, Sulzer D, Copenhagen DR, Storm-Mathisen J, Reimer RJ, Chaudhry FA, Edwards RH (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.
- Fremeau RT, Jr., Kam K, Qureshi T, Johnson J, Copenhagen DR, Storm-Mathisen J, Chaudhry FA, Nicoll RA, Edwards RH (2004) Vesicular glutamate transporters 1 and 2 target to functionally distinct synaptic release sites. *Science* 304:1815-1819.
- Gras C, Herzog E, Bellenchi GC, Bernard V, Ravassard P, Pohl M, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S (2002) A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J Neurosci* 22:5442-5451.

- Gras C, Amilhon B, Lepicard EM, Poirel O, Vinatier J, Herbin M, Dumas S, Tzavara ET, Wade MR, Nomikos GG, Hanoun N, Saurini F, Kemel ML, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S (2008) The vesicular glutamate transporter VGLUT3 synergizes striatal acetylcholine tone. *Nat Neurosci* 11:292-300.
- Herman MA, Ackermann F, Trimbuch T, Rosenmund C (2014) Vesicular glutamate transporter expression level affects synaptic vesicle release probability at hippocampal synapses in culture. *J Neurosci* 34:11781-11791.
- Herzog E, Gilchrist J, Gras C, Muzerelle A, Ravassard P, Giros B, Gaspar P, El Mestikawy S (2004) Localization of VGLUT3, the vesicular glutamate transporter type 3, in the rat brain. *Neuroscience* 123:983-1002.
- Herzog E, Bellenchi GC, Gras C, Bernard V, Ravassard P, Bedet C, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S (2001) The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J Neurosci* 21:RC181.
- Herzog E, Nadrigny F, Silm K, Biesemann C, Helling I, Bersot T, Steffens H, Schwartzmann R, Nägerl UV, El Mestikawy S, Rhee J, Kirchhoff F, Brose N (2011) In vivo imaging of intersynaptic vesicle exchange using VGLUT1 Venus knock-in mice. *J Neurosci* 31:15544-15559.
- Higley MJ, Gittis AH, Oldenburg IA, Balthasar N, Seal RP, Edwards RH, Lowell BB, Kreitzer AC, Sabatini BL (2011) Cholinergic interneurons mediate fast VGLUT3-dependent glutamatergic transmission in the striatum. *PLoS One* 6:e19155.
- Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305:567-580.
- Leo S, Moechars D, Callaerts-Vegh Z, D'Hooge R, Meert T (2009) Impairment of VGLUT2 but not VGLUT1 signaling reduces neuropathy-induced hypersensitivity. *Eur J Pain* 13:1008-1017.
- McAnaney TB, Zeng W, Doe CF, Bhanji N, Wakelin S, Pearson DS, Abbyad P, Shi X, Boxer SG, Bagshaw CR (2005) Protonation, photobleaching, and photoactivation of yellow fluorescent protein (YFP 10C): a unifying mechanism. *Biochemistry* 44:5510-5524.
- Moechars D, Weston MC, Leo S, Callaerts-Vegh Z, Goris I, Daneels G, Buist A, Cik M, van der Spek P, Kass S, Meert T, D'Hooge R, Rosenmund C, Hampson RM (2006) Vesicular glutamate transporter VGLUT2 expression levels control quantal size and neuropathic pain. *J Neurosci* 26:12055-12066.
- Nelson AB, Bussert TG, Kreitzer AC, Seal RP (2014) Striatal cholinergic neurotransmission requires VGLUT3. *J Neurosci* 34:8772-8777.
- Peirs C, Williams SP, Zhao X, Walsh CE, Gedeon JY, Cagle NE, Goldring AC, Hioki H, Liu Z, Marell PS, Seal RP (2015) Dorsal Horn Circuits for Persistent Mechanical Pain. *Neuron* 87:797-812.
- Prado VF et al. (2006) Mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter are myasthenic and have deficits in object and social recognition. *Neuron* 51:601-612.
- Preobraschenski J, Zander JF, Suzuki T, Ahnert-Hilger G, Jahn R (2014) Vesicular glutamate transporters use flexible anion and cation binding sites for efficient accumulation of neurotransmitter. *Neuron* 84:1287-1301.
- Rosenmund C, Stevens CF (1996) Definition of the readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses. *Neuron* 16:1197-1207.
- Ruel J, Emery S, Nouvian R, Bersot T, Amilhon B, Van Rybroek JM, Rebillard G, Lenoir M, Eybalin M, Delprat B, Sivakumaran TA, Giros B, El Mestikawy S, Moser T, Smith RJ, Lesperance MM, Puel JL (2008) Impairment of SLC17A8 encoding vesicular glutamate transporter-3, VGLUT3, underlies nonsyndromic deafness DFNA25 and inner hair cell dysfunction in null mice. *Am J Hum Genet* 83:278-292.

- Sakae DY et al. (2015) The absence of VGLUT3 predisposes to cocaine abuse by increasing dopamine and glutamate signaling in the nucleus accumbens. *Mol Psychiatry*.
- Schafer MK, Varoqui H, Defamie N, Weihe E, Erickson JD (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.
- Schallier A, Massie A, Loyens E, Moechars D, Drinkenburg W, Michotte Y, Smolders I (2009) vGLUT2 heterozygous mice show more susceptibility to clonic seizures induced by pentylenetetrazol. *Neurochem Int* 55:41-44.
- Schenck S, Wojcik SM, Brose N, Takamori S (2009) A chloride conductance in VGLUT1 underlies maximal glutamate loading into synaptic vesicles. *Nat Neurosci* 12:156-162.
- Schuske K, Jorgensen EM (2004) Neuroscience. Vesicular glutamate transporter--shooting blanks. *Science* 304:1750-1752.
- Seal RP, Wang X, Guan Y, Raja SN, Woodbury CJ, Basbaum AI, Edwards RH (2009) Injury-induced mechanical hypersensitivity requires C-low threshold mechanoreceptors. *Nature* 462:651-655.
- Seal RP, Akil O, Yi E, Weber CM, Grant L, Yoo J, Clause A, Kandler K, Noebels JL, Glowatzki E, Lustig LR, Edwards RH (2008) Sensorineural deafness and seizures in mice lacking vesicular glutamate transporter 3. *Neuron* 57:263-275.
- Siksou L, Silm K, Biesemann C, Nehring RB, Wojcik SM, Triller A, El Mestikawy S, Marty S, Herzog E (2013) A role for vesicular glutamate transporter 1 in synaptic vesicle clustering and mobility. *Eur J Neurosci* 37:1631-1642.
- Somogyi J, Baude A, Omori Y, Shimizu H, El Mestikawy S, Fukaya M, Shigemoto R, Watanabe M, Somogyi P (2004) GABAergic basket cells expressing cholecystokinin contain vesicular glutamate transporter type 3 (VGLUT3) in their synaptic terminals in hippocampus and isocortex of the rat. *Eur J Neurosci* 19:552-569.
- Takamori S, Rhee JS, Rosenmund C, Jahn R (2000) Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature* 407:189-194.
- Takamori S, Rhee JS, Rosenmund C, Jahn R (2001) Identification of differentiation-associated brain-specific phosphate transporter as a second vesicular glutamate transporter (VGLUT2). *J Neurosci* 21:RC182.
- Takamori S, Malherbe P, Broger C, Jahn R (2002) Molecular cloning and functional characterization of human vesicular glutamate transporter 3. *EMBO Rep* 3:798-803.
- Takamori S et al. (2006) Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* 127:831-846.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680.
- Tordera RM, Totterdell S, Wojcik SM, Brose N, Elizalde N, Lasheras B, Del Rio J (2007) Enhanced anxiety, depressive-like behaviour and impaired recognition memory in mice with reduced expression of the vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1). *Eur J Neurosci* 25:281-290.
- Tusnady GE, Simon I (2001) The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* 17:849-850.
- Varga V, Losonczy A, Zemelman BV, Borhegyi Z, Nyiri G, Domonkos A, Hangya B, Holderith N, Magee JC, Freund TF (2009) Fast synaptic subcortical control of hippocampal circuits. *Science* 326:449-453.
- Varoqui H, Schäfer MK, Zhu H, Weihe E, Erickson JD (2002) Identification of the differentiation-associated Na⁺/PI transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses. *J Neurosci* 22:142-155.

- Vigneault E, Poirel O, Riad M, Prud'homme J, Dumas S, Turecki G, Fasano C, Mechawar N, El Mestikawy S (2015) Distribution of vesicular glutamate transporters in the human brain. *Front Neuroanat* 9:23.
- Weston MC, Nehring RB, Wojcik SM, Rosenmund C (2011) Interplay between VGLUT isoforms and endophilin A1 regulates neurotransmitter release and short-term plasticity. *Neuron* 69:1147-1159.
- Wojcik SM, Rhee JS, Herzog E, Sigler A, Jahn R, Takamori S, Brose N, 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.
- Zander JF, Munster-Wandowski A, Brunk I, Pahner I, Gomez-Lira G, Heinemann U, Gutierrez R, Laube G, Ahnert-Hilger G (2010) Synaptic and vesicular coexistence of VGLUT and VGAT in selected excitatory and inhibitory synapses. *J Neurosci* 30:7634-7645.

FIGURES LEGENDS

A

```

mVGLUT3 MPFKAFDTFKEKILKPGKEGVKNAVGDSLGILQRKIDGTNEEDAIELNEEGRPVQTSRA 60
hVGLUT3 MPFKAFDTFKEKILKPGKEGVKNAVGDSLGILQRKIDGTTEEDNIELNEEGRPVQTSRP 107
mVGLUT1 MEFR-----QEEFRKLAGRALGRLHRLLEKRQEGAETLELSADGRPVTTTHR 47

mVGLUT3 HRPVCDSCCGIPKRYICDCSCCGIPKRYIIAVMSGLGFCISFGIRCNLGVAIVEMVNS 120
hVGLUT3 SPPLCDCHCCGLPK-----R-YIIAIMSGLGFCISFGIRCNLGVAIVEMVNS 107
mVGLUT1 DPPVVDCTCFGLPR-----R-YIIAIMSGLGFCISFGIRCNLGVAIVEMVNS 94

mVGLUT3 TVYVDGKPEIQTAQFNWDPETVGLIHGSFFWGYIVTQIPGGFISNKFAASRVFGAAIFLT 180
hVGLUT3 TVYVDGKPEIQTAQFNWDPETVGLIHGSFFWGYIMTQIPGGFISNKFAANRVFGAAIFLT 167
mVGLUT1 TTHRGHVVVQKAQFNWDPETVGLIHGSFFWGYIVTQIPGGFICQKFAANRVFGFAIVAT 154

mVGLUT3 STLNMFIPSAARVHYGCVMGVRILQGLVEGVTYPACHGMWSKWAPPLERSRLATTSFCGS 240
hVGLUT3 STLNMFIPSAARVHYGCVMCVRILQGLVEGVTYPACHGMWSKWAPPLERSRLATTSFCGS 227
mVGLUT1 STLNMLIPSAARVHYGCVIFVRILQGLVEGVTYPACHGIWSKWAPPLERSRLATTAFCGS 214

mVGLUT3 YAGAVVAMPLAGVLVQYIGWASVFIYGMFGIIWYMFWLLQAYECPAAHPTISNAERTYI 300
hVGLUT3 YAGAVVAMPLAGVLVQYIGWSSVFIYGMFGIIWYMFWLLQAYECPAAHPTISNEEKTYI 287
mVGLUT1 YAGAVVAMPLAGVLVQYISGSSVFIYGSFGIFWYLFWLLVSYESPALHPSISEEERKYI 274

mVGLUT3 ETSIGEGANLAS-LSKFNTPWRRFFTSLPVYAIIVANFCRSWTFYLLLISQPAYFEEVFG 359
hVGLUT3 ETSIGEGANVVS-LSKFSTPWKRFFTSLPVYAIIVANFCRSWTFYLLLISQPAYFEEVFG 346
mVGLUT1 EDAIGESAKLMNPVTKFNTPWRRFFTSMPVYAIIVANFCRSWTFYLLLISQPAYFEEVFG 334

mVGLUT3 FAISKVGLLSAVPHMVTIVVPIGGQLADYLRSRKILTTTAVRKIMNCGGFGMEATLLLV 419
hVGLUT3 FAISKVGLLSAVPHMVTIVVPIGGQLADYLRSRQILTTTAVRKIMNCGGFGMEATLLLV 406
mVGLUT1 FEISKVGLVSALPHLVMTIIVPIGGQIADFLRSRHIMSTTNVRKIMNCGGFGMEATLLLV 394

mVGLUT3 VGFSHTKGVAISFLVLAVGFSGFAISGFNVNHLDIAPRYASILMGISNGVGTLSGMVCP 479
hVGLUT3 VGFSHTKGVAISFLVLAVGFSGFAISGFNVNHLDIAPRYASILMGISNGVGTLSGMVCP 466
mVGLUT1 VGYSHSKGVAISFLVLAVGFSGFAISGFNVNHLDIAPRYASILMGISNGVGTLSGMVCP 454

mVGLUT3 IVGAMTKHKTREEWQNVFLIAALVHYSGVIFYGVFASGEKQDWADPENLSEDKCGIIDQD 539
hVGLUT3 IVGAMTRHKTREEWQNVFLIAALVHYSGVIFYGVFASGEKQEWADPENLSEDKCGIIDQD 526
mVGLUT1 IVGAMTKHKTREEWQYVFLIASLVHYGGVIFYGVFASGEKQPWAEPEEMSEDKCGFVGHD 514

mVGLUT3 ELAETEELNHETFVSPRKKM-----SYGATTQNCEVQKTEWRQRESAFDGEEPLSYQAE 594
hVGLUT3 ELAEEIELNHESFASPKKM-----SYGATSQNCEVQKKEWRGQRGATLDEEELTSYQNE 581
mVGLUT1 QLAGSDESEMEDEAEPGAPPAPPPSYGATHSTVQPPRPPPPVRDY----- 560

mVGLUT3 GDFSETS- 601
hVGLUT3 ERNFSTIS 589
mVGLUT1 ----- 560
    
```

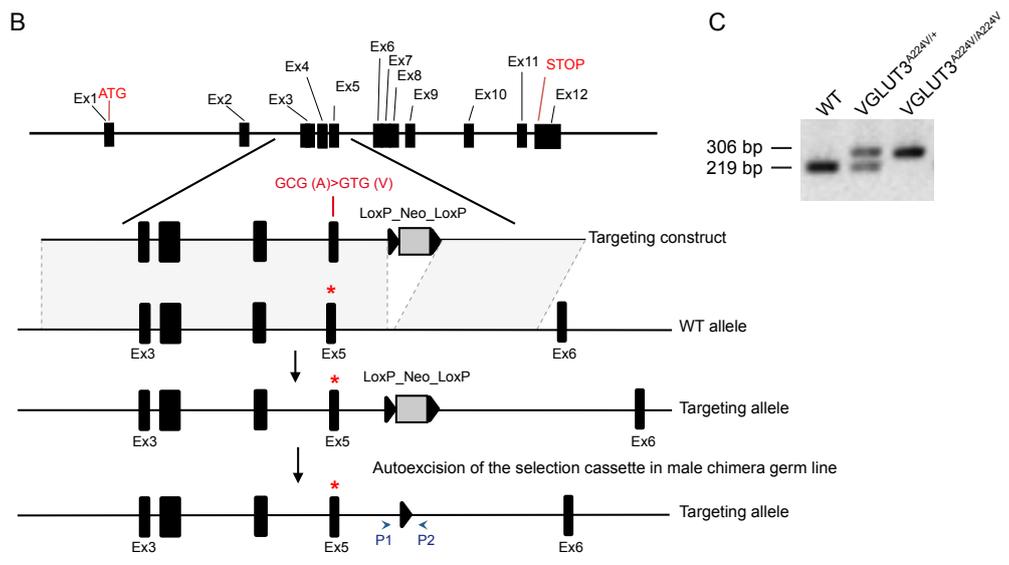


Figure 1 Ramet et al.

Figure 1. Alignment of VGLUTs protein sequences and VGLUT3^{A224V/A224V} mouse genomic construct. (A) Alignment of mouse (mVGLUT3), human (hVGLUT3) VGLUT3 and mouse VGLUT1 (mVGLUT1) amino acid sequences. The three peptidic sequences are highly conserved (black letters indicate residues conserved in the sequences, blue letters indicate residues that are different). The KWAPPLER motif (red boxed text) is conserved in all three sequences. The mutated alanine residue is in red. This alanine is in position 224, 211 and 198 in mVGLUT3, hVGLUT3 and mVGLUT1 amino acid sequences, respectively. (B) Schematic representation of the targeting strategy. A targeting vector was constructed where the GCG codon (coding for alanine 224) is replaced by GTG codon in exon 5. A neomycine resistance selection cassette (flanked by two sites Lox, LoxP_Neo_LoxP) was integrated downstream exon 5. An auto-excision of the selection cassette in male chimera germ line provides for a targeting allele with a valine in position 224 in exon 5 and a site LoxP used for the genotyping. (C) Genotyping strategy of VGLUT3 mouse by PCR. Mice were genotyped with a two primers (arrowheads P1, P2 in B) flanking each side of the site LoxP. PCR amplification of the wild-type (WT) allele (+) yielded a 219 bp band and the mutated allele (A224V) yielded a 306 bp band on agarose gel.

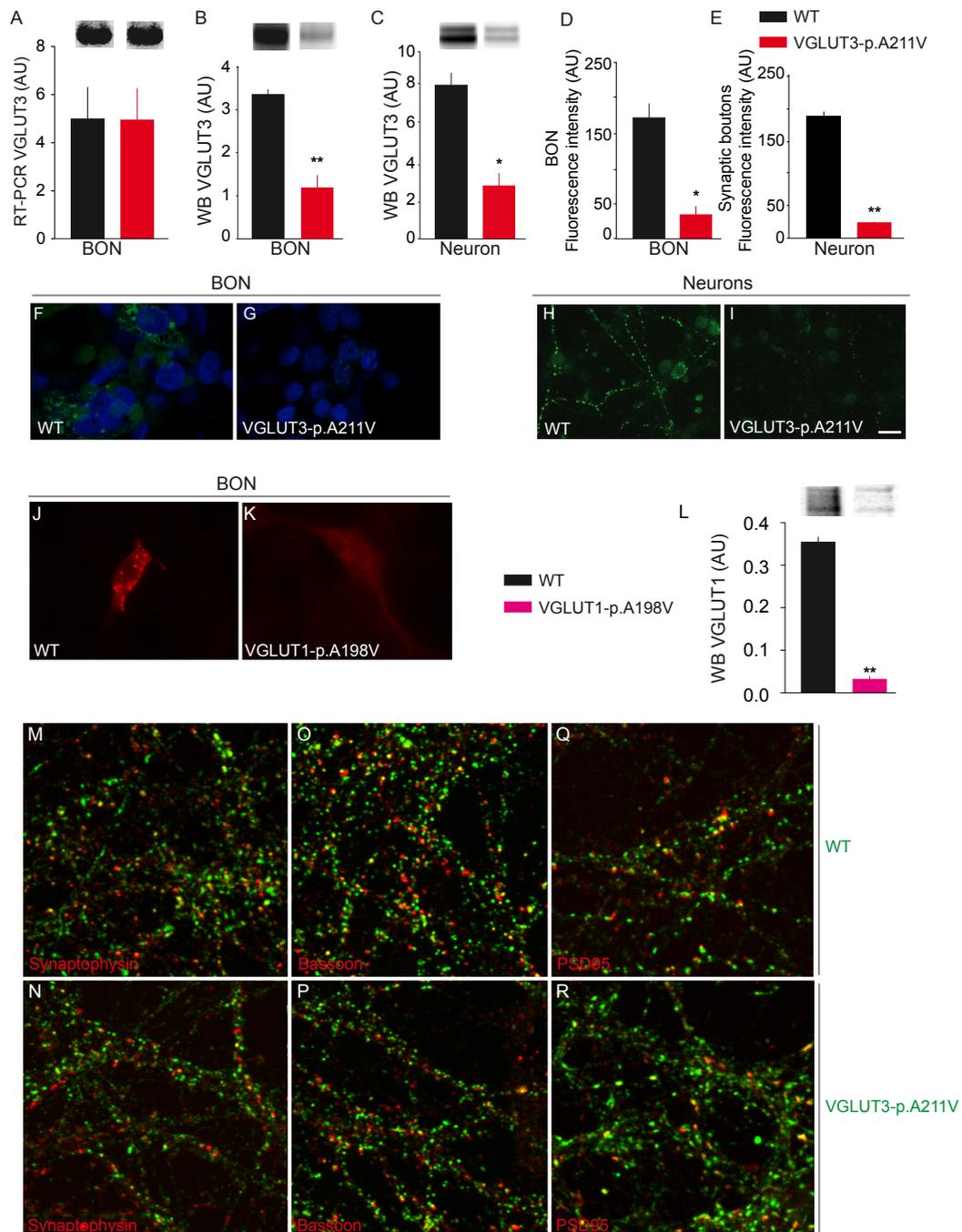


Figure 2 Ramet et al.

Figure 2. Expression of VGLUT3-p.A211V in cell cultures. (A) Transcripts levels of wild-type (WT) and VGLUT3-p.A211V measured by RT-PCR in BON cells are not significantly different. (B-C) Western blot quantification of VGLUT3 and VGLUT3-p.A211V in stable BON cells extracts (B) and in primary cultures of hippocampal neurons (C). VGLUT3-p.A211V expression was reduced by 64% in BON cells (B) and by 66% in neurons (C). (D, E) Semi-

quantification of fluorescence intensity of WT and VGLUT3-p.A211V in stable BON cells (D) or in synaptic boutons in hippocampal neurons in culture (E). Error bar shows SEM. (F, G) Immunofluorescence microphotographs of VGLUT3 (green) in BON cells stably transfected with a VGLUT3 (F) or VGLUT3-p.A211V (G) plasmid. (H, I) Hippocampal neurons transiently transfected with a VGLUT3 (H) or VGLUT3-p.A211V (I) expression plasmid. Nuclei were labeled with DAPI (blue). (J-K) Immunofluorescence of the WT isoform of VGLUT1 (J, red) or VGLUT1-p.A198V (K, red) in BON cell cultures, transiently transfected with expression plasmid. (L) Western blot detection and semi-quantification of WT and VGLUT1-p.A198V in BON cell extracts. (M-R) Co-localisations of VGLUT3 WT (M, O, Q, green) or VGLUT3-p.A211V (N, P, R, green) with synaptophysin (M, N, red), bassoon (O, P, red) and PSD95 (Q, R, red) in primary hippocampal neuronal cultures infected with lentiviral vectors containing either VGLUT3-venus (M, O, Q) or VGLUT3-p.A211V-venus (N, P, R) inserts. Scale bar in I: 5 μm in F-G and M-R and 10 μm in H-K.

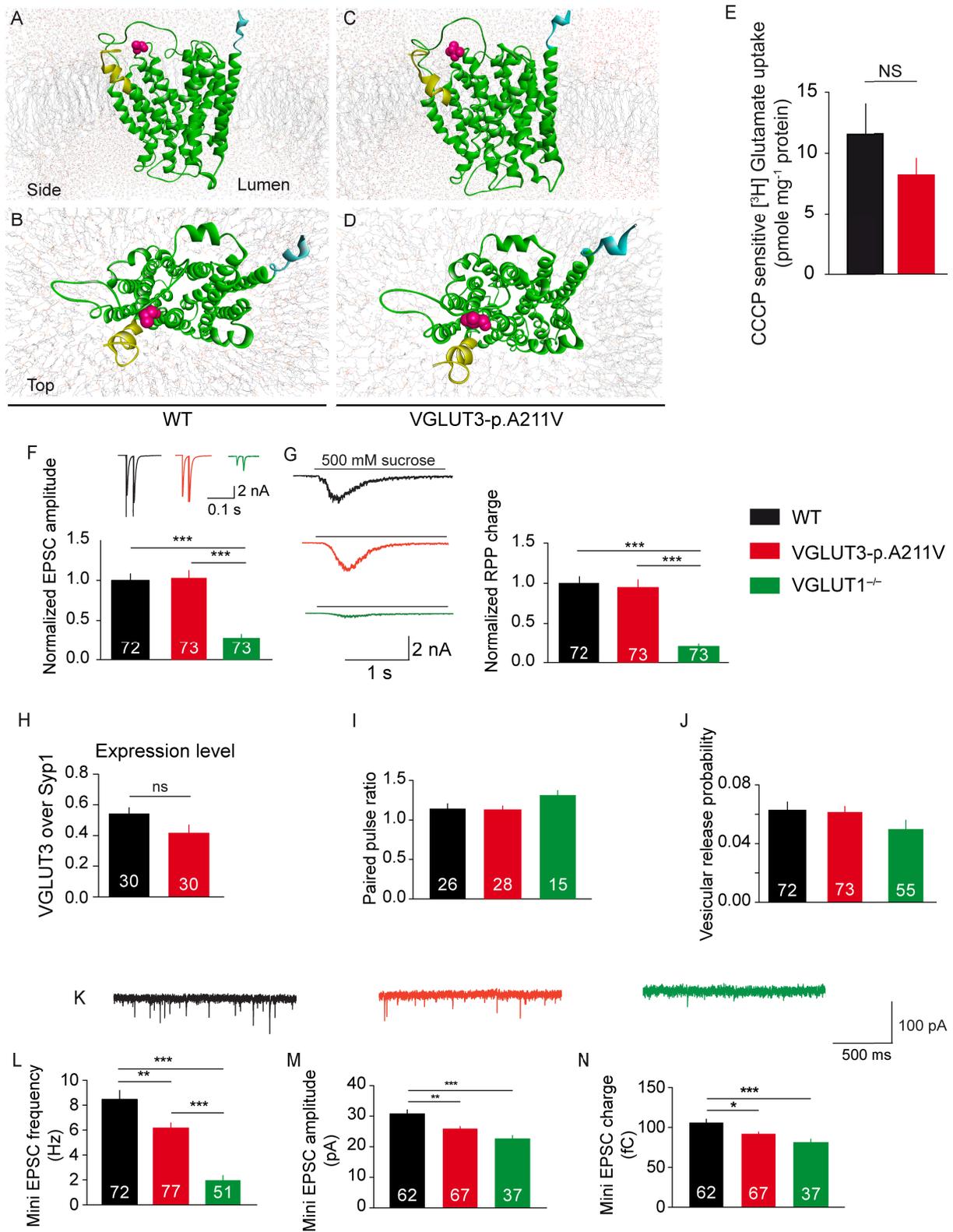


Figure 3 Ramet et al.



Figure 3. Effect of the p.A211V mutation on the 3D structure, glutamate vesicular accumulation and release. (A-D) Three-dimensional model of human VGLUT3 WT (A, B) and VGLUT3-p.A211V (C, D) using crystallographic MFS transporter structures as template.

Packing of the helices viewed from the side view (A, C) or the top (B, D). The N- and C-terminus are in yellow and blue respectively. The alanine residue (in position 211) of VGLUT3 (A, B) and the valine residue of VGLUT3-p.A211V (C, D) that are exposed to the pore are shown in pink. (E) Effect of the p.A211V mutation on H⁺ ionophore carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) sensitive [³H]L-glutamate uptake by synaptic vesicles from BON cells expressing VGLUT3 or VGLUT3-p.A211V. The small difference observed between the two populations of vesicles is not significant (NS). (F-N) Hippocampal autapses electrophysiological recording. (F) Top: Example traces of current responses after two unclamped action potentials with an interstimulus interval of 25 ms in VGLUT1^{-/-} autaptic neurons (green) infected with either VGLUT3 (WT, black) or VGLUT3-p.A211V (red). Artifacts and action potentials are blanked. Bottom: Plot of average EPSC amplitude size (first pulse) normalized to WT. Data pooled from 4 independent cultures. (G) Left: Example traces of current responses after application of sucrose (500 mM) for 5 s. Right: Plot of average readily-releasable pool charge normalized to WT. Data pooled from 4 independent cultures. Number of cells indicated in the bar graph. (H) Comparison of expression levels of WT and VGLUT3-p.A211V determined by measuring immunofluorescence intensities and normalizing to the intensities of synaptic marker synaptophysine (Syp1). Data pooled from 4 independent cultures. (I) Plot of average paired-pulse ratios with an interstimulus interval of 25 ms. Data pooled from 2 independent cultures. Number of cells indicated in the bar graph. (J) Plot of average vesicular release probability. Data pooled from 4 independent cultures. (K) Example of mEPSCs traces in autaptic neurons. Plots of average mEPSC frequency (L), mEPSC amplitude (M) and mEPSC charge (N). Data pooled from 4 independent cultures. Number of cells indicated in the bar graph.

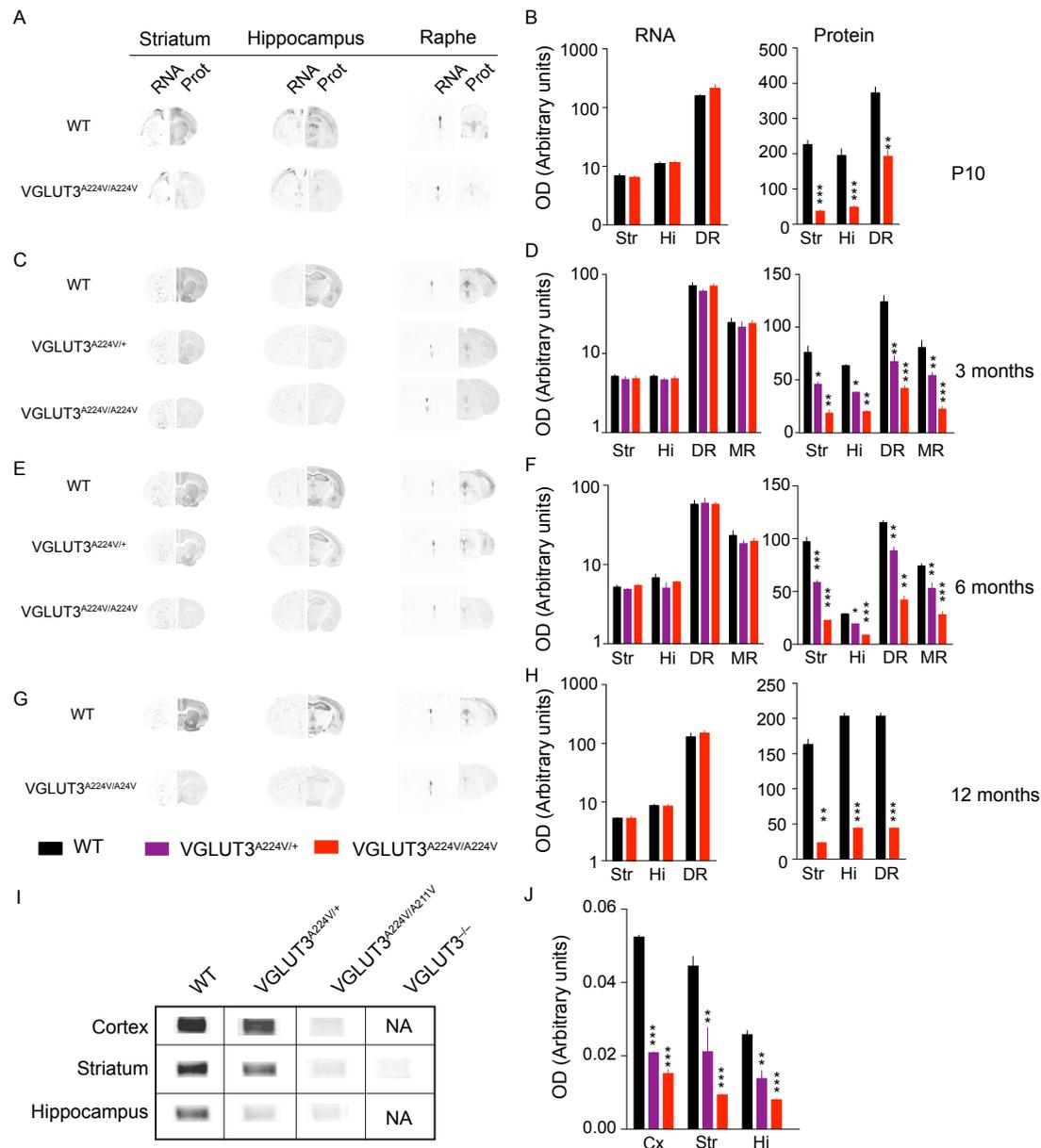


Figure 4 Ramet et al.

Figure 4. Regional expression of VGLUT3, VGLUT3^{A224V/+}, VGLUT3^{A224V/A224V} mRNA and protein in the central nervous system of mice at different ages. (A-H) Detection and semi-quantification of VGLUT3, VGLUT3^{A224V/+}, VGLUT3^{A224V/A224V} mRNA and protein expression by *in situ* hybridization and immunohistochemistry on coronal mouse brain sections taken at 10 days post-natal (P10, A and B), 3 months (C, D), 6 months (E, F) or 12 months (G, H) in the Striatum (Str), hippocampus (Hi), Dorsal and Median Raphe, (DR and MR respectively). WT, VGLUT3^{A224V/+}, VGLUT3^{A224V/A224V} mice expressed similar level of

transcripts (first column, B, D, F, H; Mann Whitney test for B and H; Kruskal-Wallis test for D, F; $p > 0.05$, $n = 8$). (B, D, F, H, second column) Loss of the protein in all areas from P10 until 1 year in VGLUT3^{A224V/A224V} mice ($n = 8$ for each genotype, Mann Whitney test or Kruskal-Wallis test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). In VGLUT3^{A224V/+}, there is a 34% loss of VGLUT3 in all areas at 3 and 6 months (D, F). (I, J) Western blot detection and semi-quantification of VGLUT3 in the cortex (Cx), striatum (Str) and hippocampus (Hi) of VGLUT3^{A224V/+} and VGLUT3^{A224V/A224V} mice.

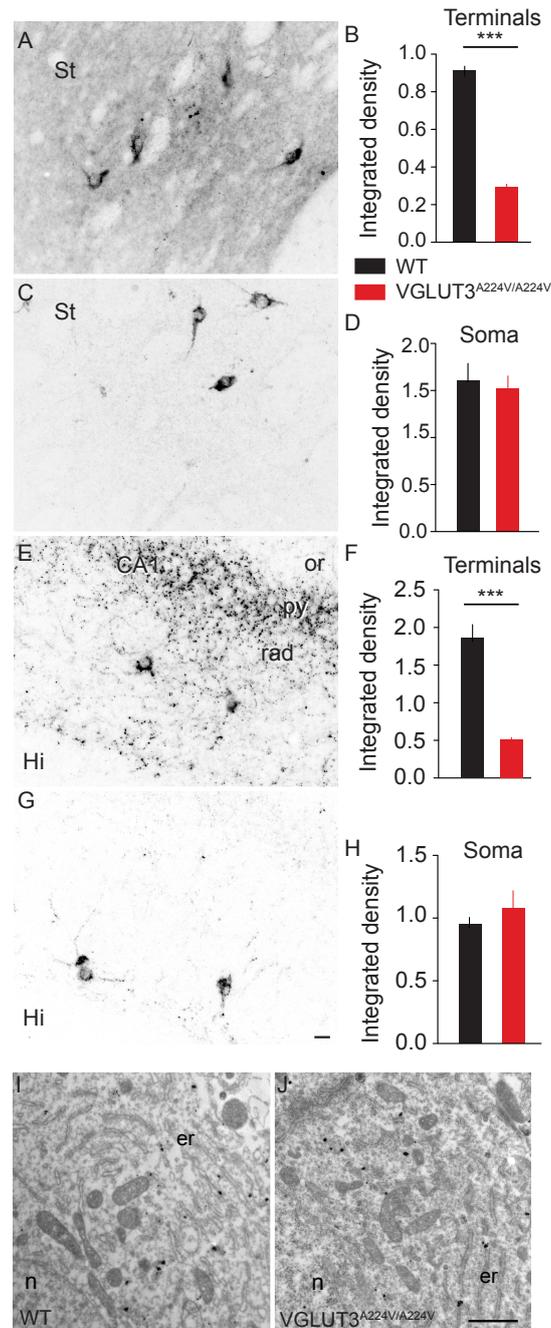


Figure 5 Ramet et al.

Figure 5. Expression of VGLUT3-p.A224V in soma and terminals of VGLUT3-positive neurons in the brain of WT and VGLUT3^{A224V/A224V} mice. (A-H) Immunofluorescence visualization and semi-quantification of VGLUT3 in the striatum (A, C) and in the CA1 pyramidal field of the hippocampus (E, G) in WT (A, E) and VGLUT3^{A224V/A224V} mice (C, G). VGLUT3 expression is massively reduced in terminals of the striatum (B, -69%) and

hippocampus (F, -72%) whereas its expression is unchanged in the soma of TANs and basket cells (D, H). (I-J) Electron microphotographs of the soma of TANs in striatal sections of WT (I) and VGLUT3^{A224V/A224V} (J) mice. VGLUT3 is labeled with gold particles.

Abbreviations: er, endoplasmic reticulum; n, nucleus; or, stratum oriens of the hippocampus; py, stratum pyramidale of the hippocampus; rad, Stratum radiatum.

Scale bar: 35 μm in A, C, E, G; 1 μm in I, J.

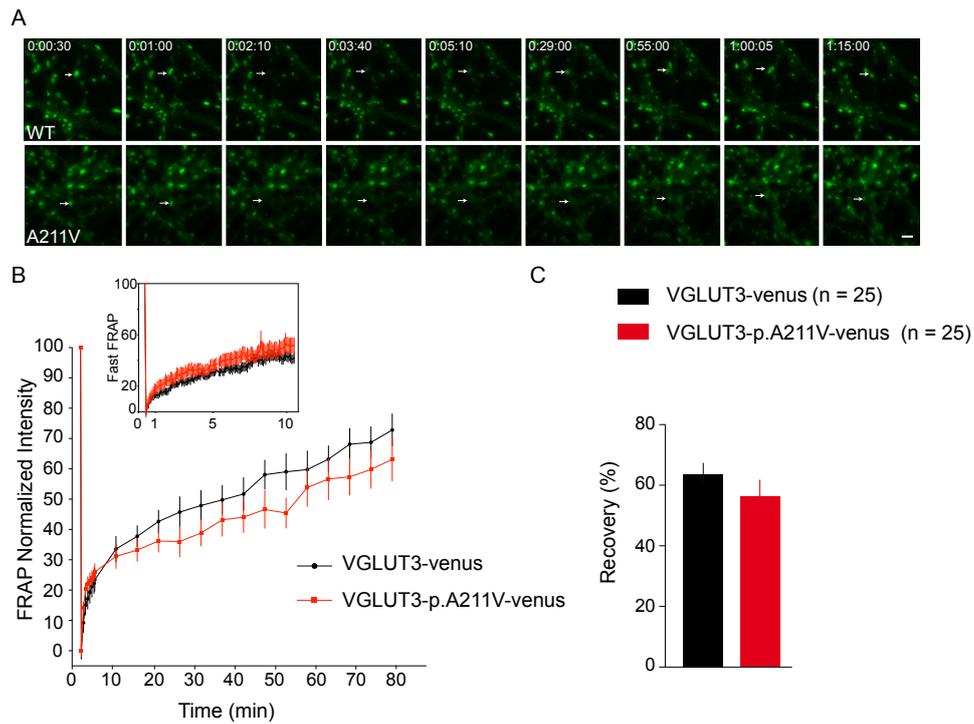


Figure 6 Ramet et al.

Figure 6. The p.A211V mutation did not alter VGLUT3 mobility. (A) Representative image sequence depicting: the initial fluorescence in the chosen boutons (white arrow), the loss of fluorescence after bleaching (time point 02:10 min), and the gradual recovery of fluorescent material in the bleached region in hippocampal cultures expressing either VGLUT3-venus or VGLUT3-p.A211V-venus. (B) Kinetics of FRAP during 75 minutes of neurons expressing VGLUT3-venus or VGLUT3-p.A211V-venus. Average recovery curves (error bars represent SEM) are shown in black for VGLUT3-venus and in red for VGLUT3-p.A211V-venus. Inset on the top shows FRAP curves during the first 10 min with images taken every 5 seconds. (C) Amplitude of recovery for VGLUT3-venus or VGLUT3-p.A211V-venus in bleached boutons 60 minutes after recovery from the bleaching. Data pooled from 5 independent cultures for FRAP and 2 independent cultures for Fast FRAP (n = 25 boutons per condition).

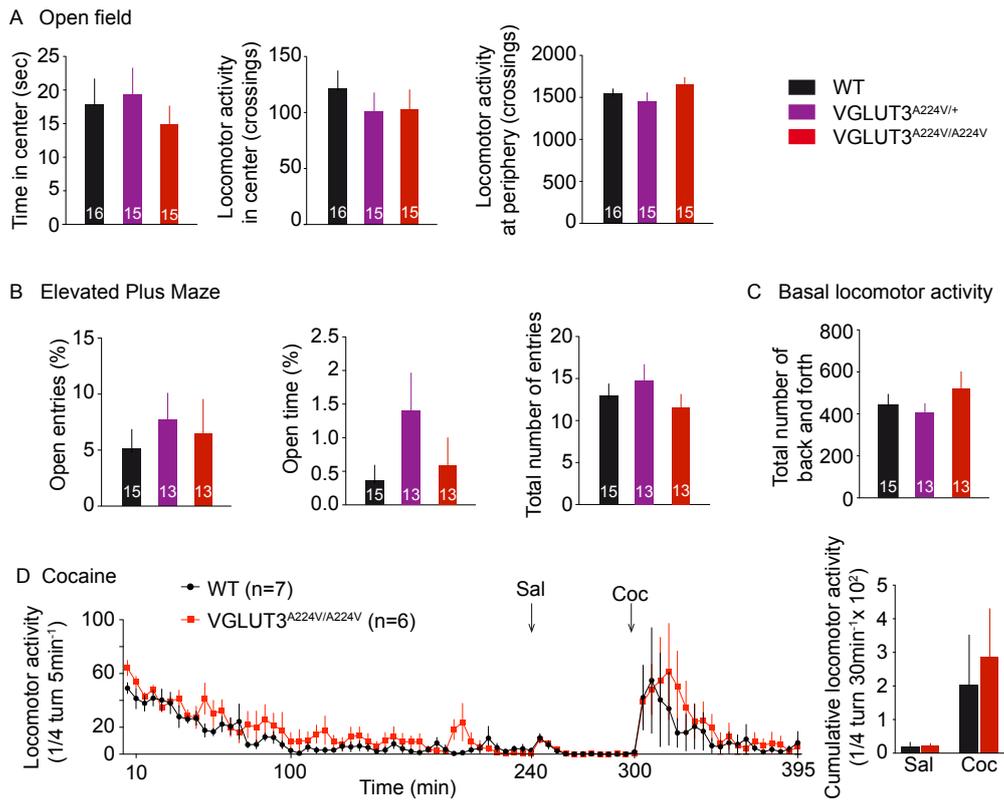


Figure 7 Ramet et al.

Figure 7. Behavioral analysis of VGLUT3^{A224V/A224V} mice. (A) In the open field, WT littermates, VGLUT3^{A224V/+} and VGLUT3^{A224V/A224V} mice spent the same time in center (Kruskal-Wallis test, $p > 0.05$) and presented the same locomotor activity at the center and the periphery of the open field (Kruskal-Wallis test, $p > 0.05$). Number of animals indicated in the bar graph. (B) Anxiety levels assessed in the elevated plus maze were similar in WT, VGLUT3^{A224V/+} and VGLUT3^{A224V/A224V} mice (Kruskal-Wallis test, $p > 0.05$). Horizontal exploration was measured during 6 min. No difference was found in total entries, and in the time spent in open arms between WT and the VGLUT3 mutant mice (Kruskal-Wallis test, $p > 0.05$). (C) Spontaneous locomotor activity of naive WT, VGLUT3^{A224V/+} and VGLUT3^{A224V/A224V} mice. Horizontal locomotor activity was recorded during five hours (first hour during light cycle followed by four hours during the dark cycle). Spontaneous locomotor activity was similar in WT and mutant animals (Kruskal-Wallis test, $p > 0.05$). (D) Left: Time course of the locomotor effect of cocaine (10 mg/kg, ip) in WT ($n = 7$) and VGLUT3^{A224V/A224V} ($n = 6$) mice. Animals were placed in the cyclotron for 240 min for habituation and then injected with saline

(NaCl 0.9%), placed back in the cyclotron for 60 min and then injected with cocaine (10 mg/kg). Following the cocaine injection, locomotion was recorded for 95 min. There was no significant difference in locomotor activity between WT and mutant mice treated by cocaine (repeated-measures ANOVA, $p > 0.05$). Right: Cumulative horizontal locomotor activity during 60 min of saline (Sal) or 95 min of cocaine-injected (Coc) WT ($n = 7$) and VGLUT3^{A224V/A224V} mice ($n = 6$). No difference was observed in cumulative locomotor activity following saline or cocaine injection between WT and VGLUT3^{A224V/A224V} mice (Mann Whitney test, $p > 0.05$).

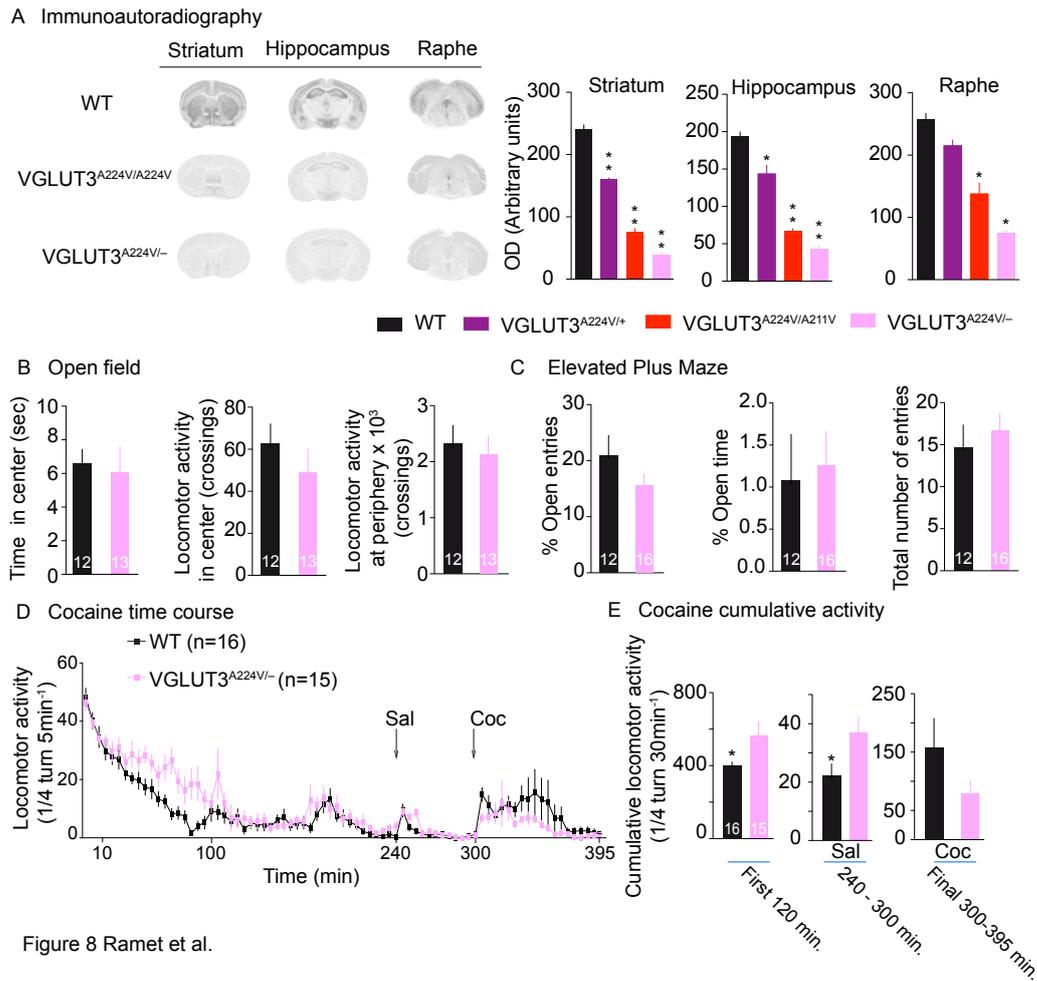


Figure 8 Ramet et al.

Figure 8. Anatomical and behavioral analysis mice expressing only one copy of VGLUT3-pA211V (VGLUT3^{A224V/-}). (A) VGLUT3 detection and semi-quantification by immunohistochemistry in the striatum, hippocampus and raphe of 3-month old WT, VGLUT3^{A224V/+}, VGLUT3^{A224V/A224V} and VGLUT3^{A224V/-} mice. VGLUT3 expression decreased by 70% in VGLUT3^{A224V/A224V} mice and by 81% in VGLUT3^{A224V/-} mice in the striatum (Kruskal-Wallis test; in the striatum, WT vs VGLUT3^{A224V/+}, $p = 0.0043$; WT vs VGLUT3^{A224V/A224V}, $p = 0.0043$; WT vs VGLUT3^{A224V/-}, $p = 0.0012$. In the hippocampus, WT vs VGLUT3^{A224V/+}, $p = 0.01$; WT vs VGLUT3^{A224V/A224V}, $p = 0.0043$; WT vs VGLUT3^{A224V/-}, $p = 0.0012$. In raphe nuclei, WT vs VGLUT3^{A224V/+}, $p = 0.0571$; WT vs VGLUT3^{A224V/A224V}, $p = 0.0159$; WT vs VGLUT3^{A224V/-}, $p = 0.0286$). (B) In the open field, WT and VGLUT3^{A224V/-} mice spent the same time in the center area and crossed the periphery or the central area the same number of time (Mann Whitney test, $p > 0.05$). (C) WT and VGLUT3^{A224V/-} mice

presented the same anxiety level when assessed in the elevated plus maze (Mann Whitney test, $p > 0.05$). Number of animals indicated in the bar graph. (D) Time course of the locomotor effect of cocaine (10 mg/kg, ip) in WT mice and VGLUT3^{A224V/-} mice. Animals were placed in the cyclotron for 240 min for habituation and then injected with saline (NaCl 0.9%), placed back in the cyclotron for 60 min and then injected with cocaine. Locomotion was recorded for 95 min following cocaine injection. No significant differences in locomotor activity were observed after cocaine injection between WT and mutant mice (repeated-measures ANOVA, $p > 0.05$). (E) Cumulative horizontal locomotor activity during the first 120 min in the cyclotron or 60 min of saline (Sal) and 95 min of cocaine-injected (Coc, 10 mg per Kg i.p) of WT (n = 16) and VGLUT3^{A224V/-} mice (n = 15). During the first two hours in the cyclotron, the locomotor activity of VGLUT3^{A224V/-} mice was higher than locomotor activity of WT mice (Mann Whitney test, $p = 0.0329$). After the saline injection, VGLUT3^{A224V/-} mice were slightly hyperactive compared to WT mice (Mann Whitney test, $p = 0.0270$). No difference was observed in cumulative locomotor activity following cocaine injection between WT and VGLUT3^{A224V/-} mice (Mann Whitney test, $p = 0.1725$).

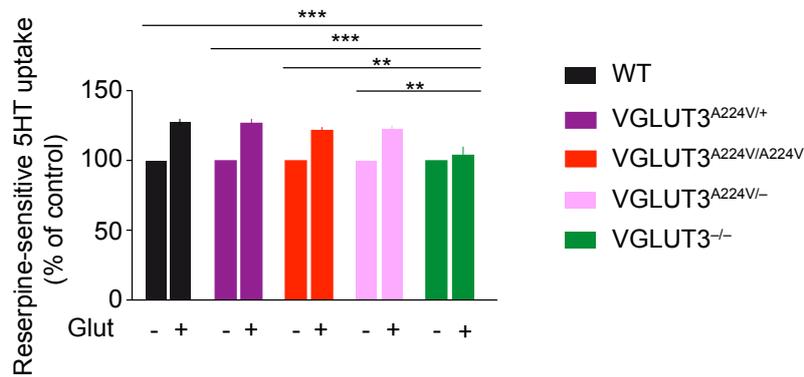


Figure 9 Ramet et al.

Figure 9. The p.A224V mutation did not influence VGLUT3-dependent vesicular synergy. [³H]5-HT reserpine-sensitive uptake in cortical synaptic vesicles was measured in the presence (+) or absence (-) of L-glutamate (Glut). [³H]5-HT reserpine-sensitive vesicular accumulation is augmented by L-glutamate (10 mM) in cortical synaptic vesicles of WT (+27%), VGLUT3^{A224V/+} (+27%), VGLUT3^{A224V/A224V} (+22%), VGLUT3^{A224V/-} mice (+22%) but not in VGLUT3^{-/-} mice due to the absence of VGLUT3 into synaptic vesicles.

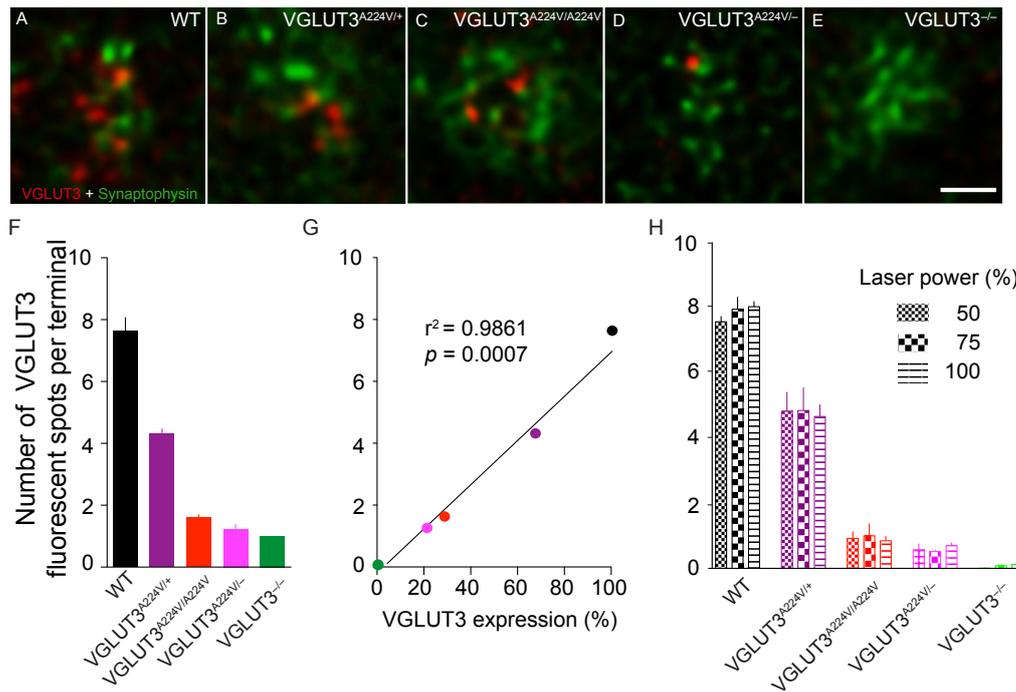


Figure 10. High-resolution fluorescent imaging by STED revealed a decrease of VGLUT3-positive vesicles in mutant mice. (A-E) Co-detection by STED microscopy of VGLUT3 and synaptophysin I in axonal varicosities of the striatum of WT (A), VGLUT3^{A224V/+} (B), VGLUT3^{A224V/A224V} (C), VGLUT3^{A224V/-} (D) and VGLUT3^{-/-} (E) mice. VGLUT3 and Synaptophysin I immunofluorescence events were observed as round shaped elements within striatal varicosities of WT, VGLUT3^{A224V/+}, VGLUT3^{A224V/A224V} and VGLUT3^{A224V/-} mice. In VGLUT3^{-/-} mice, only synaptophysin I was detected. Note the decreasing number of VGLUT3 immunopositive spots in VGLUT3^{A224V/+}, VGLUT3^{A224V/A224V} and VGLUT3^{A224V/-} mice compared to WT mice. (F) Quantification of VGLUT3 immunofluorescent events per varicosities. The number of VGLUT3 immunopositive spots were quantified in striatal axonal varicosities of WT, VGLUT3^{A224V/+}, VGLUT3^{A224V/A224V}, VGLUT3^{A224V/-} and VGLUT3^{-/-} mice after double immunofluorescence (80, 76, 76, 90, 105 varicosities per animals were quantified in 4 WT, 3 VGLUT3^{A224V/+}, 4 VGLUT3^{A224V/A224V}, 3 VGLUT3^{A224V/-} mice and 2 VGLUT3^{-/-}, respectively). Note that the number of spots decreased with the genotype. (G) Correlation between the number of VGLUT3 spots and VGLUT3 expression. The correlation was statistically significant (Linear regression, $r^2 = 0.9861$; $p = 0.0007$). (H) Effect of the laser

power on the number of VGLUT3-fluorescent event detected. The number of spots per varicosity did not differ significantly when the laser power increased (Kruskal-Wallis test, $p > 0.05$).

Scale bar in E: 500 nm in A-E.

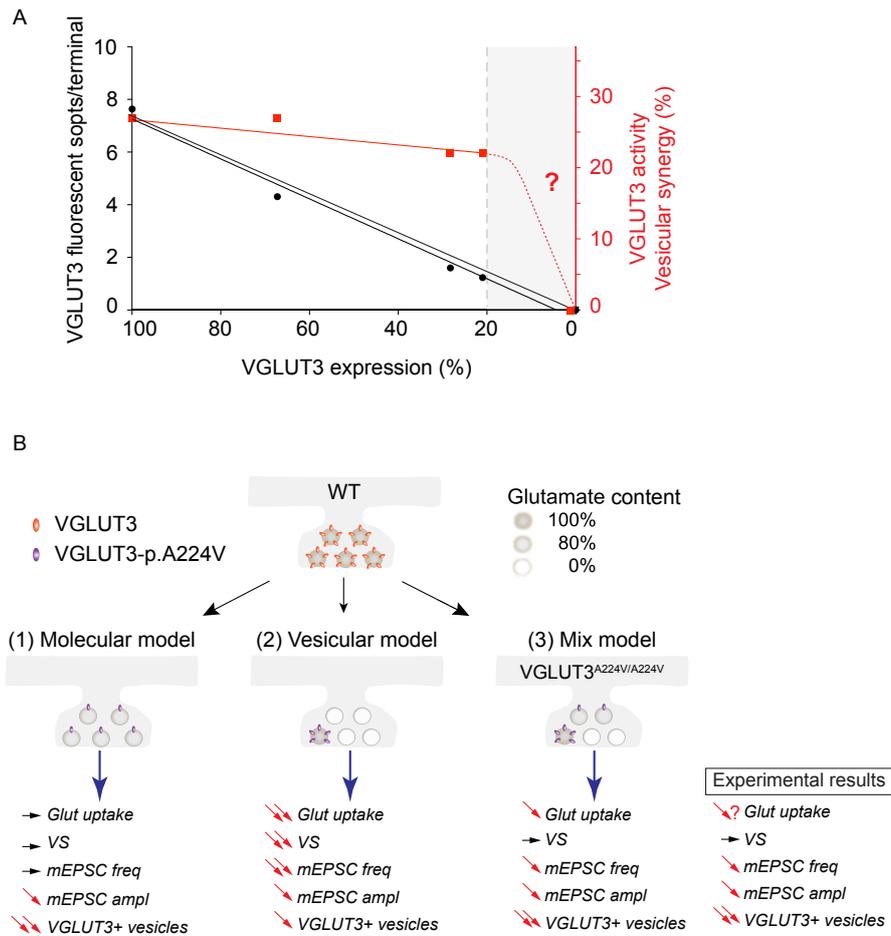


Figure 11. Putative models depicting the reduction of VGLUT3 at synapses of different mouse genotypes.

In this report, we investigated mouse models with variable levels of VGLUT3 expression: WT (two copies of WT VGLUT3 isoform; 100%), heterozygous from VGLUT3-p.A224V knockin (one copy of WT VGLUT3 isoform; 67%), homozygotes from VGLUT3-p.A224V knockin (two copies of the mutated VGLUT3-p.A224V allele; 28%), mouse obtained from crossing VGLUT3 knockout and VGLUT3 knockin (expressing only one copy of the mutated VGLUT3-p.A224V allele; 21%) and finally VGLUT3 knockout (no copy of VGLUT3; 0%).

(A) The black curve shows the linear relationship between VGLUT3 expression and the number of VGLUT3 fluorescent spot per terminal observed by STED in the collection of VGLUT3 mutants. In contrast, VGLUT3 activity (indirectly assessed by measuring vesicular synergy) is not declining proportionally to the amount of VGLUT3 in the expression range between 100% and 21% (red curve). The absence of correlation between these two sets of

measurements explains the virtual lack of VGLUT3-dependent phenotype in our panel of mutants. This model predicts that these phenotypes will be observed in the grey zone of the curve.

(B) We propose three putative models to account for the reduction of VGLUT3 at synapses and our experimental results.

In WT, numerous copies of VGLUT3 are uniformly distributed between synaptic vesicles and these vesicles are “normally” loaded (100% level) with glutamate.

In model 1 (molecular model): VGLUT3 copies are uniformly decreased in all vesicles of VGLUT3^{A224V/A224V} mice (for example). In this model, the vesicular content in glutamate is minimally decreased in all vesicles. This decrease of glutamatergic quantal size cannot be observed with bulk methods such as vesicular uptake or behavioral measurements but can be detected by more sensitive electrophysiological techniques. Model 1 would be compatible with i) an absence of change in vesicular uptake (observed in BON cells) and vesicular synergy (observed in cortical vesicles) and ii) a decreased amplitude of the mEPSC observed in recordings of isolated neurons.

Model 2 (vesicular model) is unraveled to STED high-resolution inspection of VGLUT3-positive terminal in our panel of mutants. In this model, in a small proportion of vesicles, the number of VGLUT3-p.A224V copies per vesicles is similar (or minimally decreased) to what is found in WT. According to electrophysiological recording of autapses, these vesicles could contain normal levels of glutamate and be preferentially docked. Remaining vesicles (80%) will contain neither VGLUT3 nor glutamate. This model is well in line with the decreased frequency of mEPSC.

A mix model (model 3) of these two models could better explain all the obtained experimental results. In this model, we found vesicles without VGLUT3, a small proportion of vesicles expressing the correct number of VGLUT3-p.A224V copies and a third population of vesicles where VGLUT3 copies are uniformly decreased in all vesicles of synapses from VGLUT3^{A224V/A224V} mice.

Table I. Percentage of decrease of VGLUT3 expression determined by immunohistochemistry in the striatum, hippocampus or raphe nuclei of heterozygous or homozygous VGLUT3-p.A224V expressing mice at 10 days postnatal (P10), 3, 6 or 12 month old (mo).

Brain area	Age Genotype	P10	3 mo	6 mo	12 mo
		<i>Heterozygous</i>	N.A.	34	50
Striatum	<i>Homozygous</i>	83	76	77	85
	<i>Heterozygous</i>	N.A.	26	38	N.A.
Hippocampus	<i>Homozygous</i>	76	69	70	78
	<i>Heterozygous</i>	N.A.	51	24	N.A.
Dorsal Raphe	<i>Homozygous</i>	50	68	61	77
	<i>Heterozygous</i>	N.A.	20	29	N.A.
Median Raphe	<i>Homozygous</i>	N.A.	74	63	N.A.

Table II. Percentage of decrease of VGLUT3 expression determined by western blot in the cortex, striatum or hippocampus of heterozygous and homozygous VGLUT3-p.A224V expressing mice at 3 month old (mo).

Brain area	Age Genotype	3 mo
		<i>Heterozygous</i>
Cortex	<i>Homozygous</i>	72
	<i>Heterozygous</i>	55
Striatum	<i>Homozygous</i>	85
	<i>Heterozygous</i>	47
Hippocampus	<i>Homozygous</i>	70

II. Résultats complémentaires

Etude des partenaires protéiques potentiels du transporteur vésiculaire du glutamate 3 (VGLUT3)

II.1. Contexte

La mutation humaine p.A211V induit une diminution drastique de l'expression de VGLUT3 dans toutes les régions du cerveau où ce dernier est exprimé. Nous observons cette baisse d'expression au niveau des terminaisons nerveuses des neurones mais pas au niveau des corps cellulaires. En effet, dans le soma, l'expression de la protéine est comparable à celle du VGLUT3 sauvage et aucune accumulation de VGLUT3 muté n'a été observée dans le golgi ou le réticulum endoplasmique. On peut donc supposer qu'il y a un problème d'adressage aux terminaisons nerveuses de la protéine mutée et/ou un recyclage prématuré vers les systèmes de dégradation. La question que nous nous sommes donc posés a été de savoir si ce problème d'adressage était dû à une perte d'interaction avec le système de transport et/ou un adressage prématuré au niveau des systèmes de dégradation. À l'heure actuelle, les protéines cargos interagissant avec VGLUT3 pour le transport vers les terminaisons neuronales ne sont pas encore connues.

Pour répondre à cette question, nous avons donc recherché les protéines pouvant potentiellement interagir avec la région de VGLUT3 où se trouve la mutation (motif KWAPPLER, domaine cytoplasmique allant du 217^e acide aminé au 234^e de la séquence protéique). Nous nous sommes donc intéressés, tout particulièrement, aux protéines impliquées dans le transport vers les terminaisons neuronales. Pour ce faire, nous avons réalisé un crible double hybride en collaboration avec Hybrigenics afin de trouver des potentielles interactions. L'avantage de cette technique est de pouvoir étudier, relativement facilement, l'interaction directe entre protéines à partir d'une banque d'ADN complémentaires (ADNc) qui peuvent être, ensuite, facilement extraits et séquencés.

L'appât utilisé lors de ce crible double hybride est la séquence d'acides aminés (résidus 190 à 240) de VGLUT3. Un certain nombre de clones positifs présentant un indice de confiance plus ou moins élevé ont ainsi été identifiés. La technique de double hybride est également connue pour donner une grande proportion de clones faux positifs dont l'interaction n'est pas retrouvée avec d'autres techniques ou qui n'a pas lieu

physiologiquement. Il a donc fallu, dans un premier temps, confirmer ou infirmer ces interactions. Puis dans un second temps, nous avons analysé l'interaction de ces clones positifs avec la forme mutante VGLUT3-p.A224V pour déterminer un éventuel défaut d'interaction (augmentation ou perte d'interaction).

II.2. Matériels et méthodes

Crible double hybride

Le crible double hybride a été réalisé par Hybrigenics (Services, S.A.S, Paris). L'appât choisi correspond à la séquence d'acides aminés de VGLUT3 de souris comprise entre le 190^e et le 240^e acides aminés. La séquence codante correspondante sur le gène *Slc17a8* de souris (GenBank accession number gi: 27503732) a été amplifiée par PCR et clonée dans le vecteur pB27 et fusionnée à LexA en C-terminal (N-LexA-**Slc17a8**-C) et dans le vecteur pB66 en fusion avec le domaine de liaison à l'ADN Gal4 (N-Gal4-**Slc17a8**-C). Les constructions ont été vérifiées par séquençage et utilisées comme appât pour cribler une banque d'ADNc de cerveau de souris adulte construit dans un vecteur navette pP6. Il s'agit d'une banque de type «*random-primed*» réalisée à partir d'amorces dégénérées aléatoires. Les vecteurs pB27, pB66 et pP6 proviennent à l'origine des plasmides pBTM116 (Vojtek & Hollenberg, 1995), pAS2ΔΔ (Fromont-Racine *et al.*, 1997) et pGADGH (Bartel *et al.*, 1993) respectivement.

Avec l'appât en LexA, 74.3 millions de clones ont été examinés en utilisant une approche de transformation dans des souches de levures YHGX13 (Y187 *ade2-101::loxP*-kanMX-*loxP*, *mat α*) et L40ΔGal4 comme précédemment décrit (Fromont-Racine *et al.*, 1997). Un total de 8 colonies His⁺ ont été sélectionnées dans un milieu dépourvu en tryptophane, leucine et histidine. Avec la construction en Gal4, 59.7 millions de clones ont été examinés en utilisant la même approche de transformation, dans des souches de levure HGX13 (Y187 *ade2-101::loxP*-kanMX-*loxP*, *mat α*) et CG1945. Un total de 151 colonies His⁺ ont été sélectionnées dans un milieu dépourvu de tryptophane, leucine et histidine avec un supplément de 0.5 mM 3-aminotriazole afin d'éviter l'autoactivation de l'appât. L'ADN des clones positifs a été isolé des colonies de levure, amplifié par PCR, transformé en bactéries et séquencé. Les séquences résultantes sont alignées pour construire des clones chevauchants ou identiques (ou contigs) et soumises à une recherche sur la banque de données de NCBI (GenBank database). Un score de confiance (PBS pour *Predicted Biological., Score*) a été attribué à chaque interaction comme décrit précédemment (Formstecher *et al.*, 2005). Les scores ont été divisés en 6 catégories, de A (confiance

élevée) à F ; D étant le score à confiance la plus basse, correspondant probablement à des faux positifs ou à des interactions difficilement détectables avec cette technique de double hybride ; E étant des interactions non spécifiques et F correspondant à des artefacts expérimentaux. Il existe une bonne corrélation entre le score biologique prédit (PBS) et la signification biologique des interactions observées (Rain *et al.*, 2001; Wojcik *et al.*, 2002).

Construction par mutagenèse de l'appât VGLUT3-p.A224V

Le crible double hybride a été initialement réalisé avec la forme sauvage de VGLUT3. Nous avons donc réalisé une construction de VGLUT3 avec la mutation humaine p.A211V. Cet appât a été obtenu par mutagenèse dirigée avec le Kit QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis (Stratagene, Agilent Technologies). Nous avons utilisé l'ADN du vecteur appât pB66 (fourni par Hybrigenics et contenant le segment d'ADN choisi du VGLUT3 sauvage de souris) et deux amorces (sens, 5'-GTGGAGTAAGTGGGTGCCTCCC-CTGGAG-3' et anti-sens 5'-CTCCAGGGGAGGCACCCACTTACTCCAC-3') pour introduire la mutation correspondant à un changement du triplet de nucléotides GCG en GTG, ce dernier codant une valine.

L'ADN obtenu a été transformé dans des bactéries compétentes par électroporation puis étalé sur un milieu LB-Kanamycine-Agar. La sélection s'effectue en kanamycine puisque le plasmide pB66 possède la résistance à cet antibiotique. Des colonies ont été repiquées et ensemencées en milieu liquide LB avec ajout de kanamycine. Des mini-préparations ont été réalisées pour extraire l'ADN sous forme de plasmide. Cette ADN est ensuite purifié afin d'être séquencé pour vérifier la présence de la mutation.

Validation des interactions appâts-proies en levure

Transformation des levures

Les levures utilisées sont de souches haploïdes CG1945 et YHGX13 (système GAL4) cultivées en milieu YPDA (2% glucose, 1% extrait de levure, 2% polypeptone et 20 mg/ml adénine hémissulfate). Les levures sont rendues compétentes par traitement à l'acétate de lithium (LiAc), puis transformées avec l'ADN plasmidique par incubation avec du polyéthylène glycol et choc thermique. Après transformation, les levures sont étalées sur milieu sélectif puis cultivées à 30°C pendant 2-3 jours. Les levures de souche CG1945 sont transformées avec l'ADN appât (soit construction VGLUT3 sauvage soit construction VGLUT3 muté soit le vecteur appât pB66 vide constituant le contrôle négatif) et les levures de souche YHGX13 avec les différentes proies sélectionnées.

Conjugaison et test d'activité

Les levures de chaque souche sont conjuguées durant la nuit à 30,5°C en milieu liquide YPDA sous agitation, puis étalées sur milieu sélectif le lendemain et cultivées pendant 1 à 3 jours. Les levures sont ensuite testées pour leur activité β -galactosidase (β -gal) : après lyse à l'azote liquide, les levures sont incubées dans un tampon Z (β -mercaptoéthanol 0,3% ; X-gal, 1%) pendant 4h à 30°C, la réaction étant arrêtée par addition de carbonate de sodium 1M. Les colonies exprimant la β -gal donnent une coloration plus ou moins bleue correspondant ainsi à une potentielle interaction entre notre appât et une protéine proie.

Des tests d'interaction ont également été réalisés avec des levures diploïdes TOTO transformés directement avec un mélange appât / proie.

II.3. Résultats

II.3.a. Résultats obtenus par Hybrigenics

L'appât utilisé pour l'expérience de double hybride en levure réalisée par Hybrigenics, contenait la séquence protéique du VGLUT3 sauvage allant du résidu Ala190 au résidu Ser240. Le crible a fourni 8 clones positifs en LexA parmi 74 millions d'interactions testées et 151 clones positifs en Gal4 parmi 59 millions d'interactions testées. Au total, 7 des interactions trouvées ont un bon score de confiance (PBS A ou C), 37 ont un score de moyenne confiance (PBS D) et le reste correspond à des protéines hautement connectées (PBS E) ou faux positifs techniques (PBS F). Nous ne tiendrons compte par la suite que des clones notés A, C, D (**Tableau 5**). Ces clones ont été séquencés à partir de leurs extrémités 5' et 3', puis alignés en vue de construire des contigs (alignements de clones chevauchants ou identiques), dont la séquence consensus résultante a été confrontée à une banque de données.

À la suite de ces résultats, nous avons décidé de retenir 8 clones :

- les clone B-139 et B-175 correspondant à la protéine culline 3 (gène *Cul3*)
- les clone A-2 et A-5 pour la protéine RBBP9 (*Retinoblastoma binding protein 9*)
- le clone B-90 pour l'actine gamma (gène *Actg1*)
- le clone B-1 pour l'alpha-adducine (gène *Add1*)
- le clone B-146 pour la protéine bicaudale D homologue 2 (gène *Bicd2*)
- le clone B-48 pour la dynéine (gène *Dnahc11*).

Ces séquences candidates ont été choisies de plusieurs manières. On a, tout d'abord, décidé de travailler avec les interactants qui avaient un score de confiance élevé ainsi que ceux qui présentaient plusieurs clones (Culline 3, RBBP9). Puis, dans le groupe D, nous avons choisi des protéines du cytosquelette ou impliquées dans le système de transport (ACTG1, ADD1, BICD2 et DNAHC11), clones en rapport avec notre question de départ.

Tableau 5. Clones positifs obtenus après le crible double hybride.

Les clones positifs représentés dans le tableau ont un score compris entre A et D. Le nom du clone donné par Hybrigenics, le nom du gène et son numéro correspondant dans la base de donnée de NCBI (GenBank) et le score prédit sont indiqués pour chaque clone.

Nom du clone	Nom du gène	GenBank (NCBI)	Score
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-90	Mus musculus - Actg1	GID: 48762677	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-1	Mus musculus - Add1	GID: 156255170	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-30	Mus musculus - B4galt6	GID: 288557341	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-146	Mus musculus - Bicd2	GID: 85702358	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-65	Mus musculus - Bicd2	GID: 85702358	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-139	Mus musculus - Cul3	GID: 146134444	A
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-136	Mus musculus - Cul3	GID: 146134444	A
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-175	Mus musculus - Cul3	GID: 146134444	A
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-132	Mus musculus - Cul3	GID: 146134444	A
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-34	Mus musculus - Cul3	GID: 146134444	A
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-45	Mus musculus - Cul3	GID: 146134444	A
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-168	Mus musculus - Cul3	GID: 146134444	A
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-48	Mus musculus - Dnahc11	GID: 393794753	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB27_A-6	Mus musculus - Eprs	GID: 82617574	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-73	Mus musculus - Kcnv1	GID: 257196180	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-38	Mus musculus - Pld5	GID: 307775444	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-37	Mus musculus - Pum1	GID: 227430387	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB27_A-5	Mus musculus - Rbbp9	GID: 86439976	C
AMB_RP1_hgx1498v3_pB27_A-2	Mus musculus - Rbbp9	GID: 86439976	C
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-49	Mus musculus - Rnf123	GID: 313760608	D

AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-151	Mus musculus - St13	GID: 118130905	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-11	Mus musculus - St13	GID: 118130905	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-50	Mus musculus - St13	GID: 118130905	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-143	Mus musculus - St13	GID: 118130905	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-99	Mus musculus - Tmod2	GID: 84697032	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-134	Mus musculus - Tmod2	GID: 84697032	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-97	Mus musculus - Tpst2	GID: 170172565	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-131	Mus musculus - Usp34	GID: 357527385	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-77	Mus musculus -GenMatch	GI:25189031	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-141	Mus musculus - GenMatch	GI:68300482	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-117	Mus musculus - GenMatch	GI:68300482	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-100	Mus musculus - GenMatch	GI:68300482	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-75	Mus musculus - GenMatch	GI:68300482	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-68	Mus musculus - GenMatch	GI:78190309	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-60	Mus musculus - GenMatch	GI:32964989	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-102	Mus musculus - GenMatch	GI:74136729	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-59	synthetic construct	GI:354786274	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-57	synthetic construct	GI:354798093	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-35	Mus musculus - GenMatch	GI:47825149	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-74	Mus musculus - GenMatch	GI:25045296	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-53	Mus musculus - GenMatch	GI:82830668	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-26	Mus musculus - GenMatch	GI:34536760	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-163	Mus musculus - GenMatch	GI:34536760	D

AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-120	Mus musculus - GenMatch	GI:34536760	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-159	Mus musculus - GenMatch	GI:34536760	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-133	Mus musculus - GenMatch	GI:34013588	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-150	Mus musculus - GenMatch	GI:34013588	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-25	Mus musculus - GenMatch	GI:34013588	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-160	Mus musculus - GenMatch	GI:78190226	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-93	Mus musculus - GenMatch	GI:78190226	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-17	Mus musculus - GenMatch	GI:78190226	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-15	Mus musculus - GenMatch	GI:32879627	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-167	Mus musculus - GenMatch	GI:21727354	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-153	Mus musculus - GenMatch	GI:33147446	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-128	Mus musculus - GenMatch	GI:21213552	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-125	Mus musculus - GenMatch	GI:71533444	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-124	Mus musculus - GenMatch	GI:25168699	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-111	Mus musculus - GenMatch	GI:58372264	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-156	Mus musculus - GenMatch	GI:58372264	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-78	Mus musculus - GenMatch	GI:149696457	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB27_A-1	unnamed protein	GID: 74144974	D
AMB_RP1_hgx1498v3_pB27_A-3	unnamed protein	GID: 74144974	D

II.3.b. Clones sélectionnés

- La culline 3

Un des plus importants systèmes de dégradation des protéines est le complexe protéasome-ubiquitine (UPS) (Hochstrasser, 1992; Jung *et al.*, 2009). Ce système est présent dans le noyau et le cytoplasme des cellules (Peters *et al.*, 1994). La dégradation des protéines via ce système est médiée par un processus appelé l'ubiquitination qui fait intervenir plusieurs enzymes dont l'ubiquitine ligase 3 (Bedford *et al.*, 2011). L'ubiquitine ligase E3 se divise en deux principales classes en fonction de domaines caractéristiques de leur fonction :

- les ligases E3 de la famille HECT qui lient l'ubiquitine
- les ligases E3 avec un domaine « RING finger » qui ne possèdent pas d'activité catalytique mais qui agissent comme des adaptateurs moléculaires en liant à la fois l'enzyme E2 par le domaine RING et le substrat (Pintard *et al.*, 2004; Petroski & Deshaies, 2005; Sarikas *et al.*, 2011).

En effet, l'ubiquitine ligase E3 joue un rôle dans la reconnaissance entre l'ubiquitine et les différentes protéines cibles. Les cullines constituent une famille de protéines hydrophobes fournissant un échafaudage pour les ubiquitines ligases (E3). Elles s'associent avec des protéines « RING » pour former les « *Cullin-RING ubiquitin Ligases* » (CRL). Les CRL sont des complexes multimériques comprenant différents composants et protéines adaptatrices. Les cullines jouent un rôle important dans les modifications post-traductionnelles des protéines, incluant l'ubiquitination. La culline 3 est une protéine qui fait partie de la famille des CRL (*cullin-RING ubiquitin ligases*). Le complexe culline 3 est original par rapport aux autres complexes puisqu'il ne nécessite pas différents adaptateurs pour reconnaître les protéines cibles mais seulement une protéine avec un domaine BTB (bri-a-brac/tramtrack/broad-complex). La culline 3 semble avoir un rôle très important dans la cellule et sa mauvaise régulation semble être impliquée dans diverses pathologies (Anderica-Romero *et al.*, 2013).

- RBBP9

La protéine *retinoblastoma binding protein* codée par le gène *RBBP9* pourrait jouer un rôle dans la régulation de la prolifération et la différenciation cellulaire (Woitach *et al.*, 1998). Elle serait associée à un certain nombre de cancer (Shields *et al.*, 2010).

- L'actine gamma

L'actine est une protéine importante pour l'architecture et les mouvements cellulaires. Elle a été hautement conservée lors de l'évolution des eucaryotes. Elle forme les filaments d'actine qui sont les composants majeurs structuraux du cytosquelette et qui régulent la mobilité cellulaire, la contraction et la croissance des cellules. Chez les vertébrés, trois principales isoformes ont été identifiées : actine alpha, beta et gamma. On trouve l'actine alpha dans les muscles striés et lisses, l'actine gamma dans le muscle lisse entérique et les tissus non musculaires et l'actine beta dans des tissus non musculaires. L'actine gamma est un isotype de l'actine retrouvé dans le cytoplasme des cellules non musculaires. Elle est codée par le gène *Actg1* et constitue l'isoforme d'actine la plus abondante dans les cellules ciliées du système auditif et plus particulièrement dans la plaque cuticulaire, jonctions adhérentes et les stéréocils (Khaitlina, 2001). Des mutations dans ce gène ont été associées à des pertes auditives non syndromiques comme la DFNA20/26 (Morin *et al.*, 2009; Kruth & Rubenstein, 2012; Nishio & Usami, 2015) et au syndrome de Baraister-Winter qui est un syndrome malformatif (Riviere *et al.*, 2012).

- L'alpha-adducine

L'alpha-adducine est une sous-unité protéique de l'adducine qui est codée par trois gènes (*alpha*, *beta*, *gamma*). L'adducine est un hétérodimère composé d'une sous-unité alpha (codé par le gène *Add1*) et d'une sous-unité beta ou gamma. L'adducine a une expression ubiquitaire. On la retrouve par exemple dans le cerveau, foie, poumon. L'adducine se lie au complexe spectrine-actine et favorise l'association de la spectrine avec l'actine. L'adducine est régulée par la calmoduline et est un substrat des protéines kinases A et C (Bennett *et al.*, 1988). L'alpha-adducine a d'abord été identifiée dans les protéines du cytosquelette des érythrocytes (Bianchi *et al.*, 1994). Elle jouerait un rôle dans la formation du complexe spectrine-actine, permettant l'accrochage du microfilament d'actine à la membrane (Tripodi *et al.*, 1996). Chez l'Homme, le gène *ADD1* codant l'alpha-adducine a été identifié comme étant associé à de l'hypertension (Casari *et al.*, 1995; Liao *et al.*, 2015). En effet, cette protéine est impliquée dans la réabsorption rénale du sodium.

- BICD2

La protéine bicaudale D homologue 2 (BICD2) appartient à la famille Bicaudal D (BICD). Ce sont des protéines adaptatrices de la dynéine mais il a été montré qu'elles se liaient également à la kinésine. BICD2 interagit avec les membres de la famille de la kinésine-1 (KIF5) (Matanis *et al.*, 2002; Grigoriev *et al.*, 2007). BICD2 interagit également

avec la dynéine-dynactine et pourrait réguler la motilité des vésicules situées sur la dynéine. Cela suggère que les protéines BICD jouent un rôle complexe de régulation dans les mouvements des cargos (Schlager *et al.*, 2014).

- La dynéine axonémale de la chaîne légère 11

Les dynéines sont des complexes protéiques comportant des chaînes lourdes, intermédiaires et légères. Ce sont des moteurs moléculaires associés à des microtubules. Les dynéines axonémales possèdent une activité ATPasique. La DNAHC11 serait impliquée dans le mouvement des cils respiratoires et des mutations dans ce gène seraient responsables de défauts observés dans la dyskinésie ciliaire primitive (Lucas *et al.*, 2012).

II.3.c. Résultats double hybride avec le mutant de VGLUT3

Nous avons, tout d'abord, vérifié à nouveau en double hybride levure les interactions avec les clones sélectionnés. Ensuite, nous avons testé ces potentielles protéines interagissantes avec la construction de VGLUT3-p.A224V. Nous avons transformé les constructions plasmidiques (plasmides pB66 pour les appâts et pP6 pour les proies) dans des levures haploïdes puis conjugué les levures pour obtenir des diploïdes. Les levures diploïdes obtenues ont alors été testées pour leur expression de l'enzyme β -galactosidase (β -gal), capable de métaboliser le substrat X-Gal en un composé de couleur bleue. En parallèle, elles ont été testées pour leur croissance en milieu dépourvu d'histidine, en présence ou non de 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT), qui inhibe de façon compétitive le produit du gène HIS3, de manière à sélectionner des interactions plus stringentes. Dans les deux cas, s'il y a interaction entre les deux protéines, les résultats de ces tests sont positifs.

Le **tableau 6** présente une synthèse des résultats obtenus au cours de ces différentes expériences.

Avec la construction sauvage, nous avons bien confirmé l'interaction avec les clones de la culline 3, le clone B-1 pour ADD1, le clone B-146 pour BICD2 ainsi que pour le clone B-48 de DNAHC11. Par contre, je n'ai pas retrouvé d'interaction avec les clones B-90 d'ACTG1 et avec les clones A-2 et A-5 de RBBP9. Ils sembleraient donc que ces clones soient des faux positifs.

Avec la construction mutante, j'obtiens les mêmes résultats d'interaction qu'avec la forme sauvage. Aucune interaction n'est observée avec les clones d'ACTG1 et RBBP9. Une coloration bleue est visible avec les clones de la culline 3, d'ADD1, de BICD2 et DNAHC11.

Nous n'avons pas observé de perte d'interactions avec ces différents clones. Cette mutation ne semble donc pas avoir d'effet sur ces interactions. Il faut bien sûr prendre en compte les limites de cette technique puisque la coloration observée n'est pas quantifiable et sa résolution est faible. En effet, nous ne pouvons observer que des pertes ou fortes augmentations d'interaction. S'il y a une légère baisse ou augmentation de l'interaction avec la forme mutante, elle ne sera pas visible avec ce système de détection.

Tableau 6. Résultats obtenus des interactions étudiées par double hybride en levure.

Le signe + symbolise une coloration bleue pour le test β -gal et une croissance des colonies sur milieu dépourvu d'histidine (-HIS) avec du 3-AT. Le signe - signifie une absence de coloration bleue ou de croissance.

Conjugaisons	Test β -gal	Milieu-HIS +3AT
pB66 vide – pP6_B-139	-	-
pB66 VGLUT3 sauvage – pP6_B-139	+	+
pB66 VGLUT3 muté – pP6_B-139	+	+
pB66 vide – pP6_B-175	-	-
pB66 VGLUT3 sauvage – pP6_B-175	+	+
pB66 VGLUT3 muté – pP6_B-175	+	+
pB66 vide – pP6_B-1	-	-
pB66 VGLUT3 sauvage – pP6_B-1	+	+
pB66 VGLUT3 muté – pP6_B-1	+	+
pB66 vide – pP6_B-146	-	-
pB66 VGLUT3 sauvage – pP6_B-146	+	+
pB66 VGLUT3 muté – pP6_B-146	+	+
pB66 vide – pP6_B-48	-	-
pB66 VGLUT3 sauvage – pP6_B-48	+	+
pB66 VGLUT3 muté – pP6_B-48	+	+
pB66 vide – pP6_B-90	-	-
pB66 VGLUT3 sauvage – pP6_B-90	-	-
pB66 VGLUT3 muté – pP6_B-90	-	-
pB66 vide – pP6_A-2	-	-
pB66 VGLUT3 sauvage – pP6_A-2	-	-
pB66 VGLUT3 muté – pP6_A-2	-	-
pB66 vide – pP6_A-5	-	-
pB66 VGLUT3 sauvage – pP6_A-5	-	-
pB66 VGLUT3 muté – pP6_A-5	-	-

La protéine mutée interagit donc avec les mêmes clones que la forme sauvage. Des expériences supplémentaires seront nécessaires pour déterminer si le problème est qualitatif plutôt que quantitatif.

Ce crible double hybride ne nous a pas permis de répondre en totalité à notre question de départ mais grâce à lui, nous avons trouvé des protéines du cytosquelette ou du système de dégradation des protéines qui interagissent avec VGLUT3 au niveau de cette séquence constituée seulement de 50 acides aminés (Ala190-Ser240).

Discussion

Mon projet de thèse a porté sur la caractérisation, dans le système nerveux central de souris, de la mutation ponctuelle humaine, p.A211V, de VGLUT3. Pour cela, nous avons utilisé des systèmes cellulaires et une lignée de souris exprimant cette mutation (appelée VGLUT3^{A224V/A224V}). La mutation est responsable du changement de l'alanine 211 en une valine au niveau du motif KWAPPLER de VGLUT3 humain. Ce motif est très conservé chez les transporteurs vésiculaires du glutamate de différentes espèces et au sein même de la famille SLC17 (Gras *et al.*, 2002; Ruel *et al.*, 2008). Les acides aminés alanine et valine appartiennent tous les deux aux acides aminés dits non polaires. Ils sont caractérisés par un radical hydrophobe. Contrairement à l'alanine, la valine possède deux groupements méthyles (CH₃) (Figure 38).

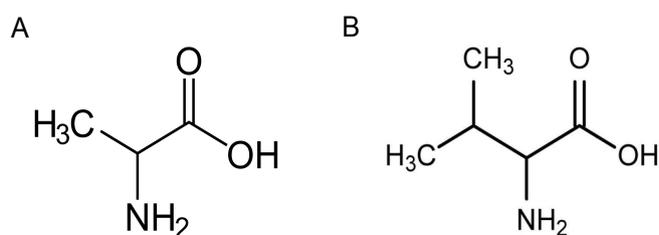


Figure 38. Représentation chimique des acides aminés alanine (A) et valine (B).

La caractérisation de cette mutation a débuté *in vitro*, dans les cellules BON et sur cultures primaires de neurones d'hippocampe. Puis, elle s'est poursuivie sur la lignée de souris VGLUT3^{A224V/A224V}. Nous avons, tout d'abord, analysé l'effet de cette mutation sur l'expression de la protéine. Nous avons montré qu'elle entraîne une perte d'expression de VGLUT3 dans les cellules BON (-64%) et dans les cultures primaires de neurones d'hippocampe (-66%). Cette baisse est également retrouvée chez les souris VGLUT3^{A224V/A224V} où nous avons observé une diminution d'expression de 70% dans le cerveau (toute région confondue). Elle est présente dès la naissance. Il faut donc remarquer que le simple fait d'insérer une valine à la place d'une alanine diminue drastiquement l'expression de la protéine.

Nous avons également regardé si cette différence d'expression était reproduite si on insérait la mutation dans un autre VGLUT, comme VGLUT1 (VGLUT1-p.A198V). Curieusement, l'expression de VGLUT1-p.A198V est diminuée de façon encore plus drastique (-90% de baisse). Donc, le seul changement de l'alanine dans le motif KWAPPLER

par une valine semble suffire à induire cette perte d'expression de VGLUT1 et VGLUT3. Il serait intéressant de vérifier l'importance de cette valine chez VGLUT2.

Chez les souris VGLUT3^{A224V/-}, n'exprimant plus qu'une seule copie mutée de la protéine, nous observons une perte de 80% de VGLUT3 (par rapport à une souris sauvage). Ce résultat est cohérent avec la baisse de 34% observée chez les souris hétérozygotes, VGLUT3^{A224V/+}, exprimant une copie sauvage et une copie mutée de VGLUT3.

Une RT-PCR a été effectuée sur les clones stables BON ainsi qu'une hybridation *in situ* sur coupes de cerveau des souris WT, VGLUT3^{A224V/+} et VGLUT3^{A224V/A224V}. Les résultats obtenus ne montrent aucun effet de la mutation sur la transcription de l'ARNm de VGLUT3. On peut donc en déduire que la baisse d'expression de la protéine observée chez les mutants n'est pas due à une perte de l'ARNm de VGLUT3.

A la suite de ces résultats, on peut donc émettre l'hypothèse que ce changement d'acide aminé pourrait affecter soit : la stabilité de la protéine, sa demie-vie, la maturation du motif KWAPPLER, un changement de conformation de la protéine, la dégradation prématurée et/ou le blocage de la protéine dans le corps cellulaire comme par exemple dans l'appareil de golgi.

VGLUT3 est le seul des trois VGLUTs à être présent à la fois au niveau des terminaisons synaptiques et du compartiment somato-dendritique. La mutation p.A224V a d'ailleurs un effet très particulier sur la distribution de VGLUT3. En effet, la diminution d'expression de la protéine mutée n'est observée qu'au niveau des terminaisons synaptiques. Les souris sauvages et VGLUT3^{A224V/A224V} présentent la même expression de VGLUT3 dans les corps cellulaires. On peut donc se demander s'il y a une accumulation de la protéine dans le soma. L'observation en microscopie électronique de coupes ultrafines du cerveau des souris VGLUT3^{A224V/A224V} n'a pas révélé d'accumulation de la protéine mutée dans le corps cellulaire. De plus, cette protéine semble être distribuée dans les mêmes organites que la protéine sauvage (réticulum endoplasmique, appareil de golgi). D'autre part, nous avons observé que VGLUT3 muté ne colocalisait pas avec MAP2 (données non montrées). Cela renforce l'idée que le transporteur muté ne s'accumule pas dans le cytoplasme des neurones. La synthèse et la maturation de VGLUT3-p.A224V semblent s'effectuer correctement. L'isoforme VGLUT3-p.A224V présente, en effet, une expression normale dans le corps cellulaire du neurone et une expression diminuée au niveau des terminaisons synaptiques.

Ces résultats permettent d'ailleurs d'expliquer le fait que la diminution d'expression de VGLUT3-p.A224V observée en immunoautoradiographie est, généralement, moins forte

dans les noyaux du raphé dorsal (-64%) que dans les autres régions cérébrales. La contribution des somas du raphé au marquage global VGLUT3-positif est, en effet, plus importante que dans des régions comme l'hippocampe ou le striatum où VGLUT3 est exprimé par des populations d'interneurones peu nombreux mais très ramifiés.

Nous avons ensuite cherché à savoir si, malgré le défaut d'expression synaptique de VGLUT3, les transporteurs mutés présents sont correctement adressés dans les boutons. Pour cela, des co-marquages ont été réalisés avec des protéines synaptiques sur des cultures primaires de neurones d'hippocampe infectées avec des lentivirus exprimant la forme sauvage ou mutée de VGLUT3. Les colocalisations de la forme sauvage ou de VGLUT3-p.A211V avec la synaptophysine ou bassoon suggèrent que le transporteur est bien présent dans les terminaisons synaptiques au niveau des zones actives. De plus, les puncta VGLUT3-positifs sont bien en apposition avec les éléments postsynaptiques. En effet, VGLUT3 fait fréquemment face à des épines dendritiques postsynaptiques PSD-95-positives.

Malgré une diminution de son expression, il semble donc que VGLUT3-p.A211V soit correctement adressé vers les terminaisons présynaptiques.

Des expériences de récupération de la fluorescence après photo-blanchiment (*Fluorescence Recovery After Photobleaching* ou FRAP) ont été réalisées pour déterminer la mobilité des vésicules portant la forme mutée de VGLUT3. Nous avons infecté des neurones d'hippocampe en culture avec des lentivirus exprimant VGLUT3 et VGLUT3-p.A211V, tous deux couplés à la protéine fluorescente Venus (dérivée de la YFP). Nous avons ajusté les quantités de virus injectées pour obtenir le même niveau d'expression pour les deux protéines. Nous avons ensuite blanchi des boutons synaptiques d'intérêt et mesuré la récupération de la fluorescence dans ces boutons ; cette récupération traduisant un déplacement rapide ou lent de vésicules synaptiques (Herzog *et al.*, 2011) correspondant aux deux pentes de la courbe (Figure 6B partie 1 des résultats). Le retour rapide de la fluorescence après le photo-blanchiment (première pente) correspond aux VSs qui transitent à travers la zone photo-blanchie via un transport axonal alors que la composante lente du FRAP (deuxième pente) pourrait correspondre à l'échange de VSs entre le transport axonal et les groupes de VSs stabilisés au niveau du bouton synaptique (Darcy *et al.*, 2006; Tsurriel *et al.*, 2006). La récupération biphasique de la fluorescence est toujours incomplète au bout d'une heure d'enregistrement. Nous n'observons pas de différence significative entre les deux isoformes sauvages et mutées si l'on compare l'intensité de récupération dans le temps. De plus, le pourcentage de récupération au bout d'une heure est identique pour les deux protéines.

Nous avons également réalisé une expérience de FRAP avec une cinétique plus rapide. En effet, nous avons enregistré la récupération de fluorescence toutes les 5 secondes pendant 10 minutes après le photo-blanchiment. Cette configuration permet de mieux observer la mobilité du *pool* rapide des deux protéines mutées. Malgré la légère hausse du plateau de la cinétique de récupération de la fluorescence durant les 10 premières minutes chez VGLUT3-p.A211V, la différence entre les deux protéines n'est pas significativement différente. Les barres d'erreur étant assez importantes, il faudrait donc refaire ces expériences en augmentant le n et voir si cette différence est significative ou non. Si cette différence se confirmait, cela suggérerait une différence entre les *pool* de vésicules rapides VGLUT3-positives et VGLUT3-p.A211V-positives. On aurait donc un *pool* de VSs mobiles plus rapide avec la protéine mutée qu'avec la protéine sauvage. De plus, si l'on observe les images de la séquence de FRAP (Figure 6A, partie 1 des résultats), il semblerait que le bruit de fond soit plus élevé dans les neurones exprimant les lentivirus VGLUT3-p.A211V que dans ceux exprimant la protéine sauvage. Cependant, cette différence pourrait être due à la quantité du virus VGLUT3-p.A211V-venus déposée sur les cultures neuronales qui est beaucoup plus importante que celle déposée avec le virus VGLUT3-venus. La légère différence non significative de cinétique de récupération de la fluorescence en Fast FRAP pourrait donc être reliée à la surexpression du virus exprimant la protéine mutée.

Il semblerait donc que la mobilité des VSs au niveau des terminaisons synaptiques soit pas ou peu altérée par la présence de VGLUT3-p.A211V.

La baisse d'expression observée dans les boutons synaptiques est-elle due à un problème d'adressage de la protéine vers les terminaisons? Pour répondre à cette question, nous avons réalisé un crible double hybride sur levure en collaboration avec la société Hybrigenics. Ce crible double hybride nous a permis de déterminer des interactions de la région KWAPPLER de VGLUT3 avec des protéines du cytosquelette, impliquées dans le mouvement de cargo comme la dynéine. Nous avons comparé les interactions obtenues entre les protéines candidates identifiées dans le crible et les deux isoformes de VGLUT3. Nous n'avons pas observé de perte totale ou d'augmentation forte des interactions avec la protéine mutée.

Donc le problème de défaut d'expression au niveau des terminaisons pourrait ne pas provenir de la perte d'une interaction avec les protéines de cytosquelette et les moteurs moléculaires. Il faut bien sûr prendre en compte les limites quantitatives de la technique utilisée pour mesurer l'interaction. En effet, la coloration X-gal obtenue est peu quantitative et sa résolution est faible. Une légère baisse ou augmentation de l'interaction avec la forme mutée de la protéine n'aurait pas été détectable avec la coloration que nous avons utilisée.

Une méthode de quantification relative aurait pu être utilisée via la détection par immunofluorescence de l'activité de la beta-galactosidase (Oender *et al.*, 2006). Il faut aussi noter que ces résultats sont en accord avec ceux obtenus en FRAP. Les VSs contenant VGLUT3-p.A224V ne semblent pas avoir de problème à être transportées vers les terminaisons.

Le crible double hybride a également permis d'identifier d'autres protéines interagissant avec seulement la courte boucle cytoplasmique contenant le motif KWAPPLER de VGLUT3. Il serait intéressant de confirmer ces interactions par d'autres méthodes (GST-pull down, immunoprécipitation).

La distribution de VGLUT3 muté dans le soma est normale alors que dans les terminaisons synaptiques, nous observons une diminution de 70% de son expression. Le crible double hybride n'a pas permis d'établir une perte ou augmentation d'interaction de la protéine mutée avec les protéines impliquées dans le système d'adressage aux terminaisons. La protéine mutée serait-elle plus activement dégradée dans les terminaisons synaptiques ?

Le crible double hybride a permis de révéler une interaction entre la culline 3 et VGLUT3. La culline 3 est une protéine faisant partie de la ligase E3 qui intervient dans la voie de dégradation des protéines par le protéasome. Or, nous n'avons pas observé de perte ou de forte augmentation de l'interaction entre la culline 3 et VGLUT3 muté. Cela suggère qu'il n'y a pas de rétention forte de la protéine mutée avec la ligase E3 et donc pas d'augmentation de la dégradation de VGLUT3-p.A211V par cette voie là. Mais il existe d'autres systèmes de dégradation de protéine. La protéine mutée pourrait être dégradée au niveau des terminaisons synaptiques par un processus ne faisant pas intervenir la culline 3 ou par un recyclage prématuré vers les systèmes de dégradation. Cela permettrait d'expliquer la diminution d'expression observée au niveau des terminaisons et non au niveau somato-dendritique. Des expériences complémentaires seraient nécessaires pour répondre à l'hypothèse d'une dégradation rapide de la protéine mutée au niveau des terminaisons synaptiques.

En effet, au niveau somato-dendritique, VGLUT3-p.A224V est bien adressé et ses niveaux d'expression sont identiques à ceux de VGLUT3. Ces résultats suggèrent qu'il existerait différents systèmes d'adressage des protéines entre les terminaisons et le compartiment somato-dendritique et même au sein de différentes terminaisons. En effet, l'étude réalisée par Gagnon *et al.* dans le raphé dorsal révèle l'existence d'un système complexe d'adressage des différents types de VSs vers les terminaisons axonales des neurones sérotoninergiques (Gagnon & Parent, 2014). De plus, le fait que VGLUT3 soit le

seul des trois VGLUTs à être adressé au niveau somato-dendritique suggère que VGLUT3 pourrait jouer d'autres rôles que celui d'accumuler le glutamate dans la VS. Son rôle dans le soma et les dendrites reste largement inconnu, même s'il a été proposé que la libération de glutamate pouvait agir comme un messenger rétrograde modulant la transmission synaptique (Zilberter, 2000; Harkany *et al.*, 2004; Duguid *et al.*, 2007).

La structure 3D des VGLUTs reste encore inconnue à ce jour puisqu'ils n'ont pas encore été cristallographiés. Cependant, des modèles 3D des VGLUTs ont été générés à partir de la structure cristallographique du transporteur du glycerol-3-phosphate de la bactérie *Escherichia Coli*, un distant orthologue bactérien des VGLUTs (Almqvist *et al.*, 2007). Dans cette étude, un modèle 3D de VGLUT1 a été proposé. Nous avons voulu savoir si la mutation p.A211V modifiait la conformation du modèle 3D putatif. Pour cela, un modèle 3D putatif de VGLUT3 sauvage et muté a été généré. Sur ce modèle putatif, le résidu alanine en position 211 est placé d'une manière stratégique sur la quatrième petite boucle cytoplasmique (CL4) puisqu'il fait face au pore du transporteur. Le changement de l'alanine par une valine pourrait modifier la conformation de la protéine, affectant le pore et donc le transport du glutamate. Ce modèle prédit peu de changement dans la conformation de la protéine. En effet, chez le mutant, on perdrait essentiellement l'interaction entre l'alanine 211 et la cystéine 57 de la partie N-terminale de la protéine ce qui provoquerait un léger écartement de la boucle CL4 de la partie N-terminale de la protéine. Cette perte d'interaction pourrait affecter le transport du glutamate ou provoquer un adressage prématuré aux systèmes de dégradation.

L'activité de transport du glutamate par VGLUT3 a été évaluée sur des préparations de VSs extraites de cellules BON exprimant VGLUT3 ou VGLUT3-p.A211V. Nous l'avons ensuite évaluée de façon indirecte sur des préparations de VSs sérotoninergiques extraites du cortex de souris WT et VGLUT3^{A224V/A224V}.

Sur cellules BON, la recapture de [³H]L-glutamate semble être moins efficace qu'avec le transporteur muté mais cette baisse n'est pas significativement différente de l'activité de l'isoforme sauvage.

Il est difficile d'isoler les vésicules purement VGLUT3-positives dans le cerveau de souris. En revanche, il est possible d'avoir une estimation indirecte de l'activité de VGLUT3 en mesurant la synergie vésiculaire. Il a été montré, par notre équipe, que la présence de VGLUT3 dans les interneurons cholinergiques du striatum et les neurones sérotoninergiques des noyaux du raphé, permettait d'augmenter l'accumulation d'acétylcholine (ACh) ou de 5-HT (respectivement) dans les VSs (Gras *et al.*, 2008; Amilhon *et al.*, 2010). Dans les neurones sérotoninergiques, la recapture de 5-HT dans les VSs en

présence de glutamate est augmenté de + 30% (Amilhon *et al.*, 2010). Nous avons donc mesuré l'accumulation de [³H]5-HT en absence ou en présence de glutamate dans les vésicules synaptiques corticales de nos différents mutants. Comme attendu, les souris VGLUT3-KO ne présentent pas d'augmentation de la recapture de sérotonine en présence de glutamate. En revanche, nous avons observé une augmentation de 21 à 27% glutamate-dépendant du transport vésiculaire de 5-HT avec les vésicules synaptique provenant du cortex de souris WT, VGLUT3^{A224V/+} et VGLUT3^{A224V/A224V}.

Ces résultats suggèrent donc que la mutation n'affecte pas ou peu la fonction de transport du glutamate de VGLUT3. Donc, cette interaction hypothétique de l'alanine 211 avec la cystéine 57 de la partie N-terminale de la protéine ne semble pas nécessaire pour l'accumulation de glutamate dans les VSs par VGLUT3.

En collaboration avec l'équipe de Christian Rosenmund (Université La Charité, Berlin, Germany), la quantité de glutamate libéré, sa probabilité de libération ainsi que la taille du pool immédiatement libérable (RRP) ont été mesurées électrophysiologiquement sur des micro-cultures de neurones infectées par des lentivirus exprimant VGLUT3 ou VGLUT3-p.A211V. La mutation p.A211V n'a aucun effet sur la quantité de glutamate libéré par les neurones ainsi que sur sa probabilité de libération. Donc malgré une diminution de 70% de l'expression de la protéine mutée, la probabilité de libération du glutamate ne change pas. Ces résultats sont en accord avec ceux observés sur l'activité de transport de VGLUT3. En revanche, ces résultats contredisent assez fortement la notion que le nombre de VGLUT présent sur une VS détermine la quantité de glutamate accumulée dans la vésicule ainsi que la probabilité de fusion de la VS (Wojcik *et al.*, 2004; Moechars *et al.*, 2006; Weston *et al.*, 2011; Herman *et al.*, 2014).

Les vésicules contenant VGLUT1 ont une probabilité de libération plus basse que celle contenant VGLUT2 ou VGLUT3 (Weston *et al.*, 2011). Cet effet est médié par l'interaction entre VGLUT1 et l'endophiline 1 (De Gois *et al.*, 2006). L'activité de fusion vésiculaire spontanée a été déterminée en mesurant l'amplitude et la fréquence des courants postsynaptiques excitateurs spontanés miniatures (mEPSC). En effet, il existe une sous-population de vésicules appelée *pool* spontané qui peut fusionner spontanément à la membrane plasmique. Cette fusion est responsable de la production de courants postsynaptiques excitateurs miniatures (Fatt & Katz, 1952). L'amplitude et la fréquence de ces courants sont significativement plus faibles chez les mutants par rapport aux WT. La baisse de fréquence de ces courants pourrait s'expliquer par le fait qu'un certain nombre de vésicules présentes au niveau des terminaisons synaptiques est dépourvu de VGLUT3. Ces vésicules ne contiennent donc pas de glutamate. Les événements de fusion/libération

spontanés de ces vésicules « vides » entraîneraient une baisse de la fréquence des mEPSCs.

Est-ce que cette diminution d'expression de VGLUT3 a un effet sur le comportement des souris ? Les souris VGLUT3-KO présentent un phénotype anxieux et une hypersensibilité locomotrice induite par la cocaïne (Gras *et al.*, 2008; Amilhon *et al.*, 2010). Nous avons donc cherché à déterminer si les souris VGLUT3^{A224V/A224V} présentaient ces phénotypes là. De façon surprenante malgré une baisse de 70% de VGLUT3, aucun de ces phénotypes n'est observé chez les souris VGLUT3^{A224V/A224V}.

De plus, les caractéristiques biochimiques sont inchangées. L'expression de VGLUT3 ne semble donc pas linéairement corrélée avec son activité. Pour confirmer cela, nous avons décidé de croiser des souris hétérozygotes de la lignée VGLUT3^{A224V/A224V} avec des souris hétérozygotes de la lignée VGLUT3-KO pour obtenir des souris avec une seule copie de l'allèle muté VGLUT3-p.A224V. Ces souris (appelée VGLUT3^{A224V/-}) présentent une perte de 80% de l'expression de VGLUT3. L'activité de transport de glutamate de VGLUT3 déterminée indirectement par mesure de la synergie vésiculaire n'est pas modifiée chez ces mutants. De plus, ces souris ne présentent pas de phénotype anxieux ni d'augmentation locomotrice suite à l'injection de cocaïne par rapport aux souris WT. Ces résultats renforcent donc la notion qu'il existe une relation non linéaire entre l'expression de VGLUT3 et son activité. En revanche, en activité locomotrice basale, on observe une légère augmentation de locomotion chez les souris VGLUT3^{A224V/-}. Globalement, au vu de ces résultats, VGLUT3 aurait donc un rôle plutôt modulateur. En effet, le fait d'agir sur un système modulateur pourrait avoir un effet moins prononcé sur le comportement que lorsque l'on agit sur les systèmes majeurs.

L'étude de ces deux mutants montre que malgré une réduction massive de l'expression de VGLUT3, ces fonctions biochimiques et intégrées ne sont pas modifiées. Cela suggère donc que l'expression de VGLUT3 n'est pas linéairement corrélée à son activité (voir figure 11 de la partie 1 des résultats). En effet, avec seulement 20% de VGLUT3, son activité est la même qu'avec 100% de VGLUT3. Quel est donc le seuil à partir duquel l'activité de VGLUT3 est atteinte. La « zone dynamique » de VGLUT3 se situerait entre 20 et 0% d'expression (figure 11, partie 1 des résultats).

Est-ce que ces observations sont valides pour VGLUT1 et VGLUT2? Autrement dit : est ce que l'accumulation de glutamate catalysée par VGLUT1 et VGLUT2 est directement proportionnelle à la quantité de transporteurs sur la vésicule ? Cette question est encore débattue à l'heure actuelle. En effet, certaines études ont montré qu'une augmentation de l'expression de VGLUT résultait en une diminution de l'amplitude et la fréquence des

courants postsynaptiques excitateurs miniatures et à une augmentation de la taille du quantum de glutamate libéré (Daniels *et al.*, 2004; Wojcik *et al.*, 2004; Wilson *et al.*, 2005). Ces observations seraient en faveur d'une relation linéaire entre l'expression de VGLUT1 et son activité. Cependant, si l'accumulation vésiculaire de glutamate et sa transmission étaient proportionnelles au nombre de copies de VGLUTs, les hétérozygotes de la lignée de souris VGLUT3-KO (exprimant seulement 50% de VGLUTs) devraient présenter une diminution de 50% dans l'accumulation de glutamate et cela devrait se traduire par des modifications comportementales. A notre connaissance, aucun phénotype particulier n'a été reporté sur les hétérozygotes de la lignée VGLUT3^{+/−}. Fremeau *et al.* ont rapporté que les souris hétérozygotes pour VGLUT1 présentaient une transmission excitatrice normale (Fremeau *et al.*, 2004). La plasticité à court terme est inchangée après une réduction de l'expression de VGLUT1 de moitié mais des différences apparaissent dans la capacité d'induire la LTP (Leo *et al.*, 2009; Balschun *et al.*, 2010). Les souris hétérozygotes pour VGLUT2 présentent un phénotype discret dans l'aversion du goût et les réponses nociceptives (Moechars *et al.*, 2006; Leo *et al.*, 2009; Schallier *et al.*, 2009). Cependant, ces phénotypes sont superficiels. Donc contrairement à VMAT2 et VACHT, l'activité des VGLUTs ne semble pas strictement proportionnelle à la quantité des transporteurs (Fon *et al.*, 1997; Prado *et al.*, 2006), au moins quand le niveau d'expression se situe dans la zone 50-100 %.

Selon de récentes estimations, une vésicule exprime en moyenne environ 10-14 copies de VGLUT1 ou de VGLUT2 respectivement (Takamori, 2006). Cependant, une étude plus récente suggère qu'une vésicule posséderait en moyenne quatre VGLUT1 (Mutch *et al.*, 2011). Dans cette étude, les auteurs ont développé une approche d'imagerie à haute résolution combinée à un système permettant d'isoler des vésicules pour quantifier les protéines sur une vésicule synaptique isolée et unique. Malgré cette différence de nombre, ces deux résultats montrent que plusieurs copies de VGLUT1 et VGLUT2 sont insérées dans la membrane des VSs. Il apparaît donc raisonnable de faire l'hypothèse que, comme VGLUT1 et VGLUT2, plusieurs copies de VGLUT3 sont insérées dans les membranes des VSs.

Chez la drosophile, la diminution du niveau d'expression du DVGLUT résulte en une réduction de la fréquence des courants postsynaptiques excitateurs miniatures avec aucun changement dans la taille du quantum (Daniels *et al.*, 2006). Une seule copie de VGLUT serait donc suffisante pour remplir la vésicule en glutamate et maintenir une taille normale du quantum. De plus, des travaux récents montrent que VGLUT peut charger la vésicule en glutamate très rapidement et efficacement lorsque les concentrations en ions Cl⁻ et K⁺ sont idéales (Schenck *et al.*, 2009; Preobraschenski *et al.*, 2014). Cela permet de comprendre le

fait que des trains de stimulations à hautes fréquences n'altère pas ou peu l'accumulation de glutamate dans les VSs.

Avec uniquement 20% de VGLUT3, les souris présentent un phénotype comportemental similaire aux souris WT. Cette observation est en accord avec l'étude de Daniels qui propose qu'un seul VGLUT serait suffisant pour charger la VS en glutamate (Daniels *et al.*, 2006). Pourquoi est-il alors nécessaire d'avoir une dizaine de VGLUTs sur les VSs ? Une étude récente a montré que les copies additionnelles de VGLUT1 joueraient un rôle dans la stabilisation des VSs dans la zone active (zone d'exocytose des VSs) et permettraient de moduler la cinétique et l'efficacité d'exocytose des VSs (Siksou *et al.*, 2013). VGLUT1 jouerait également un important rôle dans le recyclage des VSs en coordonnant le recrutement de protéines cargos (Pan *et al.*, 2015).

Nos résultats suggèrent fortement que la mutation p.A211V réduit massivement le nombre de copie de VGLUT3 dans les terminaisons synaptiques. Cette diminution peut se traduire :

- par une diminution du nombre de transporteur par vésicules
- et/ou par une diminution du nombre de vésicules VGLUT3-positives dans les boutons synaptiques.

Pour éclaircir cette question, nous avons analysé avec une technique de microscopie de super-résolution, le STED (pour *Stimulated Emission Depletion*), la distribution de VGLUT3 dans les terminaisons nerveuses de nos différents mutants. La résolution de cette technique à champ lointain est comprise entre 20 et 50 nm. Elle permet donc l'observation de petits organites intracellulaires comme les VSs. Contrairement à la microscopie électronique, le STED ne nécessite pas l'utilisation d'une enceinte à vide, ni de réaliser des coupes fines. De plus, des observations *in vivo* sont possibles (Hell & Wichmann, 1994; Berning *et al.*, 2012). Nous avons observé le marquage VGLUT3 chez nos différents mutants dans les varicosités des neurones cholinergiques du striatum. Le nombre de spot marqué par VGLUT3 est maximal chez les WT et diminue progressivement chez les différents mutants pour arriver à 0% chez les souris VGLUT3-KO. La diminution est de 44 % chez les souris VGLUT3^{A224V/+}, de 79% chez les souris VGLUT3^{A224V/A224V} et de 84% chez les VGLUT3^{A224V/-}. Cette diminution est très fortement corrélée avec l'expression de VGLUT3 détectée en immunautoradiographie (voir Figure 11A, partie 1 des résultats). Ces résultats nous montrent qu'il y a une diminution du nombre de vésicules VGLUT3-positives dans les terminaisons chez nos différents mutants.

Ces résultats suggèrent plusieurs modèles quand à la distribution de VGLUT3 sur les vésicules (**Figure 39**) :

- modèle 1 où le nombre de copies de VGLUT3 par vésicule diminue
- modèle 2 où le nombre de vésicules VGLUT3-positives diminue
- modèle 3 qui est un mélange des deux premiers modèles

Dans cette étude, nous avons observé une recapture normale de VGLUT3 dans les vésicules des cellules BON exprimant VGLUT3-p.A211V et sur VSs de cerveau de souris VGLUT3^{A224V/A224V}. Cependant, une petite diminution d'amplitude dans les courants postsynaptiques excitateurs miniatures a également été observée sur des cultures de neurones isolés exprimant la forme mutée de VGLUT3 suggérant une diminution du quantum vésiculaire. Cette différence entre la mesure de recapture et les enregistrements des mEPSCs peut s'expliquer par la différence de sensibilité des deux méthodes. En effet, avec la méthode de mesure du transport de glutamate que nous avons utilisée (mesure de la recapture de sérotonine tritiée), il est très difficile de détecter de faibles changements dans la quantité de glutamate accumulée dans les VSs. En revanche, les mesures électrophysiologiques permettent de mesurer plus précisément de faible changement dans la taille du quantum vésiculaire. Une faible diminution mais non significative a été observée sur la recapture de glutamate dans les cellules BON. Il faudrait augmenter le nombre de points pour atteindre éventuellement la significativité et réconcilier les résultats observés avec les deux méthodes.

La synergie vésiculaire opère également avec l'ACh des TANs. En effet, lorsque VGLUT3 est présent, il permet une augmentation de plus de 200% de l'accumulation d'ACh dans les VSs en présence de glutamate (Gras *et al.*, 2008). En mesurant l'augmentation d'ACh dans les VSs de striatum, en présence de glutamate, nous aurions certainement pu observer une légère diminution de recapture d'ACh chez les souris VGLUT3^{A224V/A224V}. Il est en effet plus facile de détecter une légère diminution sur un effet de +200% que sur un effet de +30%.

De plus, avec la méthode que nous avons utilisée pour mesurer la fonction de transport de VGLUT3, nous homogénéisons toutes les VSs, celles du soma et celle des terminaisons. Nous avons probablement une population hétérogène de VSs vis-à-vis du nombre de copies de VGLUT3 puisque dans le soma, nous n'avons pas observé de diminution d'expression de la protéine mutée. De plus, lorsque nous mesurons les courants synaptique sur les autapses de neurones hippocampiques n'exprimant pas VGLUT3 mais VGLUT1. Dans ce modèle, les mEPSC reflètent essentiellement les VSs du *pool* spontané et celles qui sont arrimées à la membrane plasmique. En revanche, l'activité de transport de

VGLUT3 est mesurée sur un *pool* comprenant l'ensemble des types vésiculaires. Cela pourrait donc expliquer en partie les différences observées. La diminution de l'amplitude des mEPSCs observée sur les autapses de neurones hippocampiques suggère une diminution du nombre de VGLUTs. Le modèle 1 de la **Figure 39** serait donc en accord avec ce résultat.

Le modèle 1 suggère une diminution du nombre de VGLUT3 muté sur les VSs et part du postulat qu'un seul VGLUT3 est nécessaire pour remplir la vésicule en glutamate. Cela expliquerait pourquoi l'accumulation de glutamate dans les VSs et la synergie vésiculaire sont maintenues (ou seulement légèrement diminuées) malgré une diminution de l'expression de VGLUT3. Ce modèle est concordant avec celui proposé par Daniels et al en 2006 (Daniels *et al.*, 2006).

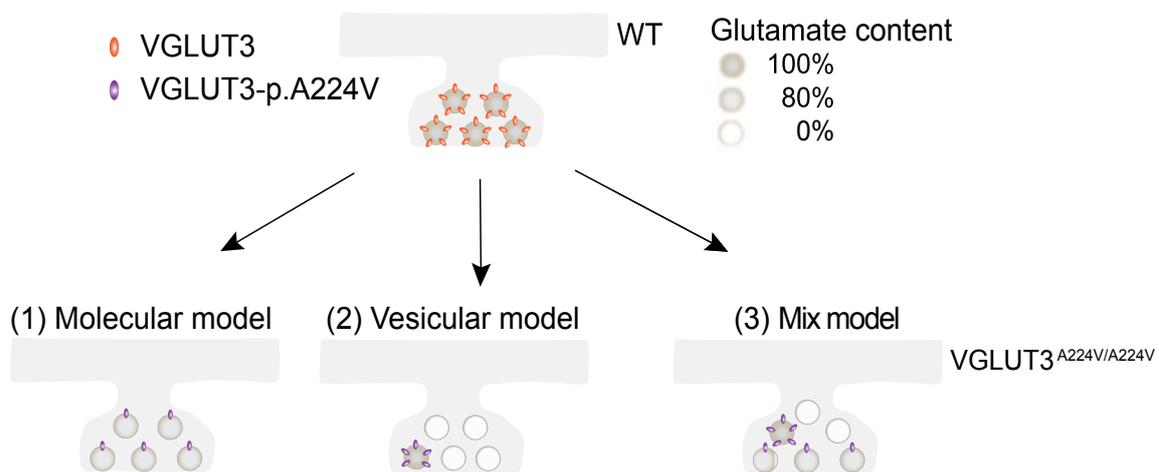


Figure 39. Les différents modèles putatifs de répartition de VGLUT3 sur les VSs.

(1) Modèle moléculaire où le nombre de transporteur par vésicule diminue. (2) Modèle vésiculaire où le nombre de vésicules VGLUT3-positives diminue. (3) Modèle mélangé où le nombre de transporteur par vésicule ainsi que le nombre de vésicules VGLUT3-positives varient. VGLUT3 est représenté en orange chez les WT et en violet chez les mutants. La taille du quantum de glutamate est représentée en grisé.

Cependant, ce modèle est en conflit avec les observations obtenues en STED. Les expériences de STED ont montré une diminution du nombre de spots fluorescents dans les varicosités des TANs dans le striatum dorsal chez tous les mutants. Cette diminution est d'ailleurs très bien corrélée avec la diminution d'expression de la protéine. Nous proposons donc un deuxième modèle (**Figure 39, modèle 2**) où le nombre de vésicules VGLUT3-positives est diminué. On aurait donc d'une part, un faible nombre de vésicules VGLUT3-positives ($\approx 20-30\%$) possédant le bon nombre de copie de VGLUT3 et de l'autre des vésicules vides de glutamate ne possédant plus VGLUT3. La diminution observée de

fréquence mEPSC est en accord avec ce second modèle.

En résumé, aucun de ces deux modèles ne rend compte complètement des résultats de biochimie et d'électrophysiologie.

Un troisième modèle serait plus concordant avec l'ensemble de nos résultats expérimentaux. Dans le modèle 3 (**Figure 39**), on aurait à la fois des VSs présentant : 1) un nombre de copies de VGLUT3 diminué, 2) un nombre de VGLUT3 normal et enfin 3) une absence de VGLUT3 (et donc serait vide en glutamate).

Ce troisième modèle suggère donc l'existence d'un tri sélectif et complexe des VSs qui n'est pas impossible puisqu'une récente étude a révélé l'existence d'un système complexe d'adressage des différents types de VSs vers les terminaisons axonales des neurones sérotoninergiques (Gagnon & Parent, 2014).

Conclusion

Tout au long de ce projet, nous avons essayé de comprendre les effets de la mutation humaine p.A211V de VGLUT3 sur le système nerveux central.

La mutation p.A211V altère profondément les niveaux d'expression de VGLUT3 et sa distribution subcellulaire mais ne modifie que très faiblement ses fonctions. En effet, la diminution d'expression de la protéine mutée n'est observée qu'au niveau des terminaisons synaptiques. Une dégradation accélérée de la protéine pourrait avoir lieu dans les terminaisons synaptiques. D'autres expériences seront nécessaires pour infirmer ou confirmer cette hypothèse. Les fonctions de transport, de libération de glutamate ainsi que la probabilité de libération des VSs ne sont que très peu altérées par la mutation. Cependant, la fréquence et l'amplitude des courants postsynaptiques excitateurs miniatures sont légèrement diminuées et dans le modèle à une copie de VGLUT3-p.A224V, nous commençons à observer ces modifications. La mutation a donc un effet complexe sur VGLUT3 au niveau du système nerveux central.

Notre étude révèle une distribution inattendue de VGLUT3 dans les VSs chez les mutants. Il existerait différentes populations de VSs n'exprimant pas le même nombre de copies de VGLUT3 au sein d'une terminaison nerveuse. Cela suggérerait un système de tri et d'adressage des VSs plus complexe que prévu. De plus, elle montre que la relation entre le nombre de molécules de VGLUT3 et son implication moléculaire et physiologique n'est pas linéaire. Il serait nécessaire de réaliser d'autres expériences pour pouvoir valider ou invalider l'un des trois modèles proposés dans la figure 39. Clarifier cette question serait clé pour comprendre complètement les pathologies impliquant les transporteurs vésiculaires du glutamate (VGLUTs).

Références

A

- Accardi, A. (2014) Unveiling the secret lives of glutamate transporters: VGLUTs engage in multiple transport modes. *Neuron*, **84**, 1110-1112.
- Aihara, Y., Mashima, H., Onda, H., Hisano, S., Kasuya, H., Hori, T., Yamada, S., Tomura, H., Yamada, Y., Inoue, I., Kojima, I. & Takeda, J. (2000) Molecular cloning of a novel brain-type Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter. *J Neurochem*, **74**, 2622-2625.
- Akil, O., Seal, R.P., Burke, K., Wang, C., Alemi, A., During, M., Edwards, R.H. & Lustig, L.R. (2012) Restoration of hearing in the VGLUT3 knockout mouse using virally mediated gene therapy. *Neuron*, **75**, 283-293.
- Alabi, A.A. & Tsien, R.W. (2013) Perspectives on kiss-and-run: role in exocytosis, endocytosis, and neurotransmission. *Annu Rev Physiol*, **75**, 393-422.
- Alheid, G.F., Heimer, L., Switzer, R.C (1990) Basal Ganglia. In: The Human Nervous System, Paxinos G. *San Diego, CA. Academic Press, Inc*, 483-582.
- Almqvist, J., Huang, Y., Laaksonen, A., Wang, D.N. & Hovmoller, S. (2007) Docking and homology modeling explain inhibition of the human vesicular glutamate transporters. *Protein Sci*, **16**, 1819-1829.
- Altschuler, R.A., Hoffman, D.W. & Wenthold, R.J. (1986) Neurotransmitters of the cochlea and cochlear nucleus: immunocytochemical evidence. *Am J Otolaryngol*, **7**, 100-106.
- Altschuler, R.A., Kachar, B., Rubio, J.A., Parakkal, M.H. & Fex, J. (1985) Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase-like immunoreactivity in the guinea pig cochlea. *Brain Res*, **338**, 1-11.
- Amilhon, B., Lopicard, E., Renoir, T., Mongeau, R., Popa, D., Poirel, O., Miot, S., Gras, C., Gardier, A.M., Gallego, J., Hamon, M., Lanfumey, L., Gasnier, B., Giros, B. & El Mestikawy, S. (2010) VGLUT3 (vesicular glutamate transporter type 3) contribution to the regulation of serotonergic transmission and anxiety. *J Neurosci*, **30**, 2198-2210.
- Anderica-Romero, A.C., Gonzalez-Herrera, I.G., Santamaria, A. & Pedraza-Chaverri, J. (2013) Cullin 3 as a novel target in diverse pathologies. *Redox Biol*, **1**, 366-372.
- Anggono, V. & Huganir, R.L. (2012) Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol*, **22**, 461-469.
- Armstrong, N., Jasti, J., Beich-Frandsen, M. & Gouaux, E. (2006) Measurement of conformational changes accompanying desensitization in an ionotropic glutamate receptor. *Cell*, **127**, 85-97.
- Aschenbrenner, L., Naccache, S.N. & Hasson, T. (2004) Uncoated endocytic vesicles require the unconventional myosin, Myo6, for rapid transport through actin barriers. *Mol Biol Cell*, **15**, 2253-2263.
- Ashmore, J. & Gale, J. (2004) The cochlear amplifier. *Curr Biol*, **14**, R403-404.
- Ashmore, J.F. (1987) A fast motile response in guinea-pig outer hair cells: the cellular basis of the cochlear amplifier. *J Physiol*, **388**, 323-347.

Atoji, Y. & Karim, M.R. (2014) Expression of vesicular glutamate transporter 3 mRNA in the brain and retina of the pigeon. *J Chem Neuroanat*, **61-62**, 124-131.

Attwell, D. (2000) Brain uptake of glutamate: food for thought. *J Nutr*, **130**, 1023S-1025S.

B

Bai, L., Xu, H., Collins, J.F. & Ghishan, F.K. (2001) Molecular and functional analysis of a novel neuronal vesicular glutamate transporter. *J Biol Chem*, **276**, 36764-36769.

Bai, L., Zhang, X. & Ghishan, F.K. (2003) Characterization of vesicular glutamate transporter in pancreatic alpha - and beta -cells and its regulation by glucose. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **284**, G808-814.

Bak, L.K., Schousboe, A. & Waagepetersen, H.S. (2006) The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J Neurochem*, **98**, 641-653.

Balaji, J. & Ryan, T.A. (2007) Single-vesicle imaging reveals that synaptic vesicle exocytosis and endocytosis are coupled by a single stochastic mode. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 20576-20581.

Balschun, D., Moechars, D., Callaerts-Vegh, Z., Vermaercke, B., Van Acker, N., Andries, L. & D'Hooge, R. (2010) Vesicular glutamate transporter VGLUT1 has a role in hippocampal long-term potentiation and spatial reversal learning. *Cereb Cortex*, **20**, 684-693.

Bannai, H., Levi, S., Schweizer, C., Inoue, T., Launey, T., Racine, V., Sibarita, J.B., Mikoshiba, K. & Triller, A. (2009) Activity-dependent tuning of inhibitory neurotransmission based on GABAAR diffusion dynamics. *Neuron*, **62**, 670-682.

Bartel, P.L., Chien, C., Sternglanz, R. & Fields, S. (1993) Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions. *Cellular Interactions in Development: A practical Approach (Hartley, D. A., ed.)*, Oxford University Press, Oxford, pp. 153-179.

Bedford, L., Lowe, J., Dick, L.R., Mayer, R.J. & Brownell, J.E. (2011) Ubiquitin-like protein conjugation and the ubiquitin-proteasome system as drug targets. *Nat Rev Drug Discov*, **10**, 29-46.

Bekkers, J.M. & Stevens, C.F. (1989) NMDA and non-NMDA receptors are co-localized at individual excitatory synapses in cultured rat hippocampus. *Nature*, **341**, 230-233.

Bellocchio, E.E., Hu, H., Pohorille, A., Chan, J., Pickel, V.M. & 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., Fremeau, R.T., Jr. & 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.

- Bennett, V., Gardner, K. & Steiner, J.P. (1988) Brain adducin: a protein kinase C substrate that may mediate site-directed assembly at the spectrin-actin junction. *J Biol Chem*, **263**, 5860-5869.
- Bergles, D.E., Roberts, J.D., Somogyi, P. & Jahr, C.E. (2000) Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature*, **405**, 187-191.
- Berning, S., Willig, K.I., Steffens, H., Dibaj, P. & Hell, S.W. (2012) Nanoscopy in a living mouse brain. *Science*, **335**, 551.
- Beurg, M., Michalski, N., Safieddine, S., Bouleau, Y., Schneggenburger, R., Chapman, E.R., Petit, C. & Dulon, D. (2010) Control of exocytosis by synaptotagmins and otoferlin in auditory hair cells. *J Neurosci*, **30**, 13281-13290.
- Bezzi, P., Gunderson, V., Galbete, J.L., Seifert, G., Steinhauser, C., Pilati, E. & Volterra, A. (2004) Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci*, **7**, 613-620.
- Bianchi, G., Tripodi, G., Casari, G., Salardi, S., Barber, B.R., Garcia, R., Leoni, P., Torielli, L., Cusi, D., Ferrandi, M. & et al. (1994) Two point mutations within the adducin genes are involved in blood pressure variation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 3999-4003.
- Billups, B. (2005) Colocalization of vesicular glutamate transporters in the rat superior olivary complex. *Neurosci Lett*, **382**, 66-70.
- Blaesse, P., Ehrhardt, S., Friauf, E. & Nothwang, H.G. (2005) Developmental pattern of three vesicular glutamate transporters in the rat superior olivary complex. *Cell Tissue Res*, **320**, 33-50.
- Blondeau, F., Ritter, B., Allaire, P.D., Wasiak, S., Girard, M., Hussain, N.K., Angers, A., Legendre-Guillemain, V., Roy, L., Boismenu, D., Kearney, R.E., Bell, A.W., Bergeron, J.J. & McPherson, P.S. (2004) Tandem MS analysis of brain clathrin-coated vesicles reveals their critical involvement in synaptic vesicle recycling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 3833-3838.
- Bole, D.G. & Ueda, T. (2005) Inhibition of vesicular glutamate uptake by Rose Bengal-related compounds: structure-activity relationship. *Neurochem Res*, **30**, 363-369.
- Bonanomi, D., Benfenati, F. & Valtorta, F. (2006) Protein sorting in the synaptic vesicle life cycle. *Prog Neurobiol*, **80**, 177-217.
- Boulland, J.L., Qureshi, T., Seal, R.P., Rafiki, A., Gunderson, V., Bergersen, L.H., Fremeau, R.T., Jr., Edwards, R.H., Storm-Mathisen, J. & Chaudhry, F.A. (2004) Expression of the vesicular glutamate transporters during development indicates the widespread corelease of multiple neurotransmitters. *J Comp Neurol*, **480**, 264-280.
- Branco, T. & Staras, K. (2009) The probability of neurotransmitter release: variability and feedback control at single synapses. *Nat Rev Neurosci*, **10**, 373-383.
- Brignull, H.R., Raible, D.W. & Stone, J.S. (2009) Feathers and fins: non-mammalian models for hair cell regeneration. *Brain Res*, **1277**, 12-23.
- Brodsky, F.M., Chen, C.Y., Knuehl, C., Towler, M.C. & Wakeham, D.E. (2001) Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **17**, 517-568.

- Brooks, E.S., Greer, C.L., Romero-Calderon, R., Serway, C.N., Grygoruk, A., Haimovitz, J.M., Nguyen, B.T., Najibi, R., Tabone, C.J., de Belle, J.S. & Krantz, D.E. (2011) A putative vesicular transporter expressed in *Drosophila* mushroom bodies that mediates sexual behavior may define a neurotransmitter system. *Neuron*, **72**, 316-329.
- Brose, N. (2008) For better or for worse: complexins regulate SNARE function and vesicle fusion. *Traffic*, **9**, 1403-1413.
- Brose, N., Petrenko, A.G., Sudhof, T.C. & Jahn, R. (1992) Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science*, **256**, 1021-1025.
- Brown, M.C. (1987) Morphology of labeled efferent fibers in the guinea pig cochlea. *J Comp Neurol*, **260**, 605-618.
- Buran, B.N., Strenzke, N., Neef, A., Gundelfinger, E.D., Moser, T. & Liberman, M.C. (2010) Onset coding is degraded in auditory nerve fibers from mutant mice lacking synaptic ribbons. *J Neurosci*, **30**, 7587-7597.
- Bykhovskaia, M. (2015) Calcium binding promotes conformational flexibility of the neuronal Ca(2+) sensor synaptotagmin. *Biophys J*, **108**, 2507-2520.

C

- Cahoy, J.D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L.C., Zamanian, J.L., Christopherson, K.S., Xing, Y., Lubischer, J.L., Krieg, P.A., Krupenko, S.A., Thompson, W.J. & Barres, B.A. (2008) A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci*, **28**, 264-278.
- Calabresi, P., Centonze, D., Gubellini, P., Pisani, A. & Bernardi, G. (2000) Acetylcholine-mediated modulation of striatal function. *Trends Neurosci*, **23**, 120-126.
- Carrigan, C.N., Bartlett, R.D., Esslinger, C.S., Cybulski, K.A., Tongcharoensirikul, P., Bridges, R.J. & Thompson, C.M. (2002) Synthesis and in vitro pharmacology of substituted quinoline-2,4-dicarboxylic acids as inhibitors of vesicular glutamate transport. *J Med Chem*, **45**, 2260-2276.
- Casado, M., Isope, P. & Ascher, P. (2002) Involvement of presynaptic N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar long-term depression. *Neuron*, **33**, 123-130.
- Casari, G., Barlassina, C., Cusi, D., Zagato, L., Muirhead, R., Righetti, M., Nembri, P., Amar, K., Gatti, M., Macciardi, F. & et al. (1995) Association of the alpha-adducin locus with essential hypertension. *Hypertension*, **25**, 320-326.
- Case, D.T. & Gillespie, D.C. (2011) Pre- and postsynaptic properties of glutamatergic transmission in the immature inhibitory MNTB-LSO pathway. *J Neurophysiol*, **106**, 2570-2579.
- Ceccarelli, B., Hurlbut, W.P. & Mauro, A. (1972) Depletion of vesicles from frog neuromuscular junctions by prolonged tetanic stimulation. *J Cell Biol*, **54**, 30-38.

- Chaudhry, F.A., Boulland, J.L., Jenstad, M., Bredahl, M.K. & Edwards, R.H. (2008) Pharmacology of neurotransmitter transport into secretory vesicles. *Handb Exp Pharmacol*, 77-106.
- Cheung, G. & Cousin, M.A. (2013) Synaptic vesicle generation from activity-dependent bulk endosomes requires calcium and calcineurin. *J Neurosci*, **33**, 3370-3379.
- Choquet, D. & Triller, A. (2013) The dynamic synapse. *Neuron*, **80**, 691-703.
- Chua, J.J., Kindler, S., Boyken, J. & Jahn, R. (2010) The architecture of an excitatory synapse. *J Cell Sci*, **123**, 819-823.
- Colonnier, M. (1968) Synaptic patterns on different cell types in the different laminae of the cat visual cortex. An electron microscope study. *Brain Res*, **9**, 268-287.
- Commons, K.G. (2009) Locally collateralizing glutamate neurons in the dorsal raphe nucleus responsive to substance P contain vesicular glutamate transporter 3 (VGLUT3). *J Chem Neuroanat*, **38**, 273-281.
- Conn, P.J. & Pin, J.P. (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **37**, 205-237.
- Corwin, J.T. & Oberholtzer, J.C. (1997) Fish n' chicks: model recipes for hair-cell regeneration? *Neuron*, **19**, 951-954.
- Cryan, J.F. & 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. & Watkins, J.C. (1959) Chemical excitation of spinal neurones. *Nature*, **183**, 611-612.
- Curtis, D.R., Phillis, J.W. & Watkins, J.C. (1960) The chemical excitation of spinal neurones by certain acidic amino acids. *J Physiol*, **150**, 656-682.

D

- Dallos, P., Wu, X., Cheatham, M.A., Gao, J., Zheng, J., Anderson, C.T., Jia, S., Wang, X., Cheng, W.H., Sengupta, S., He, D.Z. & Zuo, J. (2008) Prestin-based outer hair cell motility is necessary for mammalian cochlear amplification. *Neuron*, **58**, 333-339.
- Danbolt, N.C. (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol*, **65**, 1-105.
- Daniels, R.W., Collins, C.A., Chen, K., Gelfand, M.V., Featherstone, D.E. & DiAntonio, A. (2006) A single vesicular glutamate transporter is sufficient to fill a synaptic vesicle. *Neuron*, **49**, 11-16.
- Daniels, R.W., Collins, C.A., Gelfand, M.V., Dant, J., Brooks, E.S., Krantz, D.E. & DiAntonio, A. (2004) Increased expression of the *Drosophila* vesicular glutamate transporter leads to excess glutamate release and a compensatory decrease in quantal content. *J Neurosci*, **24**, 10466-10474.
- Daniels, R.W., Miller, B.R. & DiAntonio, A. (2011) Increased vesicular glutamate transporter expression causes excitotoxic neurodegeneration. *Neurobiol Dis*, **41**, 415-420.

- Daoudal, G. & Debanne, D. (2003) Long-term plasticity of intrinsic excitability: learning rules and mechanisms. *Learn Mem*, **10**, 456-465.
- Darcy, K.J., Staras, K., Collinson, L.M. & Goda, Y. (2006) Constitutive sharing of recycling synaptic vesicles between presynaptic boutons. *Nat Neurosci*, **9**, 315-321.
- Davies, C., Tingley, D., Kachar, B., Wenthold, R.J. & Petralia, R.S. (2001) Distribution of members of the PSD-95 family of MAGUK proteins at the synaptic region of inner and outer hair cells of the guinea pig cochlea. *Synapse*, **40**, 258-268.
- De Gois, S., Jeanclos, E., Morris, M., Grewal, S., Varoqui, H. & Erickson, J.D. (2006) Identification of endophilins 1 and 3 as selective binding partners for VGLUT1 and their co-localization in neocortical glutamatergic synapses: implications for vesicular glutamate transporter trafficking and excitatory vesicle formation. *Cell Mol Neurobiol*, **26**, 679-693.
- Delacroix, L. & Malgrange, B. (2015) Cochlear afferent innervation development. *Hear Res*.
- Denker, A., Bethani, I., Krohnert, K., Korber, C., Horstmann, H., Wilhelm, B.G., Barysch, S.V., Kuner, T., Neher, E. & Rizzoli, S.O. (2011a) A small pool of vesicles maintains synaptic activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 17177-17182.
- Denker, A., Krohnert, K., Buckers, J., Neher, E. & Rizzoli, S.O. (2011b) The reserve pool of synaptic vesicles acts as a buffer for proteins involved in synaptic vesicle recycling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 17183-17188.
- Descarries, L., Berube-Carriere, N., Riad, M., Bo, G.D., Mendez, J.A. & Trudeau, L.E. (2008) Glutamate in dopamine neurons: synaptic versus diffuse transmission. *Brain Res Rev*, **58**, 290-302.
- Descarries, L. & Mechawar, N. (2000) Ultrastructural evidence for diffuse transmission by monoamine and acetylcholine neurons of the central nervous system. *Prog Brain Res*, **125**, 27-47.
- Di Liegro, C.M., Schiera, G. & Di Liegro, I. (2014) Regulation of mRNA transport, localization and translation in the nervous system of mammals (Review). *Int J Mol Med*, **33**, 747-762.
- Disbrow, J.K., Gershten, M.J. & Ruth, J.A. (1982) Uptake of L-[3H] glutamic acid by crude and purified synaptic vesicles from rat brain. *Biochem Biophys Res Commun*, **108**, 1221-1227.
- Dobrunz, L.E. & Stevens, C.F. (1997) Heterogeneity of release probability, facilitation, and depletion at central synapses. *Neuron*, **18**, 995-1008.
- Drescher, M.J., Drescher, D.G., Khan, K.M., Hatfield, J.S., Ramakrishnan, N.A., Abu-Hamdan, M.D. & Lemonnier, L.A. (2006) Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide (PACAP) and its receptor (PAC1-R) are positioned to modulate afferent signaling in the cochlea. *Neuroscience*, **142**, 139-164.
- Duguid, I.C., Pankratov, Y., Moss, G.W. & Smart, T.G. (2007) Somatodendritic release of glutamate regulates synaptic inhibition in cerebellar Purkinje cells via autocrine mGluR1 activation. *J Neurosci*, **27**, 12464-12474.

Dulubova, I., Lou, X., Lu, J., Huryeva, I., Alam, A., Schneggenburger, R., Sudhof, T.C. & Rizo, J. (2005) A Munc13/RIM/Rab3 tripartite complex: from priming to plasticity? *EMBO J*, **24**, 2839-2850.

Dzubay, J.A. & Jahr, C.E. (1999) The concentration of synaptically released glutamate outside of the climbing fiber-Purkinje cell synaptic cleft. *J Neurosci*, **19**, 5265-5274.

E

Edwards, R.H. (2007) The neurotransmitter cycle and quantal size. *Neuron*, **55**, 835-858.

Eiden, L.E., Schafer, M.K., Weihe, E. & Schutz, B. (2004) The vesicular amine transporter family (SLC18): amine/proton antiporters required for vesicular accumulation and regulated exocytotic secretion of monoamines and acetylcholine. *Pflugers Arch*, **447**, 636-640.

El Mestikawy, S., Wallen-Mackenzie, A., Fortin, G.M., Descarries, L. & Trudeau, L.E. (2011) From glutamate co-release to vesicular synergy: vesicular glutamate transporters. *Nat Rev Neurosci*, **12**, 204-216.

El-Amraoui, A. & Petit, C. (2005) Usher I syndrome: unravelling the mechanisms that underlie the cohesion of the growing hair bundle in inner ear sensory cells. *J Cell Sci*, **118**, 4593-4603.

Elgoyhen, A.B. & Katz, E. (2012) The efferent medial olivocochlear-hair cell synapse. *J Physiol Paris*, **106**, 47-56.

Eliasof, S., Arriza, J.L., Leighton, B.H., Kavanaugh, M.P. & Amara, S.G. (1998) Excitatory amino acid transporters of the salamander retina: identification, localization, and function. *J Neurosci*, **18**, 698-712.

Erecinska, M. & Silver, I.A. (1990) Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Prog Neurobiol*, **35**, 245-296.

Eybalin, M. (1993) Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea. *Physiol Rev*, **73**, 309-373.

Eybalin, M., Caicedo, A., Renard, N., Ruel, J. & Puel, J.L. (2004) Transient Ca²⁺-permeable AMPA receptors in postnatal rat primary auditory neurons. *Eur J Neurosci*, **20**, 2981-2989.

Eybalin, M., Parnaud, C., Geffard, M. & Pujol, R. (1988) Immunoelectron microscopy identifies several types of GABA-containing efferent synapses in the guinea-pig organ of Corti. *Neuroscience*, **24**, 29-38.

Eybalin, M. & Pujol, R. (1984) Immunofluorescence with Met-enkephalin and Leu-enkephalin antibodies in the guinea pig cochlea. *Hear Res*, **13**, 135-140.

Eybalin, M., Renard, N., Aure, F. & Safieddine, S. (2002) Cysteine-string protein in inner hair cells of the organ of Corti: synaptic expression and upregulation at the onset of hearing. *Eur J Neurosci*, **15**, 1409-1420.

F

- Fasano, C., Rocchetti, J., Zanders, J.-F., Sakae, D.Y., Marcus-Sells, M., Ramet, L., Bolte, S., Bernard, V., Vigneault, E., Manseau, F., Isingrini, E., Desaulnier, M.-E., Ahnert-Hilger, G., Giros, B., Daumas, S., Williams, S. & El Mestikawy, S. (Submitted) Regulation of the hippocampal network by VGLUT3 and glutamate released from GABAergic basket cells. *Neuron*.
- Fatt, P. & Katz, B. (1952) The electric activity of the motor end-plate. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, **140**, 183-186.
- Fattorini, G., Verderio, C., Melone, M., Giovedi, S., Benfenati, F., Matteoli, M. & Conti, F. (2009) VGLUT1 and VGAT are sorted to the same population of synaptic vesicles in subsets of cortical axon terminals. *J Neurochem*, **110**, 1538-1546.
- Featherstone, D.E. & Shippy, S.A. (2008) Regulation of synaptic transmission by ambient extracellular glutamate. *Neuroscientist*, **14**, 171-181.
- Fenster, S.D., Chung, W.J., Zhai, R., Cases-Langhoff, C., Voss, B., Garner, A.M., Kaempfer, U., Kindler, S., Gundelfinger, E.D. & Garner, C.C. (2000) Piccolo, a presynaptic zinc finger protein structurally related to bassoon. *Neuron*, **25**, 203-214.
- Fernandez-Alfonso, T. & Ryan, T.A. (2008) A heterogeneous "resting" pool of synaptic vesicles that is dynamically interchanged across boutons in mammalian CNS synapses. *Brain Cell Biol*, **36**, 87-100.
- Fernandez-Chacon, R., Konigstorfer, A., Gerber, S.H., Garcia, J., Matos, M.F., Stevens, C.F., Brose, N., Rizo, J., Rosenmund, C. & Sudhof, T.C. (2001) Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature*, **410**, 41-49.
- Ferraguti, F. & Shigemoto, R. (2006) Metabotropic glutamate receptors. *Cell Tissue Res*, **326**, 483-504.
- Fettiplace, R. & Kim, K.X. (2014) The physiology of mechano-electrical transduction channels in hearing. *Physiol Rev*, **94**, 951-986.
- Filho, J.C., Hazel, S.J., Anderstam, B., Bergstrom, J., Lewitt, M. & Hall, K. (1999) Effect of protein intake on plasma and erythrocyte free amino acids and serum IGF-I and IGF-BP-1 levels in rats. *Am J Physiol*, **277**, E693-701.
- Fisher-Lavie, A. & Ziv, N.E. (2013) Matching dynamics of presynaptic and postsynaptic scaffolds. *J Neurosci*, **33**, 13094-13100.
- Fon, E.A., Pothos, E.N., Sun, B.C., Killeen, N., Sulzer, D. & Edwards, R.H. (1997) Vesicular transport regulates monoamine storage and release but is not essential for amphetamine action. *Neuron*, **19**, 1271-1283.
- Fonnum, F. (1984) Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem*, **42**, 1-11.
- Fonnum, F., Fykse, E.M. & Roseth, S. (1998) Uptake of glutamate into synaptic vesicles. *Prog Brain Res*, **116**, 87-101.
- Formstecher, E., Aresta, S., Collura, V., Hamburger, A., Meil, A., Trehin, A., Reverdy, C., Betin, V., Maire, S., Brun, C., Jacq, B., Arpin, M., Bellaiche, Y., Bellusci, S.,

- Benaroch, P., Bornens, M., Chanet, R., Chavrier, P., Delattre, O., Doye, V., Fehon, R., Faye, G., Galli, T., Girault, J.A., Goud, B., de Gunzburg, J., Johannes, L., Junier, M.P., Mirouse, V., Mukherjee, A., Papadopoulo, D., Perez, F., Plessis, A., Rosse, C., Saule, S., Stoppa-Lyonnet, D., Vincent, A., White, M., Legrain, P., Wojcik, J., Camonis, J. & Daviet, L. (2005) Protein interaction mapping: a *Drosophila* case study. *Genome Res*, **15**, 376-384.
- Fowler, M.W. & Staras, K. (2015) Synaptic vesicle pools: Principles, properties and limitations. *Exp Cell Res*, **335**, 150-156.
- Frank, T., Rutherford, M.A., Strenzke, N., Neef, A., Pangrsic, T., Khimich, D., Fejtova, A., Gundelfinger, E.D., Liberman, M.C., Harke, B., Bryan, K.E., Lee, A., Egner, A., Riedel, D. & Moser, T. (2010) Bassoon and the synaptic ribbon organize Ca²⁺ channels and vesicles to add release sites and promote refilling. *Neuron*, **68**, 724-738.
- Fredj, N.B. & Burrone, J. (2009) A resting pool of vesicles is responsible for spontaneous vesicle fusion at the synapse. *Nat Neurosci*, **12**, 751-758.
- Freneau, R.T., Jr., Burman, J., Qureshi, T., Tran, C.H., Proctor, J., Johnson, J., Zhang, H., Sulzer, D., Copenhagen, D.R., Storm-Mathisen, J., Reimer, R.J., Chaudhry, F.A. & Edwards, R.H. (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., Kam, K., Qureshi, T., Johnson, J., Copenhagen, D.R., Storm-Mathisen, J., Chaudhry, F.A., Nicoll, R.A. & Edwards, R.H. (2004) Vesicular glutamate transporters 1 and 2 target to functionally distinct synaptic release sites. *Science*, **304**, 1815-1819.
- Freneau, R.T., Jr., Troyer, M.D., Pahner, I., Nygaard, G.O., Tran, C.H., Reimer, R.J., Bellocchio, E.E., Fortin, D., Storm-Mathisen, J. & Edwards, R.H. (2001) The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron*, **31**, 247-260.
- Frigerio, F., Casimir, M., Carobbio, S. & Maechler, P. (2008) Tissue specificity of mitochondrial glutamate pathways and the control of metabolic homeostasis. *Biochim Biophys Acta*, **1777**, 965-972.
- Fromont-Racine, M., Rain, J.C. & Legrain, P. (1997) Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nat Genet*, **16**, 277-282.
- Froud, K.E., Wong, A.C., Cederholm, J.M., Klugmann, M., Sandow, S.L., Julien, J.P., Ryan, A.F. & Housley, G.D. (2015) Type II spiral ganglion afferent neurons drive medial olivocochlear reflex suppression of the cochlear amplifier. *Nat Commun*, **6**, 7115.
- Fujikawa, T., Petralia, R.S., Fitzgerald, T.S., Wang, Y.X., Millis, B., Morgado-Diaz, J.A., Kitamura, K. & Kachar, B. (2014) Localization of kainate receptors in inner and outer hair cell synapses. *Hear Res*, **314**, 20-32.
- Furness, D.N. & Lawton, D.M. (2003) Comparative distribution of glutamate transporters and receptors in relation to afferent innervation density in the mammalian cochlea. *J Neurosci*, **23**, 11296-11304.

Furuta, A., Martin, L.J., Lin, C.L., Dykes-Hoberg, M. & Rothstein, J.D. (1997) Cellular and synaptic localization of the neuronal glutamate transporters excitatory amino acid transporter 3 and 4. *Neuroscience*, **81**, 1031-1042.

Fyk-Kolodziej, B., Shimano, T., Gong, T.W. & Holt, A.G. (2011) Vesicular glutamate transporters: spatio-temporal plasticity following hearing loss. *Neuroscience*, **178**, 218-239.

G

Gagnon, D. & Parent, M. (2014) Distribution of VGLUT3 in highly collateralized axons from the rat dorsal raphe nucleus as revealed by single-neuron reconstructions. *PLoS One*, **9**, e87709.

Ganong, A.H., Lanthorn, T.H. & Cotman, C.W. (1983) Kynurenic acid inhibits synaptic and acidic amino acid-induced responses in the rat hippocampus and spinal cord. *Brain Res*, **273**, 170-174.

Gasnier, B. (2000) The loading of neurotransmitters into synaptic vesicles. *Biochimie*, **82**, 327-337.

Gaspar, P., Cases, O. & Maroteaux, L. (2003) The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat Rev Neurosci*, **4**, 1002-1012.

Gegelashvili, G. & Schousboe, A. (1997) High affinity glutamate transporters: regulation of expression and activity. *Mol Pharmacol*, **52**, 6-15.

Gegelashvili, G. & Schousboe, A. (1998) Cellular distribution and kinetic properties of high-affinity glutamate transporters. *Brain Res Bull*, **45**, 233-238.

Gelsomino, G., Menna, E., Antonucci, F., Rodighiero, S., Riganti, L., Mulle, C., Benfenati, F., Valtorta, F., Verderio, C. & Matteoli, M. (2013) Kainate induces mobilization of synaptic vesicles at the growth cone through the activation of protein kinase A. *Cereb Cortex*, **23**, 531-541.

Gil-Loyzaga, P. & Pujol, R. (1988) Synaptophysin in the developing cochlea. *Int J Dev Neurosci*, **6**, 155-160.

Gillespie, D.C., Kim, G. & Kandler, K. (2005) Inhibitory synapses in the developing auditory system are glutamatergic. *Nat Neurosci*, **8**, 332-338.

Gleason, K.K., Dondeti, V.R., Hsia, H.L., Cochran, E.R., Gumulak-Smith, J. & Saha, M.S. (2003) The vesicular glutamate transporter 1 (xVGlut1) is expressed in discrete regions of the developing *Xenopus laevis* nervous system. *Gene Expr Patterns*, **3**, 503-507.

Glowatzki, E., Cheng, N., Hiel, H., Yi, E., Tanaka, K., Ellis-Davies, G.C., Rothstein, J.D. & Bergles, D.E. (2006) The glutamate-aspartate transporter GLAST mediates glutamate uptake at inner hair cell afferent synapses in the mammalian cochlea. *J Neurosci*, **26**, 7659-7664.

Glowatzki, E. & Fuchs, P.A. (2002) Transmitter release at the hair cell ribbon synapse. *Nat Neurosci*, **5**, 147-154.

- Goldstein, A.Y., Wang, X. & Schwarz, T.L. (2008) Axonal transport and the delivery of pre-synaptic components. *Curr Opin Neurobiol*, **18**, 495-503.
- Gong, J., Jellali, A., Mutterer, J., Sahel, J.A., Rendon, A. & Picaud, S. (2006) Distribution of vesicular glutamate transporters in rat and human retina. *Brain Res*, **1082**, 73-85.
- Granseth, B., Odermatt, B., Royle, S.J. & Lagnado, L. (2006) Clathrin-mediated endocytosis is the dominant mechanism of vesicle retrieval at hippocampal synapses. *Neuron*, **51**, 773-786.
- Gras, C., Amilhon, B., Lepicard, E.M., Poirel, O., Vinatier, J., Herbin, M., Dumas, S., Tzavara, E.T., Wade, M.R., Nomikos, G.G., Hanoun, N., Saurini, F., Kemel, M.L., Gasnier, B., Giros, B. & Mestikawy, S.E. (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. & El Mestikawy, S. (2002) A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J Neurosci*, **22**, 5442-5451.
- Gray, E.G. (1959) Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. *J Anat*, **93**, 420-433.
- Gray, E.G. (1969) Electron microscopy of excitatory and inhibitory synapses: a brief review. *Prog Brain Res*, **31**, 141-155.
- Gregory, F.D., Bryan, K.E., Pangrsic, T., Calin-Jageman, I.E., Moser, T. & Lee, A. (2011) Harmonin inhibits presynaptic Cav1.3 Ca²⁺(+) channels in mouse inner hair cells. *Nat Neurosci*, **14**, 1109-1111.
- Grigoriev, I., Splinter, D., Keijzer, N., Wulf, P.S., Demmers, J., Ohtsuka, T., Modesti, M., Maly, I.V., Grosveld, F., Hoogenraad, C.C. & Akhmanova, A. (2007) Rab6 regulates transport and targeting of exocytotic carriers. *Dev Cell*, **13**, 305-314.
- Grillet, N., Xiong, W., Reynolds, A., Kazmierczak, P., Sato, T., Lillo, C., Dumont, R.A., Hintermann, E., Sczaniecka, A., Schwander, M., Williams, D., Kachar, B., Gillespie, P.G. & Muller, U. (2009) Harmonin mutations cause mechanotransduction defects in cochlear hair cells. *Neuron*, **62**, 375-387.
- Grimes, W.N., Seal, R.P., Oesch, N., Edwards, R.H. & Diamond, J.S. (2011) Genetic targeting and physiological features of VGLUT3⁺ amacrine cells. *Vis Neurosci*, **28**, 381-392.
- Groemer, T.W. & Klingauf, J. (2007) Synaptic vesicles recycling spontaneously and during activity belong to the same vesicle pool. *Nat Neurosci*, **10**, 145-147.
- Gundelfinger, E.D. & Fejtova, A. (2012) Molecular organization and plasticity of the cytomatrix at the active zone. *Curr Opin Neurobiol*, **22**, 423-430.

H

- Hackett, J.T. & Ueda, T. (2015) Glutamate Release. *Neurochem Res*.
- Hallermann, S. & Silver, R.A. (2013) Sustaining rapid vesicular release at active zones: potential roles for vesicle tethering. *Trends Neurosci*, **36**, 185-194.

- Harata, N.C., Choi, S., Pyle, J.L., Aravanis, A.M. & Tsien, R.W. (2006) Frequency-dependent kinetics and prevalence of kiss-and-run and reuse at hippocampal synapses studied with novel quenching methods. *Neuron*, **49**, 243-256.
- Harkany, T., Holmgren, C., Hartig, W., Qureshi, T., Chaudhry, F.A., Storm-Mathisen, J., Dobszay, M.B., Berghuis, P., Schulte, G., Sousa, K.M., Fremeau, R.T., Jr., Edwards, R.H., Mackie, K., Ernfors, P. & Zilberter, Y. (2004) Endocannabinoid-independent retrograde signaling at inhibitory synapses in layer 2/3 of neocortex: involvement of vesicular glutamate transporter 3. *J Neurosci*, **24**, 4978-4988.
- Haverkamp, S. & Wassle, H. (2004) Characterization of an amacrine cell type of the mammalian retina immunoreactive for vesicular glutamate transporter 3. *J Comp Neurol*, **468**, 251-263.
- Hayashi, M., Morimoto, R., Yamamoto, A. & Moriyama, Y. (2003) Expression and localization of vesicular glutamate transporters in pancreatic islets, upper gastrointestinal tract, and testis. *J Histochem Cytochem*, **51**, 1375-1390.
- Hayashi, T. (1954) Effects of sodium glutamate on the nervous system. *Keio J. Med*, **3**, 183-192.
- Hediger, M.A., Clemençon, B., Burrier, R.E. & Bruford, E.A. (2013) The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): introduction. *Mol Aspects Med*, **34**, 95-107.
- Heine, M., Groc, L., Frischknecht, R., Beique, J.C., Lounis, B., Rumbaugh, G., Huganir, R.L., Cognet, L. & Choquet, D. (2008) Surface mobility of postsynaptic AMPARs tunes synaptic transmission. *Science*, **320**, 201-205.
- Hell, S.W. & Wichmann, J. (1994) Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt Lett*, **19**, 780-782.
- Henriksson, J. (1991) Effect of exercise on amino acid concentrations in skeletal muscle and plasma. *J Exp Biol*, **160**, 149-165.
- Herman, M.A., Ackermann, F., Trimbuch, T. & Rosenmund, C. (2014) Vesicular glutamate transporter expression level affects synaptic vesicle release probability at hippocampal synapses in culture. *J Neurosci*, **34**, 11781-11791.
- Herring, B.E., Silm, K., Edwards, R.H. & Nicoll, R.A. (2015) Is Aspartate an Excitatory Neurotransmitter? *J Neurosci*, **35**, 10168-10171.
- Herzog, E., Bellenchi, G.C., Gras, C., Bernard, V., Ravassard, P., Bedet, C., Gasnier, B., Giros, B. & 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. & 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., Bouali-Benazzouz, R., Legay, C., Henderson, C.E., Nagy, F., Dreyfus, P., Giros, B. & El Mestikawy, S. (2004b) Expression of vesicular

- glutamate transporters, VGLUT1 and VGLUT2, in cholinergic spinal motoneurons. *Eur J Neurosci*, **20**, 1752-1760.
- Herzog, E., Nadrigny, F., Silm, K., Biesemann, C., Helling, I., Bersot, T., Steffens, H., Schwartzmann, R., Nagerl, U.V., El Mestikawy, S., Rhee, J., Kirchhoff, F. & Brose, N. (2011) In vivo imaging of intersynaptic vesicle exchange using VGLUT1 Venus knock-in mice. *J Neurosci*, **31**, 15544-15559.
- Higashijima, S., Mandel, G. & Fetcho, J.R. (2004a) Distribution of prospective glutamatergic, glycinergic, and GABAergic neurons in embryonic and larval zebrafish. *J Comp Neurol*, **480**, 1-18.
- Higashijima, S., Schaefer, M. & Fetcho, J.R. (2004b) Neurotransmitter properties of spinal interneurons in embryonic and larval zebrafish. *J Comp Neurol*, **480**, 19-37.
- Higley, M.J., Gittis, A.H., Oldenburg, I.A., Balthasar, N., Seal, R.P., Edwards, R.H., Lowell, B.B., Kreitzer, A.C. & Sabatini, B.L. (2011) Cholinergic interneurons mediate fast VGLUT3-dependent glutamatergic transmission in the striatum. *PLoS One*, **6**, e19155.
- Higley, M.J., Soler-Llavina, G.J. & Sabatini, B.L. (2009) Cholinergic modulation of multivesicular release regulates striatal synaptic potency and integration. *Nat Neurosci*, **12**, 1121-1128.
- Hinoi, E., Fujimori, S., Takarada, T., Taniura, H. & Yoneda, Y. (2002) Facilitation of glutamate release by ionotropic glutamate receptors in osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, **297**, 452-458.
- Hioki, H., Fujiyama, F., Nakamura, K., Wu, S.X., Matsuda, W. & 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.
- Hioki, H., Nakamura, H., Ma, Y.F., Konno, M., Hayakawa, T., Nakamura, K.C., Fujiyama, F. & Kaneko, T. (2010) Vesicular glutamate transporter 3-expressing nonserotonergic projection neurons constitute a subregion in the rat midbrain raphe nuclei. *J Comp Neurol*, **518**, 668-686.
- Hirokawa, N. & Noda, Y. (2008) Intracellular transport and kinesin superfamily proteins, KIFs: structure, function, and dynamics. *Physiol Rev*, **88**, 1089-1118.
- Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y. & Niwa, S. (2009) Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **10**, 682-696.
- Hnasko, T.S., Chuhma, N., Zhang, H., Goh, G.Y., Sulzer, D., Palmiter, R.D., Rayport, S. & Edwards, R.H. (2010) Vesicular Glutamate Transport Promotes Dopamine Storage and Glutamate Corelease In Vivo. *Neuron*, **65**, 643-656.
- Hochstrasser, M. (1992) Ubiquitin and intracellular protein degradation. *Curr Opin Cell Biol*, **4**, 1024-1031.
- Hruska, M. & Dalva, M.B. (2012) Ephrin regulation of synapse formation, function and plasticity. *Mol Cell Neurosci*, **50**, 35-44.

Hua, Y., Sinha, R., Martineau, M., Kahms, M. & Klingauf, J. (2010) A common origin of synaptic vesicles undergoing evoked and spontaneous fusion. *Nat Neurosci*, **13**, 1451-1453.

Hua, Y., Sinha, R., Thiel, C.S., Schmidt, R., Huve, J., Martens, H., Hell, S.W., Egner, A. & Klingauf, J. (2011a) A readily retrievable pool of synaptic vesicles. *Nat Neurosci*, **14**, 833-839.

Hua, Z., Leal-Ortiz, S., Foss, S.M., Waites, C.L., Garner, C.C., Voglmaier, S.M. & Edwards, R.H. (2011b) v-SNARE composition distinguishes synaptic vesicle pools. *Neuron*, **71**, 474-487.

Huang, L.C., Barclay, M., Lee, K., Peter, S., Housley, G.D., Thorne, P.R. & Montgomery, J.M. (2012) Synaptic profiles during neurite extension, refinement and retraction in the developing cochlea. *Neural Dev*, **7**, 38.

Huang, Y., Lemieux, M.J., Song, J., Auer, M. & Wang, D.N. (2003) Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli*. *Science*, **301**, 616-620.

I

Ikeda, K. & Bekkers, J.M. (2009) Counting the number of releasable synaptic vesicles in a presynaptic terminal. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 2945-2950.

J

Jackson, J., Bland, B.H. & Antle, M.C. (2009) Nonserotonergic projection neurons in the midbrain raphe nuclei contain the vesicular glutamate transporter VGLUT3. *Synapse*, **63**, 31-41.

Jahn, R. & Fasshauer, D. (2012) Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature*, **490**, 201-207.

Jahne, S., Rizzoli, S.O. & Helm, M.S. (2015) The structure and function of presynaptic endosomes. *Exp Cell Res*, **335**, 172-179.

Jakobs, T.C., Ben, Y. & Masland, R.H. (2007) Expression of mRNA for glutamate receptor subunits distinguishes the major classes of retinal neurons, but is less specific for individual cell types. *Mol Vis*, **13**, 933-948.

Johnson, J., Fremeau, R.T., Jr., Duncan, J.L., Renteria, R.C., Yang, H., Hua, Z., Liu, X., LaVail, M.M., Edwards, R.H. & Copenhagen, D.R. (2007) Vesicular glutamate transporter 1 is required for photoreceptor synaptic signaling but not for intrinsic visual functions. *J Neurosci*, **27**, 7245-7255.

Johnson, J., Sherry, D.M., Liu, X., Fremeau, R.T., Jr., Seal, R.P., Edwards, R.H. & Copenhagen, D.R. (2004) Vesicular glutamate transporter 3 expression identifies glutamatergic amacrine cells in the rodent retina. *J Comp Neurol*, **477**, 386-398.

Johnson, M.D. (1994) Synaptic glutamate release by postnatal rat serotonergic neurons in microculture. *Neuron*, **12**, 433-442.

- Juge, N., Gray, J.A., Omote, H., Miyaji, T., Inoue, T., Hara, C., Uneyama, H., Edwards, R.H., Nicoll, R.A. & Moriyama, Y. (2010) Metabolic control of vesicular glutamate transport and release. *Neuron*, **68**, 99-112.
- Juge, N., Muroyama, A., Hiasa, M., Omote, H. & Moriyama, Y. (2009) Vesicular inhibitory amino acid transporter is a Cl⁻/gamma-aminobutyrate Co-transporter. *J Biol Chem*, **284**, 35073-35078.
- Juge, N., Yoshida, Y., Yatsushiro, S., Omote, H. & Moriyama, Y. (2006) Vesicular glutamate transporter contains two independent transport machineries. *J Biol Chem*, **281**, 39499-39506.
- Jung, J., Loy, K., Schilling, E.M., Rother, M., Brauner, J.M., Huth, T., Schlotzer-Schrehardt, U., Alzheimer, C., Kornhuber, J., Welzel, O. & Groemer, T.W. (2014) The antidepressant fluoxetine mobilizes vesicles to the recycling pool of rat hippocampal synapses during high activity. *Mol Neurobiol*, **49**, 916-930.
- Jung, S., Oshima-Takago, T., Chakrabarti, R., Wong, A.B., Jing, Z., Yamanbaeva, G., Picher, M.M., Wojcik, S.M., Gottfert, F., Predoehl, F., Michel, K., Hell, S.W., Schoch, S., Strenzke, N., Wichmann, C. & Moser, T. (2015) Rab3-interacting molecules 2alpha and 2beta promote the abundance of voltage-gated CaV1.3 Ca²⁺ channels at hair cell active zones. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **112**, E3141-3149.
- Jung, T., Catalgol, B. & Grune, T. (2009) The proteasomal system. *Mol Aspects Med*, **30**, 191-296.

K

- Kanai, Y. & Hediger, M.A. (1992) Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature*, **360**, 467-471.
- Kanai, Y. & Hediger, M.A. (2004) The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects. *Pflugers Arch*, **447**, 469-479.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., and Jessell, T.M. (2000) Principles of Neural Science. Fourth Edition (New York: McGraw-Hill, Health Professions Division).
- Kaneko, T., Akiyama, H., Nagatsu, I. & Mizuno, N. (1990) Immunohistochemical demonstration of glutaminase in catecholaminergic and serotonergic neurons of rat brain. *Brain Res*, **507**, 151-154.
- Kaneko, T., Fujiyama, F. & Hioki, H. (2002) Immunohistochemical localization of candidates for vesicular glutamate transporters in the rat brain. *J Comp Neurol*, **444**, 39-62.
- Kardon, J.R. & Vale, R.D. (2009) Regulators of the cytoplasmic dynein motor. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **10**, 854-865.
- Kasprowicz, J., Kuenen, S., Swerts, J., Miskiewicz, K. & Verstreken, P. (2014) Dynamin photoinactivation blocks Clathrin and alpha-adaptin recruitment and induces bulk membrane retrieval. *J Cell Biol*, **204**, 1141-1156.
- Kavalali, E.T. (2015) The mechanisms and functions of spontaneous neurotransmitter release. *Nat Rev Neurosci*, **16**, 5-16.

- Kemp, J.M. & Powell, T.P. (1971) The structure of the caudate nucleus of the cat: light and electron microscopy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **262**, 383-401.
- Kew, J.N. & Kemp, J.A. (2005) Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl)*, **179**, 4-29.
- Khaitlina, S.Y. (2001) Functional specificity of actin isoforms. *Int Rev Cytol*, **202**, 35-98.
- Khimich, D., Nouvian, R., Pujol, R., Tom Dieck, S., Egner, A., Gundelfinger, E.D. & Moser, T. (2005) Hair cell synaptic ribbons are essential for synchronous auditory signalling. *Nature*, **434**, 889-894.
- Kiang, N.Y., Rho, J.M., Northrop, C.C., Liberman, M.C. & Ryugo, D.K. (1982) Hair-cell innervation by spiral ganglion cells in adult cats. *Science*, **217**, 175-177.
- Kiehn, O., Kjaerulff, O., Tresch, M.C. & Harris-Warrick, R.M. (2000) Contributions of intrinsic motor neuron properties to the production of rhythmic motor output in the mammalian spinal cord. *Brain Res Bull*, **53**, 649-659.
- Kim, S.H. & Ryan, T.A. (2009) Synaptic vesicle recycling at CNS synapses without AP-2. *J Neurosci*, **29**, 3865-3874.
- Kim, S.H. & Ryan, T.A. (2010) CDK5 serves as a major control point in neurotransmitter release. *Neuron*, **67**, 797-809.
- Kim, T., Soto, F. & Kerschensteiner, D. (2015) An excitatory amacrine cell detects object motion and provides feature-selective input to ganglion cells in the mouse retina. *Elife*, **4**.
- Knirsch, M., Brandt, N., Braig, C., Kuhn, S., Hirt, B., Munkner, S., Knipper, M. & Engel, J. (2007) Persistence of Ca(v)1.3 Ca²⁺ channels in mature outer hair cells supports outer hair cell afferent signaling. *J Neurosci*, **27**, 6442-6451.
- Kohr, G. (2006) NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution. *Cell Tissue Res*, **326**, 439-446.
- Kononenko, N.L., Puchkov, D., Classen, G.A., Walter, A.M., Pechstein, A., Sawade, L., Kaempfer, N., Trimbuch, T., Lorenz, D., Rosenmund, C., Maritzen, T. & Haucke, V. (2014) Clathrin/AP-2 mediate synaptic vesicle reformation from endosome-like vacuoles but are not essential for membrane retrieval at central synapses. *Neuron*, **82**, 981-988.
- Krebs, H.A. (1935) Metabolism of amino-acids: The synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissues. *Biochem J*, **29**, 1951-1969.
- Kruth, K.A. & Rubenstein, P.A. (2012) Two deafness-causing (DFNA20/26) actin mutations affect Arp2/3-dependent actin regulation. *J Biol Chem*, **287**, 27217-27226.
- Kudo, T., Uchigashima, M., Miyazaki, T., Konno, K., Yamasaki, M., Yanagawa, Y., Minami, M. & Watanabe, M. (2012) Three types of neurochemical projection from the bed nucleus of the stria terminalis to the ventral tegmental area in adult mice. *J Neurosci*, **32**, 18035-18046.

L

- Laake, J.H., Slyngstad, T.A., Haug, F.M. & Ottersen, O.P. (1995) Glutamine from glial cells is essential for the maintenance of the nerve terminal pool of glutamate: immunogold evidence from hippocampal slice cultures. *J Neurochem*, **65**, 871-881.
- Landry, M., Bouali-Benazzouz, R., El Mestikawy, S., Ravassard, P. & Nagy, F. (2004) Expression of vesicular glutamate transporters in rat lumbar spinal cord, with a note on dorsal root ganglia. *J Comp Neurol*, **468**, 380-394.
- Lanfumeey, L., Pardon, M.C., Laaris, N., Joubert, C., Hanoun, N., Hamon, M. & Cohen-Salmon, C. (1999) 5-HT_{1A} autoreceptor desensitization by chronic ultramild stress in mice. *Neuroreport*, **10**, 3369-3374.
- Lauri, S.E., Vesikansa, A., Segerstrale, M., Collingridge, G.L., Isaac, J.T. & Taira, T. (2006) Functional maturation of CA1 synapses involves activity-dependent loss of tonic kainate receptor-mediated inhibition of glutamate release. *Neuron*, **50**, 415-429.
- Lawal, H.O. & Krantz, D.E. (2013) SLC18: Vesicular neurotransmitter transporters for monoamines and acetylcholine. *Mol Aspects Med*, **34**, 360-372.
- Lee, R.Y., Sawin, E.R., Chalfie, M., Horvitz, H.R. & Avery, L. (1999) EAT-4, a homolog of a mammalian sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter, is necessary for glutamatergic neurotransmission in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci*, **19**, 159-167.
- Lee, S., Chen, L., Chen, M., Ye, M., Seal, R.P. & Zhou, Z.J. (2014) An unconventional glutamatergic circuit in the retina formed by vGluT3 amacrine cells. *Neuron*, **84**, 708-715.
- Lee, Y., Kim, H.R. & Ahn, S.C. (2015) Vesicular glutamate transporter 3 is strongly upregulated in cochlear inner hair cells and spiral ganglion cells of developing circling mice. *Neurosci Lett*, **584**, 320-324.
- Leo, S., Moechars, D., Callaerts-Vegh, Z., D'Hooge, R. & Meert, T. (2009) Impairment of VGLUT2 but not VGLUT1 signaling reduces neuropathy-induced hypersensitivity. *Eur J Pain*, **13**, 1008-1017.
- LePage, E.L. (1989) Functional role of the olivo-cochlear bundle: a motor unit control system in the mammalian cochlea. *Hear Res*, **38**, 177-198.
- Li, D., Herault, K., Silm, K., Evrard, A., Wojcik, S., Oheim, M., Herzog, E. & Ropert, N. (2013a) Lack of evidence for vesicular glutamate transporter expression in mouse astrocytes. *J Neurosci*, **33**, 4434-4455.
- Liao, X., Wang, W., Zeng, Z., Yang, Z., Dai, H. & Lei, Y. (2015) Association of alpha-ADD1 Gene and Hypertension Risk: A Meta-Analysis. *Med Sci Monit*, **21**, 1634-1641.
- Lieberman, L.D., Wang, H. & Liberman, M.C. (2011) Opposing gradients of ribbon size and AMPA receptor expression underlie sensitivity differences among cochlear-nerve/hair-cell synapses. *J Neurosci*, **31**, 801-808.
- Lieberman, M.C. (1982) Single-neuron labeling in the cat auditory nerve. *Science*, **216**, 1239-1241.

- Liberman, M.C. & Brown, M.C. (1986) Physiology and anatomy of single olivocochlear neurons in the cat. *Hear Res*, **24**, 17-36.
- Liguz-Leczna, M. & Skangiel-Kramska, J. (2007) Vesicular glutamate transporters (VGLUTs): the three musketeers of glutamatergic system. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, **67**, 207-218.
- Logan, W.J. & Snyder, S.H. (1972) High affinity uptake systems for glycine, glutamic and aspartic acids in synaptosomes of rat central nervous tissues. *Brain Res*, **42**, 413-431.
- Lu, S.M., Schweitzer, L., Cant, N.B. & Dawbarn, D. (1987) Immunoreactivity to calcitonin gene-related peptide in the superior olivary complex and cochlea of cat and rat. *Hear Res*, **31**, 137-146.
- Lucas, J.S., Adam, E.C., Goggin, P.M., Jackson, C.L., Powles-Glover, N., Patel, S.H., Humphreys, J., Fray, M.D., Falconnet, E., Blouin, J.L., Cheeseman, M.T., Bartoloni, L., Norris, D.P. & Lackie, P.M. (2012) Static respiratory cilia associated with mutations in Dnahc11/DNAH11: a mouse model of PCD. *Hum Mutat*, **33**, 495-503.
- Luscher, C. & Malenka, R.C. (2012) NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **4**.

M

- Ma, C., Li, W., Xu, Y. & Rizo, J. (2011) Munc13 mediates the transition from the closed syntaxin-Munc18 complex to the SNARE complex. *Nat Struct Mol Biol*, **18**, 542-549.
- MacNeil, M.A. & Masland, R.H. (1998) Extreme diversity among amacrine cells: implications for function. *Neuron*, **20**, 971-982.
- Maechler, P. & Wollheim, C.B. (1999) Mitochondrial glutamate acts as a messenger in glucose-induced insulin exocytosis. *Nature*, **402**, 685-689.
- Magupalli, V.G., Schwarz, K., Alpadi, K., Natarajan, S., Seigel, G.M. & Schmitz, F. (2008) Multiple RIBEYE-RIBEYE interactions create a dynamic scaffold for the formation of synaptic ribbons. *J Neurosci*, **28**, 7954-7967.
- Maison, S.F., Casanova, E., Holstein, G.R., Bettler, B. & Liberman, M.C. (2009) Loss of GABAB receptors in cochlear neurons: threshold elevation suggests modulation of outer hair cell function by type II afferent fibers. *J Assoc Res Otolaryngol*, **10**, 50-63.
- Maison, S.F., Luebke, A.E., Liberman, M.C. & Zuo, J. (2002) Efferent protection from acoustic injury is mediated via alpha9 nicotinic acetylcholine receptors on outer hair cells. *J Neurosci*, **22**, 10838-10846.
- Maison, S.F., Rosahl, T.W., Homanics, G.E. & Liberman, M.C. (2006) Functional role of GABAergic innervation of the cochlea: phenotypic analysis of mice lacking GABA(A) receptor subunits alpha 1, alpha 2, alpha 5, alpha 6, beta 2, beta 3, or delta. *J Neurosci*, **26**, 10315-10326.
- Marc, R.E. & Liu, W. (2000) Fundamental GABAergic amacrine cell circuitries in the retina: nested feedback, concatenated inhibition, and axosomatic synapses. *J Comp Neurol*, **425**, 560-582.

- Marra, V., Burden, J.J., Thorpe, J.R., Smith, I.T., Smith, S.L., Hausser, M., Branco, T. & Staras, K. (2012) A preferentially segregated recycling vesicle pool of limited size supports neurotransmission in native central synapses. *Neuron*, **76**, 579-589.
- Martens, S., Kozlov, M.M. & McMahon, H.T. (2007) How synaptotagmin promotes membrane fusion. *Science*, **316**, 1205-1208.
- Martin, D.M. & Raphael, Y. (2012) Have you heard? Viral-mediated gene therapy restores hearing. *Neuron*, **75**, 188-190.
- Masland, R.H. (2012) The neuronal organization of the retina. *Neuron*, **76**, 266-280.
- Matanis, T., Akhmanova, A., Wulf, P., Del Nery, E., Weide, T., Stepanova, T., Galjart, N., Grosveld, F., Goud, B., De Zeeuw, C.I., Barnekow, A. & Hoogenraad, C.C. (2002) Bicaudal-D regulates COPI-independent Golgi-ER transport by recruiting the dynein-dynactin motor complex. *Nat Cell Biol*, **4**, 986-992.
- Matsubara, A., Laake, J.H., Davanger, S., Usami, S. & Ottersen, O.P. (1996) Organization of AMPA receptor subunits at a glutamate synapse: a quantitative immunogold analysis of hair cell synapses in the rat organ of Corti. *J Neurosci*, **16**, 4457-4467.
- Maycox, P.R., Deckwerth, T., Hell, J.W. & 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., Link, E., Reetz, A., Morris, S.A. & Jahn, R. (1992) Clathrin-coated vesicles in nervous tissue are involved primarily in synaptic vesicle recycling. *J Cell Biol*, **118**, 1379-1388.
- McIntire, S.L., Reimer, R.J., Schuske, K., Edwards, R.H. & Jorgensen, E.M. (1997) Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature*, **389**, 870-876.
- McMahon, H.T. & Boucrot, E. (2011) Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **12**, 517-533.
- Meister, A., Griffith, O.W., Novogrodsky, A. & Tate, S.S. (1979) New aspects of glutathione metabolism and translocation in mammals. *Ciba Found Symp*, 135-161.
- Meldrum, B. & Garthwaite, J. (1990) Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol Sci*, **11**, 379-387.
- Mendez, J.A., Bourque, M.J., Dal Bo, G., Bourdeau, M.L., Danik, M., Williams, S., Lacaille, J.C. & Trudeau, L.E. (2008) Developmental and target-dependent regulation of vesicular glutamate transporter expression by dopamine neurons. *J Neurosci*, **28**, 6309-6318.
- Meyer, A.C., Frank, T., Khimich, D., Hoch, G., Riedel, D., Chapochnikov, N.M., Yarin, Y.M., Harke, B., Hell, S.W., Egner, A. & Moser, T. (2009) Tuning of synapse number, structure and function in the cochlea. *Nat Neurosci*, **12**, 444-453.
- Michalski, N., Michel, V., Caberlotto, E., Lefevre, G.M., van Aken, A.F., Tinevez, J.Y., Bizard, E., Houbron, C., Weil, D., Hardelin, J.P., Richardson, G.P., Kros, C.J., Martin, P. & Petit, C. (2009) Harmonin-b, an actin-binding scaffold protein, is involved in the

- adaptation of mechano-electrical transduction by sensory hair cells. *Pflugers Arch*, **459**, 115-130.
- Michelsen, K.A., Schmitz, C. & Steinbusch, H.W. (2007) The dorsal raphe nucleus--from silver stainings to a role in depression. *Brain Res Rev*, **55**, 329-342.
- Millan, M.J. (1999) The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*, **57**, 1-164.
- Mimura, Y., Mogi, K., Kawano, M., Fukui, Y., Takeda, J., Nogami, H. & Hisano, S. (2002) Differential expression of two distinct vesicular glutamate transporters in the rat retina. *Neuroreport*, **13**, 1925-1928.
- Mintz, E.M. & Scott, T.J. (2006) Colocalization of serotonin and vesicular glutamate transporter 3-like immunoreactivity in the midbrain raphe of Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Neurosci Lett*, **394**, 97-100.
- Miot, S., Voituren, N., Sterlin, A., Vigneault, E., Morel, L., Matrot, B., Ramanantsoa, N., Amilhon, B., Poirel, O., Lepicard, E., Mestikawy, S.E., Hilaire, G. & Gallego, J. (2012) The vesicular glutamate transporter VGLUT3 contributes to protection against neonatal hypoxic stress. *J Physiol*, **590**, 5183-5198.
- Miyaji, T., Echigo, N., Hiasa, M., Senoh, S., Omote, H. & Moriyama, Y. (2008) Identification of a vesicular aspartate transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 11720-11724.
- Miyaji, T., Omote, H. & Moriyama, Y. (2011) Functional characterization of vesicular excitatory amino acid transport by human sialin. *J Neurochem*, **119**, 1-5.
- Miyazaki, T., Fukaya, M., Shimizu, H. & Watanabe, M. (2003) Subtype switching of vesicular glutamate transporters at parallel fibre-Purkinje cell synapses in developing mouse cerebellum. *Eur J Neurosci*, **17**, 2563-2572.
- Moechars, D., Weston, M.C., Leo, S., Callaerts-Vegh, Z., Goris, I., Daneels, G., Buist, A., Cik, M., van der Spek, P., Kass, S., Meert, T., D'Hooge, R., Rosenmund, C. & Hampson, R.M. (2006) Vesicular glutamate transporter VGLUT2 expression levels control quantal size and neuropathic pain. *J Neurosci*, **26**, 12055-12066.
- Molliver, M.E. (1987) Serotonergic neuronal systems: what their anatomic organization tells us about function. *J Clin Psychopharmacol*, **7**, 3S-23S.
- Monroe, J.D., Rajadinakaran, G. & Smith, M.E. (2015) Sensory hair cell death and regeneration in fishes. *Front Cell Neurosci*, **9**, 131.
- Montana, V., Ni, Y., Sunjara, V., Hua, X. & Parpura, V. (2004) Vesicular glutamate transporter-dependent glutamate release from astrocytes. *J Neurosci*, **24**, 2633-2642.
- Morimoto, R., Uehara, S., Yatsushiro, S., Juge, N., Hua, Z., Senoh, S., Echigo, N., Hayashi, M., Mizoguchi, T., Ninomiya, T., Udagawa, N., Omote, H., Yamamoto, A., Edwards, R.H. & Moriyama, Y. (2006) Secretion of L-glutamate from osteoclasts through transcytosis. *EMBO J*, **25**, 4175-4186.
- Morin, M., Bryan, K.E., Mayo-Merino, F., Goodyear, R., Mencia, A., Modamio-Hoybjor, S., del Castillo, I., Cabalka, J.M., Richardson, G., Moreno, F., Rubenstein, P.A. & Moreno-Pelayo, M.A. (2009) In vivo and in vitro effects of two novel gamma-actin (ACTG1) mutations that cause DFNA20/26 hearing impairment. *Hum Mol Genet*, **18**, 3075-3089.

- Moriyama, Y., Hayashi, M., Yamada, H., Yatsushiro, S., Ishio, S. & Yamamoto, A. (2000) Synaptic-like microvesicles, synaptic vesicle counterparts in endocrine cells, are involved in a novel regulatory mechanism for the synthesis and secretion of hormones. *J Exp Biol*, **203**, 117-125.
- Moser, T. & Beutner, D. (2000) Kinetics of exocytosis and endocytosis at the cochlear inner hair cell afferent synapse of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 883-888.
- Mosinger, J.L., Yazulla, S. & Studholme, K.M. (1986) GABA-like immunoreactivity in the vertebrate retina: a species comparison. *Exp Eye Res*, **42**, 631-644.
- Muller, M., Liu, K.S., Sigrist, S.J. & Davis, G.W. (2012) RIM controls homeostatic plasticity through modulation of the readily-releasable vesicle pool. *J Neurosci*, **32**, 16574-16585.
- Mutch, S.A., Kensel-Hammes, P., Gadd, J.C., Fujimoto, B.S., Allen, R.W., Schiro, P.G., Lorenz, R.M., Kuyper, C.L., Kuo, J.S., Bajjalieh, S.M. & Chiu, D.T. (2011) Protein quantification at the single vesicle level reveals that a subset of synaptic vesicle proteins are trafficked with high precision. *J Neurosci*, **31**, 1461-1470.

N

- Naito, S. & Ueda, T. (1985) Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles. *J Neurochem*, **44**, 99-109.
- Nakamura, K., Matsumura, K., Hubschle, T., Nakamura, Y., Hioki, H., Fujiyama, F., Boldogkoi, Z., Konig, M., Thiel, H.J., Gerstberger, R., Kobayashi, S. & Kaneko, T. (2004) Identification of sympathetic premotor neurons in medullary raphe regions mediating fever and other thermoregulatory functions. *J Neurosci*, **24**, 5370-5380.
- Nakanishi, S. (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science*, **258**, 597-603.
- Nelson, A.B., Bussert, T.G., Kreitzer, A.C. & Seal, R.P. (2014a) Striatal cholinergic neurotransmission requires VGLUT3. *J Neurosci*, **34**, 8772-8777.
- Nelson, A.B., Hammack, N., Yang, C.F., Shah, N.M., Seal, R.P. & Kreitzer, A.C. (2014b) Striatal cholinergic interneurons Drive GABA release from dopamine terminals. *Neuron*, **82**, 63-70.
- Ng, E.L. & Tang, B.L. (2008) Rab GTPases and their roles in brain neurons and glia. *Brain Res Rev*, **58**, 236-246.
- Ni, B., Rosteck, P.R., Jr., Nadi, N.S. & 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, Y. & Parpura, V. (2009) Dual regulation of Ca²⁺-dependent glutamate release from astrocytes: vesicular glutamate transporters and cytosolic glutamate levels. *Glia*, **57**, 1296-1305.
- Nickerson Poulin, A., Guerci, A., El Mestikawy, S. & 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.

- Nicoletti, F., Bockaert, J., Collingridge, G.L., Conn, P.J., Ferraguti, F., Schoepp, D.D., Wroblewski, J.T. & Pin, J.P. (2011) Metabotropic glutamate receptors: from the workbench to the bedside. *Neuropharmacology*, **60**, 1017-1041.
- Niedzielski, A.S. & Wenthold, R.J. (1995) Expression of AMPA, kainate, and NMDA receptor subunits in cochlear and vestibular ganglia. *J Neurosci*, **15**, 2338-2353.
- Nishida, K., Nomura, Y., Kawamori, K., Moriyama, Y. & Nagasawa, K. (2014) Expression profile of vesicular nucleotide transporter (VNUT, SLC17A9) in subpopulations of rat dorsal root ganglion neurons. *Neurosci Lett*, **579**, 75-79.
- Nishimaru, H., Restrepo, C.E., Ryge, J., Yanagawa, Y. & Kiehn, O. (2005) Mammalian motor neurons corelease glutamate and acetylcholine at central synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 5245-5249.
- Nishio, S.Y. & Usami, S. (2015) Deafness gene variations in a 1120 nonsyndromic hearing loss cohort: molecular epidemiology and deafness mutation spectrum of patients in Japan. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, **124 Suppl 1**, 49S-60S.
- Noh, J., Seal, R.P., Garver, J.A., Edwards, R.H. & Kandler, K. (2010) Glutamate co-release at GABA/glycinergic synapses is crucial for the refinement of an inhibitory map. *Nat Neurosci*, **13**, 232-238.
- Nouvian, R., Beutner, D., Parsons, T.D. & Moser, T. (2006) Structure and function of the hair cell ribbon synapse. *J Membr Biol*, **209**, 153-165.
- Nouvian, R., Neef, J., Bulankina, A.V., Reisinger, E., Pangrsic, T., Frank, T., Sikorra, S., Brose, N., Binz, T. & Moser, T. (2011) Exocytosis at the hair cell ribbon synapse apparently operates without neuronal SNARE proteins. *Nat Neurosci*, **14**, 411-413.

O

- Obholzer, N., Wolfson, S., Trapani, J.G., Mo, W., Nechiporuk, A., Busch-Nentwich, E., Seiler, C., Sidi, S., Sollner, C., Duncan, R.N., Boehland, A. & Nicolson, T. (2008) Vesicular glutamate transporter 3 is required for synaptic transmission in zebrafish hair cells. *J Neurosci*, **28**, 2110-2118.
- Oender, K., Niedermayr, P., Hintner, H., Richter, K., Koller, L., Trost, A., Bauer, J.W. & Hundsberger, H. (2006) Relative quantitation of protein-protein interaction strength within the yeast two-hybrid system via fluorescence beta-galactosidase activity detection in a high-throughput and low-cost manner. *Assay Drug Dev Technol*, **4**, 709-719.
- Okada, Y., Yamazaki, H., Sekine-Aizawa, Y. & Hirokawa, N. (1995) The neuron-specific kinesin superfamily protein KIF1A is a unique monomeric motor for anterograde axonal transport of synaptic vesicle precursors. *Cell*, **81**, 769-780.
- Oliveira, A.L., Hydling, F., Olsson, E., Shi, T., Edwards, R.H., Fujiyama, F., Kaneko, T., Hokfelt, T., Cullheim, S. & Meister, B. (2003) Cellular localization of three vesicular glutamate transporter mRNAs and proteins in rat spinal cord and dorsal root ganglia. *Synapse*, **50**, 117-129.
- Olney, J.W. (1969) Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*, **164**, 719-721.

- Omiya, Y., Uchigashima, M., Konno, K., Yamasaki, M., Miyazaki, T., Yoshida, T., Kusumi, I. & Watanabe, M. (2015) VGluT3-expressing CCK-positive basket cells construct invaginating synapses enriched with endocannabinoid signaling proteins in particular cortical and cortex-like amygdaloid regions of mouse brains. *J Neurosci*, **35**, 4215-4228.
- Omote, H., Miyaji, T., Juge, N. & Moriyama, Y. (2011) Vesicular neurotransmitter transporter: bioenergetics and regulation of glutamate transport. *Biochemistry*, **50**, 5558-5565.
- Orenbuch, A., Shalev, L., Marra, V., Sinai, I., Lavy, Y., Kahn, J., Burden, J.J., Staras, K. & Gitler, D. (2012) Synapsin selectively controls the mobility of resting pool vesicles at hippocampal terminals. *J Neurosci*, **32**, 3969-3980.
- Ormel, L., Stensrud, M.J., Bergersen, L.H. & Gundersen, V. (2012) VGLUT1 is localized in astrocytic processes in several brain regions. *Glia*, **60**, 229-238.
- Orth, A., Tapken, D. & Hollmann, M. (2013) The delta subfamily of glutamate receptors: characterization of receptor chimeras and mutants. *Eur J Neurosci*, **37**, 1620-1630.
- Owen, O.E., Kalhan, S.C. & Hanson, R.W. (2002) The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *J Biol Chem*, **277**, 30409-30412.
- Ozawa, S., Kamiya, H. & Tsuzuki, K. (1998) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol*, **54**, 581-618.

P

- Paillart, C., Li, J., Matthews, G. & Sterling, P. (2003) Endocytosis and vesicle recycling at a ribbon synapse. *J Neurosci*, **23**, 4092-4099.
- Pan, P.Y., Marrs, J. & Ryan, T.A. (2015) Vesicular Glutamate Transporter 1 orchestrates recruitment of other synaptic vesicle cargo proteins during synaptic vesicle recycling. *J Biol Chem*.
- Pang, Z.P., Bacaj, T., Yang, X., Zhou, P., Xu, W. & Sudhof, T.C. (2011) Doc2 supports spontaneous synaptic transmission by a Ca⁽²⁺⁾-independent mechanism. *Neuron*, **70**, 244-251.
- Pangrsic, T., Lasarow, L., Reuter, K., Takago, H., Schwander, M., Riedel, D., Frank, T., Tarantino, L.M., Bailey, J.S., Strenzke, N., Brose, N., Muller, U., Reisinger, E. & Moser, T. (2010) Hearing requires otoferlin-dependent efficient replenishment of synaptic vesicles in hair cells. *Nat Neurosci*, **13**, 869-876.
- Parent, A., Cote, P.Y. & Lavoie, B. (1995) Chemical anatomy of primate basal ganglia. *Prog Neurobiol*, **46**, 131-197.
- Parpura, V., Basarsky, T.A., Liu, F., Jeftinija, K., Jeftinija, S. & Haydon, P.G. (1994) Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature*, **369**, 744-747.
- Parsons, S.M. (2000) Transport mechanisms in acetylcholine and monoamine storage. *Faseb j*, **14**, 2423-2434.
- Parsons, T.D. & Sterling, P. (2003) Synaptic ribbon. Conveyor belt or safety belt? *Neuron*, **37**, 379-382.

- Peng, A., Rotman, Z., Deng, P.Y. & Klyachko, V.A. (2012) Differential motion dynamics of synaptic vesicles undergoing spontaneous and activity-evoked endocytosis. *Neuron*, **73**, 1108-1115.
- Peng, Z., Wang, G.P., Zeng, R., Guo, J.Y., Chen, C.F. & Gong, S.S. (2013) Temporospatial expression and cellular localization of VGLUT3 in the rat cochlea. *Brain Res*, **1537**, 100-110.
- Perego, C., Vanoni, C., Bossi, M., Massari, S., Basudev, H., Longhi, R. & Pietrini, G. (2000) The GLT-1 and GLAST glutamate transporters are expressed on morphologically distinct astrocytes and regulated by neuronal activity in primary hippocampal cocultures. *J Neurochem*, **75**, 1076-1084.
- Perkins, R.E. & Morest, D.K. (1975) A study of cochlear innervation patterns in cats and rats with the Golgi method and Nomarski Optics. *J Comp Neurol*, **163**, 129-158.
- Peters, J.M., Franke, W.W. & Kleinschmidt, J.A. (1994) Distinct 19 S and 20 S subcomplexes of the 26 S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *J Biol Chem*, **269**, 7709-7718.
- Petilla Interneuron Nomenclature, G., Ascoli, G.A., Alonso-Nanclares, L., Anderson, S.A., Barrionuevo, G., Benavides-Piccione, R., Burkhalter, A., Buzsaki, G., Cauli, B., Defelipe, J., Fairen, A., Feldmeyer, D., Fishell, G., Fregnac, Y., Freund, T.F., Gardner, D., Gardner, E.P., Goldberg, J.H., Helmstaedter, M., Hestrin, S., Karube, F., Kisvarday, Z.F., Lambolez, B., Lewis, D.A., Marin, O., Markram, H., Munoz, A., Packer, A., Petersen, C.C., Rockland, K.S., Rossier, J., Rudy, B., Somogyi, P., Staiger, J.F., Tamas, G., Thomson, A.M., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., West, D.C. & Yuste, R. (2008) Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci*, **9**, 557-568.
- Petit, C. (2001) Usher syndrome: from genetics to pathogenesis. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, **2**, 271-297.
- Petroski, M.D. & Deshaies, R.J. (2005) Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 9-20.
- Pines, G., Danbolt, N.C., Bjoras, M., Zhang, Y., Bendahan, A., Eide, L., Koepsell, H., Storm-Mathisen, J., Seeberg, E. & Kanner, B.I. (1992) Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature*, **360**, 464-467.
- Pinheiro, P.S. & Mulle, C. (2008) Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanisms of action. *Nat Rev Neurosci*, **9**, 423-436.
- Pintard, L., Willems, A. & Peter, M. (2004) Cullin-based ubiquitin ligases: Cul3-BTB complexes join the family. *EMBO J*, **23**, 1681-1687.
- Pisani, A., Calabresi, P., Centonze, D. & Bernardi, G. (1997) Enhancement of NMDA responses by group I metabotropic glutamate receptor activation in striatal neurones. *Br J Pharmacol*, **120**, 1007-1014.
- Pourcho, R.G. & Goebel, D.J. (1985) Immunocytochemical demonstration of glycine in retina. *Brain Res*, **348**, 339-342.
- Prado, V.F., Martins-Silva, C., de Castro, B.M., Lima, R.F., Barros, D.M., Amaral, E., Ramsey, A.J., Sotnikova, T.D., Ramirez, M.R., Kim, H.G., Rossato, J.I., Koenen, J.,

- Quan, H., Cota, V.R., Moraes, M.F., Gomez, M.V., Guatimosim, C., Wetsel, W.C., Kushmerick, C., Pereira, G.S., Gainetdinov, R.R., Izquierdo, I., Caron, M.G. & Prado, M.A. (2006) Mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter are myasthenic and have deficits in object and social recognition. *Neuron*, **51**, 601-612.
- Preobraschenski, J., Zander, J.F., Suzuki, T., Ahnert-Hilger, G. & Jahn, R. (2014) Vesicular glutamate transporters use flexible anion and cation binding sites for efficient accumulation of neurotransmitter. *Neuron*, **84**, 1287-1301.
- Puel, J.L. (1995) Chemical synaptic transmission in the cochlea. *Prog Neurobiol*, **47**, 449-476.
- Puel, J.L., Bobbin, R.P. & Fallon, M. (1988) The active process is affected first by intense sound exposure. *Hear Res*, **37**, 53-63.
- Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Katz, L.C., LaMantia, A.-S., McNamara, J.O. & Williams, S.M. (2004) *Neuroscience*. Sinauer Associates, Inc.
- Pyle, J.L., Kavalali, E.T., Piedras-Renteria, E.S. & Tsien, R.W. (2000) Rapid reuse of readily releasable pool vesicles at hippocampal synapses. *Neuron*, **28**, 221-231.

R

- Rain, J.C., Selig, L., De Reuse, H., Battaglia, V., Reverdy, C., Simon, S., Lenzen, G., Petel, F., Wojcik, J., Schachter, V., Chemama, Y., Labigne, A. & Legrain, P. (2001) The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*. *Nature*, **409**, 211-215.
- Ramirez, D.M., Khvotchev, M., Trauterman, B. & Kavalali, E.T. (2012) Vti1a identifies a vesicle pool that preferentially recycles at rest and maintains spontaneous neurotransmission. *Neuron*, **73**, 121-134.
- Ratnayaka, A., Marra, V., Bush, D., Burden, J.J., Branco, T. & Staras, K. (2012) Recruitment of resting vesicles into recycling pools supports NMDA receptor-dependent synaptic potentiation in cultured hippocampal neurons. *J Physiol*, **590**, 1585-1597.
- Reddy, V.S., Shlykov, M.A., Castillo, R., Sun, E.I. & Saier, M.H., Jr. (2012) The major facilitator superfamily (MFS) revisited. *FEBS J*, **279**, 2022-2035.
- Regus-Leidig, H., Ott, C., Lohner, M., Atorf, J., Fuchs, M., Sedmak, T., Kremers, J., Fejtova, A., Gundelfinger, E.D. & Brandstatter, J.H. (2013) Identification and immunocytochemical characterization of Piccolino, a novel Piccolo splice variant selectively expressed at sensory ribbon synapses of the eye and ear. *PLoS One*, **8**, e70373.
- Redecker, P., Kreutz, M.R., Bockmann, J., Gundelfinger, E.D. & Boeckers, T.M. (2003) Brain synaptic junctional proteins at the acrosome of rat testicular germ cells. *J Histochem Cytochem*, **51**, 809-819.
- Regus-Leidig, H., Ott, C., Lohner, M., Atorf, J., Fuchs, M., Sedmak, T., Kremers, J., Fejtova, A., Gundelfinger, E.D. & Brandstatter, J.H. (2013) Identification and immunocytochemical characterization of Piccolino, a novel Piccolo splice variant selectively expressed at sensory ribbon synapses of the eye and ear. *PLoS One*, **8**, e70373.

- Regus-Leidig, H., Tom Dieck, S., Specht, D., Meyer, L. & Brandstatter, J.H. (2009) Early steps in the assembly of photoreceptor ribbon synapses in the mouse retina: the involvement of precursor spheres. *J Comp Neurol*, **512**, 814-824.
- Reimer, R.J. (2013) SLC17: a functionally diverse family of organic anion transporters. *Mol Aspects Med*, **34**, 350-359.
- Reimer, R.J., Fremeau, R.T., Jr., Bellocchio, E.E. & Edwards, R.H. (2001) The essence of excitation. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 417-421.
- Reisinger, E., Bresee, C., Neef, J., Nair, R., Reuter, K., Bulankina, A., Nouvian, R., Koch, M., Buckers, J., Kastrup, L., Roux, I., Petit, C., Hell, S.W., Brose, N., Rhee, J.S., Kugler, S., Brigande, J.V. & Moser, T. (2011) Probing the functional equivalence of otoferlin and synaptotagmin 1 in exocytosis. *J Neurosci*, **31**, 4886-4895.
- Rennie, M.J., Bowtell, J.L., Bruce, M. & Khogali, S.E. (2001) Interaction between glutamine availability and metabolism of glycogen, tricarboxylic acid cycle intermediates and glutathione. *J Nutr*, **131**, 2488S-2490S; discussion 2496S-2487S.
- Revelo, N.H., Kamin, D., Truckenbrodt, S., Wong, A.B., Reuter-Jessen, K., Reisinger, E., Moser, T. & Rizzoli, S.O. (2014) A new probe for super-resolution imaging of membranes elucidates trafficking pathways. *J Cell Biol*, **205**, 591-606.
- Riviere, J.B., van Bon, B.W., Hoischen, A., Kholmanskikh, S.S., O'Roak, B.J., Gilissen, C., Gijzen, S., Sullivan, C.T., Christian, S.L., Abdul-Rahman, O.A., Atkin, J.F., Chassaing, N., Drouin-Garraud, V., Fry, A.E., Fryns, J.P., Gripp, K.W., Kempers, M., Kleefstra, T., Mancini, G.M., Nowaczyk, M.J., van Ravenswaaij-Arts, C.M., Roscioli, T., Marble, M., Rosenfeld, J.A., Siu, V.M., de Vries, B.B., Shendure, J., Verloes, A., Veltman, J.A., Brunner, H.G., Ross, M.E., Pilz, D.T. & Dobyns, W.B. (2012) De novo mutations in the actin genes ACTB and ACTG1 cause Baraitser-Winter syndrome. *Nat Genet*, **44**, 440-444, S441-442.
- Rizzoli, S.O. & Betz, W.J. (2005) Synaptic vesicle pools. *Nat Rev Neurosci*, **6**, 57-69.
- Robertson, D. (1984) Horseradish peroxidase injection of physiologically characterized afferent and efferent neurones in the guinea pig spiral ganglion. *Hear Res*, **15**, 113-121.
- Rodriguez-Moreno, A. & Sihra, T.S. (2007) Metabotropic actions of kainate receptors in the CNS. *J Neurochem*, **103**, 2121-2135.
- Romand, R. & Romand, M.R. (1984) The ontogenesis of pseudomonopolar cells in spiral ganglion of cat and rat. *Acta Otolaryngol*, **97**, 239-249.
- Root, D.H., Mejias-Aponte, C.A., Zhang, S., Wang, H.L., Hoffman, A.F., Lupica, C.R. & Morales, M. (2014) Single rodent mesohabenular axons release glutamate and GABA. *Nat Neurosci*, **17**, 1543-1551.
- Rosenmund, C. & Stevens, C.F. (1996) Definition of the readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses. *Neuron*, **16**, 1197-1207.
- Roseth, S., Fykse, E.M. & 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.

- Roux, I., Safieddine, S., Nouvian, R., Grati, M., Simmler, M.C., Bahloul, A., Perfettini, I., Le Gall, M., Rostaing, P., Hamard, G., Triller, A., Avan, P., Moser, T. & Petit, C. (2006) Otoferlin, defective in a human deafness form, is essential for exocytosis at the auditory ribbon synapse. *Cell*, **127**, 277-289.
- Rubel, E.W., Furrer, S.A. & Stone, J.S. (2013) A brief history of hair cell regeneration research and speculations on the future. *Hear Res*, **297**, 42-51.
- Ruel, J., Bobbin, R.P., Vidal, D., Pujol, R. & Puel, J.L. (2000) The selective AMPA receptor antagonist GYKI 53784 blocks action potential generation and excitotoxicity in the guinea pig cochlea. *Neuropharmacology*, **39**, 1959-1973.
- Ruel, J., Emery, S., Nouvian, R., Bersot, T., Amilhon, B., Van Rybroek, J.M., Rebillard, G., Lenoir, M., Eybalin, M., Delprat, B., Sivakumaran, T.A., Giros, B., El Mestikawy, S., Moser, T., Smith, R.J., Lesperance, M.M. & Puel, J.L. (2008) Impairment of SLC17A8 encoding vesicular glutamate transporter-3, VGLUT3, underlies nonsyndromic deafness DFNA25 and inner hair cell dysfunction in null mice. *Am J Hum Genet*, **83**, 278-292.
- Ruel, J., Nouvian, R., Gervais d'Aldin, C., Pujol, R., Eybalin, M. & Puel, J.L. (2001) Dopamine inhibition of auditory nerve activity in the adult mammalian cochlea. *Eur J Neurosci*, **14**, 977-986.
- Ruel, J., Wang, J., Dememes, D., Gobaille, S., Puel, J.L. & Rebillard, G. (2006) Dopamine transporter is essential for the maintenance of spontaneous activity of auditory nerve neurones and their responsiveness to sound stimulation. *J Neurochem*, **97**, 190-200.
- Ruel, J., Wang, J., Rebillard, G., Eybalin, M., Lloyd, R., Pujol, R. & Puel, J.L. (2007) Physiology, pharmacology and plasticity at the inner hair cell synaptic complex. *Hear Res*, **227**, 19-27.
- Russo, S.J. & Nestler, E.J. (2013) The brain reward circuitry in mood disorders. *Nat Rev Neurosci*, **14**, 609-625.

S

- Safieddine, S., El-Amraoui, A. & Petit, C. (2012) The auditory hair cell ribbon synapse: from assembly to function. *Annu Rev Neurosci*, **35**, 509-528.
- Safieddine, S. & Wenthold, R.J. (1997) The glutamate receptor subunit delta1 is highly expressed in hair cells of the auditory and vestibular systems. *J Neurosci*, **17**, 7523-7531.
- Sagne, C., El Mestikawy, S., Isambert, M.F., Hamon, M., Henry, J.P., Giros, B. & Gasnier, B. (1997) Cloning of a functional vesicular GABA and glycine transporter by screening of genome databases. *FEBS Lett*, **417**, 177-183.
- Sakae, D.Y., Marti, F., Lecca, S., Vorspan, F., Martin-Garcia, E., Morel, L.J., Henrion, A., Gutierrez-Cuesta, J., Besnard, A., Heck, N., Herzog, E., Bolte, S., Prado, V.F., Prado, M.A., Bellivier, F., Eap, C.B., Crettol, S., Vanhoutte, P., Caboche, J., Gratton, A., Moquin, L., Giros, B., Maldonado, R., Daumas, S., Mameli, M., Jamain, S. & El Mestikawy, S. (2015) The absence of VGLUT3 predisposes to cocaine abuse by increasing dopamine and glutamate signaling in the nucleus accumbens. *Mol Psychiatry*.

- Sano, C. (2009) History of glutamate production. *Am J Clin Nutr*, **90**, 728S-732S.
- Sarikas, A., Hartmann, T. & Pan, Z.Q. (2011) The cullin protein family. *Genome Biol*, **12**, 220.
- Savtchenko, L.P. & Rusakov, D.A. (2007) The optimal height of the synaptic cleft. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 1823-1828.
- Sawada, K., Echigo, N., Juge, N., Miyaji, T., Otsuka, M., Omote, H., Yamamoto, A. & 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. & 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.
- Schallier, A., Massie, A., Loyens, E., Moechars, D., Drinkenburg, W., Michotte, Y. & Smolders, I. (2009) vGLUT2 heterozygous mice show more susceptibility to clonic seizures induced by pentylenetetrazol. *Neurochem Int*, **55**, 41-44.
- Schenck, S., Wojcik, S.M., Brose, N. & Takamori, S. (2009) A chloride conductance in VGLUT1 underlies maximal glutamate loading into synaptic vesicles. *Nat Neurosci*, **12**, 156-162.
- Scheuber, A., Rudge, R., Danglot, L., Raposo, G., Binz, T., Poncer, J.C. & Galli, T. (2006) Loss of AP-3 function affects spontaneous and evoked release at hippocampal mossy fiber synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 16562-16567.
- Schikorski, T. & Stevens, C.F. (1997) Quantitative ultrastructural analysis of hippocampal excitatory synapses. *J Neurosci*, **17**, 5858-5867.
- Schlager, M.A., Serra-Marques, A., Grigoriev, I., Gumy, L.F., Esteves da Silva, M., Wulf, P.S., Akhmanova, A. & Hoogenraad, C.C. (2014) Bicaudal d family adaptor proteins control the velocity of Dynein-based movements. *Cell Rep*, **8**, 1248-1256.
- Schmid, S.M. & 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.
- Schmid, S.M., Kott, S., Sager, C., Huelsken, T. & Hollmann, M. (2009) The glutamate receptor subunit delta2 is capable of gating its intrinsic ion channel as revealed by ligand binding domain transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 10320-10325.
- Schmitz, F., Konigstorfer, A. & Sudhof, T.C. (2000) RIBEYE, a component of synaptic ribbons: a protein's journey through evolution provides insight into synaptic ribbon function. *Neuron*, **28**, 857-872.
- Schroeder, H.W., 3rd, Mitchell, C., Shuman, H., Holzbaur, E.L. & Goldman, Y.E. (2010) Motor number controls cargo switching at actin-microtubule intersections in vitro. *Curr Biol*, **20**, 687-696.
- Schwartz, J., H (2000) Neurotransmitters. *Principles of Neural Science*, 280-290.
- Seal, R.P., Akil, O., Yi, E., Weber, C.M., Grant, L., Yoo, J., Clause, A., Kandler, K., Noebels, J.L., Glowatzki, E., Lustig, L.R. & Edwards, R.H. (2008) Sensorineural deafness and seizures in mice lacking vesicular glutamate transporter 3. *Neuron*, **57**, 263-275.

- Seal, R.P. & Amara, S.G. (1999) Excitatory amino acid transporters: a family in flux. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **39**, 431-456.
- Seal, R.P., Wang, X., Guan, Y., Raja, S.N., Woodbury, C.J., Basbaum, A.I. & Edwards, R.H. (2009) Injury-induced mechanical hypersensitivity requires C-low threshold mechanoreceptors. *Nature*, **462**, 651-655.
- Sheets, L., Trapani, J.G., Mo, W., Obholzer, N. & Nicolson, T. (2011) Ribeye is required for presynaptic Ca(V)1.3a channel localization and afferent innervation of sensory hair cells. *Development*, **138**, 1309-1319.
- Sheldon, A.L. & Robinson, M.B. (2007) The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochem Int*, **51**, 333-355.
- Sheng, M. & Hoogenraad, C.C. (2007) The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annu Rev Biochem*, **76**, 823-847.
- Sheng, M. & Kim, E. (2011) The postsynaptic organization of synapses. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **3**.
- Shields, D.J., Niessen, S., Murphy, E.A., Mielgo, A., Desgrosellier, J.S., Lau, S.K., Barnes, L.A., Lesperance, J., Bouvet, M., Tarin, D., Cravatt, B.F. & Cheresh, D.A. (2010) RBBP9: a tumor-associated serine hydrolase activity required for pancreatic neoplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 2189-2194.
- Shigeri, Y., Seal, R.P. & Shimamoto, K. (2004) Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Res Brain Res Rev*, **45**, 250-265.
- Shutoh, F., Ina, A., Yoshida, S., Konno, J. & Hisano, S. (2008) Two distinct subtypes of serotonergic fibers classified by co-expression with vesicular glutamate transporter 3 in rat forebrain. *Neurosci Lett*, **432**, 132-136.
- Siksou, L., Silm, K., Biesemann, C., Nehring, R.B., Wojcik, S.M., Triller, A., El Mestikawy, S., Marty, S. & Herzog, E. (2013) A role for vesicular glutamate transporter 1 in synaptic vesicle clustering and mobility. *Eur J Neurosci*, **37**, 1631-1642.
- Simmons, D.D. & Liberman, M.C. (1988) Afferent innervation of outer hair cells in adult cats: II. Electron microscopic analysis of fibers labeled with horseradish peroxidase. *J Comp Neurol*, **270**, 145-154.
- Small, D. & Tauskela, J. (2005) Glutamate receptor pharmacology: Lessons learned from the last decade of stroke trials. In: Gill, S.; Pulido, O., editors. *Glutamate receptors in peripheral tissue*. New York: Kluwer Academic/Plenum; , p. 27-45.
- Smart, T.G. & Paoletti, P. (2012) Synaptic neurotransmitter-gated receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **4**.
- Smith, Q.R. (2000) Transport of glutamate and other amino acids at the blood-brain barrier. *J Nutr*, **130**, 1016S-1022S.
- Sobkowicz, H.M., Rose, J.E., Scott, G.E. & Slapnick, S.M. (1982) Ribbon synapses in the developing intact and cultured organ of Corti in the mouse. *J Neurosci*, **2**, 942-957.

- Soiza-Reilly, M. & Commons, K.G. (2011) Glutamatergic drive of the dorsal raphe nucleus. *J Chem Neuroanat*, **41**, 247-255.
- Song, H., Ming, G., Fon, E., Bellocchio, E., Edwards, R.H. & Poo, M. (1997) Expression of a putative vesicular acetylcholine transporter facilitates quantal transmitter packaging. *Neuron*, **18**, 815-826.
- Somogyi, J., Baude, A., Omori, Y., Shimizu, H., El Mestikawy, S., Fukaya, M., Shigemoto, R., Watanabe, M. & 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.
- Somogyi, P., Dalezios, Y., Lujan, R., Roberts, J.D., Watanabe, M. & Shigemoto, R. (2003) High level of mGluR7 in the presynaptic active zones of select populations of GABAergic terminals innervating interneurons in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci*, **17**, 2503-2520.
- Spoendlin, H. (1967) The innervation of the organ of Corti. *J Laryngol Otol*, **81**, 717-738.
- Spoendlin, H. (1972) Innervation densities of the cochlea. *Acta Otolaryngol*, **73**, 235-248.
- Staras, K., Branco, T., Burden, J.J., Pozo, K., Darcy, K., Marra, V., Ratnayaka, A. & Goda, Y. (2010) A vesicle superpool spans multiple presynaptic terminals in hippocampal neurons. *Neuron*, **66**, 37-44.
- Stella, S.L., Jr., Li, S., Sabatini, A., Vila, A. & Brecha, N.C. (2008) Comparison of the ontogeny of the vesicular glutamate transporter 3 (VGLUT3) with VGLUT1 and VGLUT2 in the rat retina. *Brain Res*, **1215**, 20-29.
- Stensrud, M.J., Sogn, C.J. & Gundersen, V. (2015) Immunogold characteristics of VGLUT3-positive GABAergic nerve terminals suggest corelease of glutamate. *J Comp Neurol*.
- Stevens, C.F. & Tsujimoto, T. (1995) Estimates for the pool size of releasable quanta at a single central synapse and for the time required to refill the pool. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 846-849.
- Stobrawa, S.M., Breiderhoff, T., Takamori, S., Engel, D., Schweizer, M., Zdebik, A.A., Bosl, M.R., Ruether, K., Jahn, H., Draguhn, A., Jahn, R. & Jentsch, T.J. (2001) Disruption of CIC-3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus. *Neuron*, **29**, 185-196.
- Storck, T., Schulte, S., Hofmann, K. & 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. & Ottersen, O.P. (1990) Immunocytochemistry of glutamate at the synaptic level. *J Histochem Cytochem*, **38**, 1733-1743.
- Stornetta, R.L., Sevigny, C.P. & Guyenet, P.G. (2002a) Vesicular glutamate transporter DNPI/VGLUT2 mRNA is present in C1 and several other groups of brainstem catecholaminergic neurons. *J Comp Neurol*, **444**, 191-206.
- Stornetta, R.L., Sevigny, C.P., Schreihof, A.M., Rosin, D.L. & Guyenet, P.G. (2002b) Vesicular glutamate transporter DNPI/VGLUT2 is expressed by both C1 adrenergic

and nonaminergic presympathetic vasomotor neurons of the rat medulla. *J Comp Neurol*, **444**, 207-220.

Strenzke, N., Chanda, S., Kopp-Scheinflug, C., Khimich, D., Reim, K., Bulankina, A.V., Neef, A., Wolf, F., Brose, N., Xu-Friedman, M.A. & Moser, T. (2009) Complexin-I is required for high-fidelity transmission at the endbulb of Held auditory synapse. *J Neurosci*, **29**, 7991-8004.

Sudhof, T.C. (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci*, **27**, 509-547.

Sudhof, T.C. (2008) Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature*, **455**, 903-911.

Sudhof, T.C. (2012) The presynaptic active zone. *Neuron*, **75**, 11-25.

Sudhof, T.C. & Rizo, J. (2011) Synaptic vesicle exocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **3**.

Sullivan, M.A., Chen, H. & Morikawa, H. (2008) Recurrent inhibitory network among striatal cholinergic interneurons. *J Neurosci*, **28**, 8682-8690.

Summa, M., Di Prisco, S., Grilli, M., Usai, C., Marchi, M. & Pittaluga, A. (2013) Presynaptic mGlu7 receptors control GABA release in mouse hippocampus. *Neuropharmacology*, **66**, 215-224.

T

Takamori, S. (2006) VGLUTs: 'exciting' times for glutamatergic research? *Neurosci Res*, **55**, 343-351.

Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E.A., Gronborg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Schenck, S., Brugger, B., Ringler, P., Muller, S.A., Rammner, B., Grater, F., Hub, J.S., De Groot, B.L., Mieskes, G., Moriyama, Y., Klingauf, J., Grubmuller, H., Heuser, J., Wieland, F. & Jahn, R. (2006) Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell*, **127**, 831-846.

Takamori, S., Malherbe, P., Broger, C. & 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. & 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. & Jahn, R. (2001) Identification of differentiation-associated brain-specific phosphate transporter as a second vesicular glutamate transporter (VGLUT2). *J Neurosci*, **21**, RC182.

Takei, K., Mundigl, O., Daniell, L. & De Camilli, P. (1996) The synaptic vesicle cycle: a single vesicle budding step involving clathrin and dynamin. *J Cell Biol*, **133**, 1237-1250.

Tamura, Y., Ogita, K. & Ueda, T. (2014) A new VGLUT-specific potent inhibitor: pharmacophore of Brilliant Yellow. *Neurochem Res*, **39**, 117-128.

- Tamura, Y., Ozkan, E.D., Bole, D.G. & Ueda, T. (2001) IPF, a vesicular uptake inhibitory protein factor, can reduce the Ca(2+)-dependent, evoked release of glutamate, GABA and serotonin. *J Neurochem*, **76**, 1153-1164.
- Tareste, D., Shen, J., Melia, T.J. & Rothman, J.E. (2008) SNAREpin/Munc18 promotes adhesion and fusion of large vesicles to giant membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 2380-2385.
- Tatti, R., Bhaukaurally, K., Gschwend, O., Seal, R.P., Edwards, R.H., Rodriguez, I. & Carleton, A. (2014) A population of glomerular glutamatergic neurons controls sensory information transfer in the mouse olfactory bulb. *Nat Commun*, **5**, 3791.
- Tripodi, G., Valtorta, F., Torielli, L., Chierigatti, E., Salardi, S., Trusolino, L., Menegon, A., Ferrari, P., Marchisio, P.C. & Bianchi, G. (1996) Hypertension-associated point mutations in the adducin alpha and beta subunits affect actin cytoskeleton and ion transport. *J Clin Invest*, **97**, 2815-2822.
- Truckenbrodt, S. & Rizzoli, S.O. (2014) Spontaneous vesicle recycling in the synaptic bouton. *Front Cell Neurosci*, **8**, 409.
- Tsuriel, S., Geva, R., Zamorano, P., Dresbach, T., Boeckers, T., Gundelfinger, E.D., Garner, C.C. & Ziv, N.E. (2006) Local sharing as a predominant determinant of synaptic matrix molecular dynamics. *PLoS Biol*, **4**, e271.
- Tukey, D.S., Lee, M., Xu, D., Eberle, S.E., Goffer, Y., Manders, T.R., Ziff, E.B. & Wang, J. (2013) Differential effects of natural rewards and pain on vesicular glutamate transporter expression in the nucleus accumbens. *Mol Brain*, **6**, 32.

U

- Uthaiyah, R.C. & Hudspeth, A.J. (2010) Molecular anatomy of the hair cell's ribbon synapse. *J Neurosci*, **30**, 12387-12399.

V

- Van den Berg, C.J. & Garfinkel, D. (1971) A stimulation study of brain compartments. Metabolism of glutamate and related substances in mouse brain. *Biochem J*, **123**, 211-218.
- Varga, R., Avenarius, M.R., Kelley, P.M., Keats, B.J., Berlin, C.I., Hood, L.J., Morlet, T.G., Brashears, S.M., Starr, A., Cohn, E.S., Smith, R.J. & Kimberling, W.J. (2006) OTOF mutations revealed by genetic analysis of hearing loss families including a potential temperature sensitive auditory neuropathy allele. *J Med Genet*, **43**, 576-581.
- Varga, R., Kelley, P.M., Keats, B.J., Starr, A., Leal, S.M., Cohn, E. & Kimberling, W.J. (2003) Non-syndromic recessive auditory neuropathy is the result of mutations in the otoferlin (OTOF) gene. *J Med Genet*, **40**, 45-50.
- Varga, V., Losonczy, A., Zemelman, B.V., Borhegyi, Z., Nyiri, G., Domonkos, A., Hangya, B., Holderith, N., Magee, J.C. & Freund, T.F. (2009) Fast synaptic subcortical control of hippocampal circuits. *Science*, **326**, 449-453.

- Varoqui, H., Schafer, M.K., Zhu, H., Weihe, E. & Erickson, J.D. (2002) Identification of the differentiation-associated Na⁺/PI transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses. *J Neurosci*, **22**, 142-155.
- Verheijen, F.W., Verbeek, E., Aula, N., Beerens, C.E., Havelaar, A.C., Joosse, M., Peltonen, L., Aula, P., Galjaard, H., van der Spek, P.J. & Mancini, G.M. (1999) A new gene, encoding an anion transporter, is mutated in sialic acid storage diseases. *Nat Genet*, **23**, 462-465.
- Vining, E.P. (1999) Clinical efficacy of the ketogenic diet. *Epilepsy Res*, **37**, 181-190.
- Voglmaier, S.M., Kam, K., Yang, H., Fortin, D.L., Hua, Z., Nicoll, R.A. & Edwards, R.H. (2006) Distinct endocytic pathways control the rate and extent of synaptic vesicle protein recycling. *Neuron*, **51**, 71-84.
- Vojtek, A.B. & Hollenberg, S.M. (1995) Ras-Raf interaction: two-hybrid analysis. *Methods Enzymol*, **255**, 331-342.

W

- Wallen-Mackenzie, A., Gezelius, H., Thoby-Brisson, M., Nygard, A., Enjin, A., Fujiyama, F., Fortin, G. & 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.
- Wang, Y., Matsuda, S., Drews, V., Torashima, T., Meisler, M.H. & Yuzaki, M. (2003) A hot spot for hotfoot mutations in the gene encoding the delta2 glutamate receptor. *Eur J Neurosci*, **17**, 1581-1590.
- Wang, Z., Kai, L., Day, M., Ronesi, J., Yin, H.H., Ding, J., Tkatch, T., Lovinger, D.M. & Surmeier, D.J. (2006) Dopaminergic control of corticostriatal long-term synaptic depression in medium spiny neurons is mediated by cholinergic interneurons. *Neuron*, **50**, 443-452.
- Wasselus, M., Galvez, J.P., Valentino, R.J. & Van Bockstaele, E.J. (2006) Differential projections of dorsal raphe nucleus neurons to the lateral septum and striatum. *J Chem Neuroanat*, **31**, 233-242.
- Wassle, H., Heinze, L., Ivanova, E., Majumdar, S., Weiss, J., Harvey, R.J. & Haverkamp, S. (2009) Glycinergic transmission in the Mammalian retina. *Front Mol Neurosci*, **2**, 6.
- Wassle, H., Regus-Leidig, H. & Haverkamp, S. (2006) Expression of the vesicular glutamate transporter vGluT2 in a subset of cones of the mouse retina. *J Comp Neurol*, **496**, 544-555.
- Warr, W.B. & Guinan, J.J., Jr. (1979) Efferent innervation of the organ of corti: two separate systems. *Brain Res*, **173**, 152-155.
- Watanabe, M., Maemura, K., Kanbara, K., Tamayama, T. & Hayasaki, H. (2002) GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *Int Rev Cytol*, **213**, 1-47.

- Watanabe, S., Rost, B.R., Camacho-Perez, M., Davis, M.W., Sohl-Kielczynski, B., Rosenmund, C. & Jorgensen, E.M. (2013) Ultrafast endocytosis at mouse hippocampal synapses. *Nature*, **504**, 242-247.
- Watanabe, S., Trimbuch, T., Camacho-Perez, M., Rost, B.R., Brokowski, B., Sohl-Kielczynski, B., Felies, A., Davis, M.W., Rosenmund, C. & Jorgensen, E.M. (2014) Clathrin regenerates synaptic vesicles from endosomes. *Nature*, **515**, 228-233.
- Watkins, J.C. (2000) I-glutamate as a central neurotransmitter: looking back. *Biochem Soc Trans*, **28**, 297-309.
- Wedemeyer, C., Zorrilla de San Martin, J., Ballesteros, J., Gomez-Casati, M.E., Torbidoni, A.V., Fuchs, P.A., Bettler, B., Elgoyhen, A.B. & Katz, E. (2013) Activation of presynaptic GABA(B(1a,2)) receptors inhibits synaptic transmission at mammalian inhibitory cholinergic olivocochlear-hair cell synapses. *J Neurosci*, **33**, 15477-15487.
- Weisz, C., Glowatzki, E. & Fuchs, P. (2009) The postsynaptic function of type II cochlear afferents. *Nature*, **461**, 1126-1129.
- Weisz, C.J., Glowatzki, E. & Fuchs, P.A. (2014) Excitability of type II cochlear afferents. *J Neurosci*, **34**, 2365-2373.
- Weisz, C.J., Lehar, M., Hiel, H., Glowatzki, E. & Fuchs, P.A. (2012) Synaptic transfer from outer hair cells to type II afferent fibers in the rat cochlea. *J Neurosci*, **32**, 9528-9536.
- Wersinger, E. & Fuchs, P.A. (2011) Modulation of hair cell efferents. *Hear Res*, **279**, 1-12.
- Weston, M.C., Nehring, R.B., Wojcik, S.M. & Rosenmund, C. (2011) Interplay between VGLUT isoforms and endophilin A1 regulates neurotransmitter release and short-term plasticity. *Neuron*, **69**, 1147-1159.
- Wilhelm, B.G., Groemer, T.W. & Rizzoli, S.O. (2010) The same synaptic vesicles drive active and spontaneous release. *Nat Neurosci*, **13**, 1454-1456.
- Williams, J. (1997) How does a vesicle know it is full? *Neuron*, **18**, 683-686.
- Wilson, N.R., Kang, J., Hueske, E.V., Leung, T., Varoqui, H., Murnick, J.G., Erickson, J.D. & Liu, G. (2005) Presynaptic regulation of quantal size by the vesicular glutamate transporter VGLUT1. *J Neurosci*, **25**, 6221-6234.
- Winter, H.C. & Ueda, T. (1993) Glutamate uptake system in the presynaptic vesicle: glutamic acid analogs as inhibitors and alternate substrates. *Neurochem Res*, **18**, 79-85.
- Woitach, J.T., Zhang, M., Niu, C.H. & Thorgeirsson, S.S. (1998) A retinoblastoma-binding protein that affects cell-cycle control and confers transforming ability. *Nat Genet*, **19**, 371-374.
- Wojcik, J., Boneca, I.G. & Legrain, P. (2002) Prediction, assessment and validation of protein interaction maps in bacteria. *J Mol Biol*, **323**, 763-770.
- Wojcik, S.M., Rhee, J.S., Herzog, E., Sigler, A., Jahn, R., Takamori, S., Brose, N. & 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.

Wong, F.H., Chen, J.S., Reddy, V., Day, J.L., Shlykov, M.A., Wakabayashi, S.T. & Saier, M.H., Jr. (2012) The amino acid-polyamine-organocation superfamily. *J Mol Microbiol Biotechnol*, **22**, 105-113.

Wu, S.X., Koshimizu, Y., Feng, Y.P., Okamoto, K., Fujiyama, F., Hioki, H., Li, Y.Q., Kaneko, T. & Mizuno, N. (2004) Vesicular glutamate transporter immunoreactivity in the central and peripheral endings of muscle-spindle afferents. *Brain Res*, **1011**, 247-251.

X

Xie, X.S., Crider, B.P. & Stone, D.K. (1989) Isolation and reconstitution of the chloride transporter of clathrin-coated vesicles. *J Biol Chem*, **264**, 18870-18873.

Y

Yadav, R., Gupta, S.C., Hillman, B.G., Bhatt, J.M., Stairs, D.J. & Dravid, S.M. (2012) Deletion of glutamate delta-1 receptor in mouse leads to aberrant emotional and social behaviors. *PLoS One*, **7**, e32969.

Yoon, B.C., Zivraj, K.H. & Holt, C.E. (2009) Local translation and mRNA trafficking in axon pathfinding. *Results Probl Cell Differ*, **48**, 269-288.

Yoshihara, M. & Littleton, J.T. (2002) Synaptotagmin I functions as a calcium sensor to synchronize neurotransmitter release. *Neuron*, **36**, 897-908.

Yuzaki, M. (2004) The delta2 glutamate receptor: a key molecule controlling synaptic plasticity and structure in Purkinje cells. *Cerebellum*, **3**, 89-93.

Z

Zander, J.F., Munster-Wandowski, A., Brunk, I., Pahner, I., Gomez-Lira, G., Heinemann, U., Gutierrez, R., Laube, G. & Ahnert-Hilger, G. (2010) Synaptic and vesicular coexistence of VGLUT and VGAT in selected excitatory and inhibitory synapses. *J Neurosci*, **30**, 7634-7645.

Zeng, C., Nannapaneni, N., Zhou, J., Hughes, L.F. & Shore, S. (2009) Cochlear damage changes the distribution of vesicular glutamate transporters associated with auditory and nonauditory inputs to the cochlear nucleus. *J Neurosci*, **29**, 4210-4217.

Zhang, S. & Morales, M. (2010) Serotonergic axons terminals with glutamatergic phenotype make synapses on both dopaminergic and nondopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Neuroscience Meeting Planner, San Diego CA, Society for Neuroscience, Program #448.6*, Online.

Zhou, J., Nannapaneni, N. & Shore, S. (2007) Vesicular glutamate transporters 1 and 2 are differentially associated with auditory nerve and spinal trigeminal inputs to the cochlear nucleus. *J Comp Neurol*, **500**, 777-787.

Zilberter, Y. (2000) Dendritic release of glutamate suppresses synaptic inhibition of pyramidal neurons in rat neocortex. *J Physiol*, **528**, 489-496.

Zuber, B., Nikonenko, I., Klauser, P., Muller, D. & Dubochet, J. (2005) The mammalian central nervous synaptic cleft contains a high density of periodically organized complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 19192-19197.

Annexes

Etude du comportement des souris VGLUT3^{A224V/A224V} à 6 mois

L'étude du comportement des souris VGLUT3^{A224V/A224V} a également été réalisée à l'âge de 6 mois. En effet, nous avons voulu savoir si avec l'âge, un phénotype comportemental apparaissait.

Nous avons, tout d'abord, analysé l'activité locomotrice spontanée en actimétrie pendant 5 heures (**Figure 1A**). Nous n'observons pas de différence significative d'activité locomotrice horizontale entre les souris WT, VGLUT3^{A224V/+} et VGLUT3^{A224V/A224V} (Kruskal-Wallis test, $p > 0.05$).

Nous avons, ensuite, caractérisé les comportements anxieux des souris en utilisant le test du champ ouvert (*Open field* ou OF) et le labyrinthe en croix surélevé (*Elevated Plus Maze* ou EPM). Les souris VGLUT3^{A224V/A224V} passent autant de temps dans la zone centrale de l'OF que les souris WT (**Figure 1B**, Mann Whitney test, $p = 0.6421$). Dans l'EPM, les souris VGLUT3^{A224V/A224V} passent autant de temps dans les bras ouverts que les souris WT (Mann Whitney test, $p = 0.9639$) et le pourcentage d'entrée dans les bras ouverts est similaire entre les deux génotypes (**Figure 1C**, Mann Whitney test, $p = 1.000$). Les résultats de l'EPM confirment ceux de l'OF.

Les souris VGLUT3^{A224V/A224V} ne présentent pas de phénotype anxieux à l'âge de 6 mois et leur activité locomotrice spontanée est normale. Cette mutation ne provoque donc pas de changements comportementaux sur l'activité locomotrice et l'anxiété ni à 3 mois (cf article) ni à 6 mois.

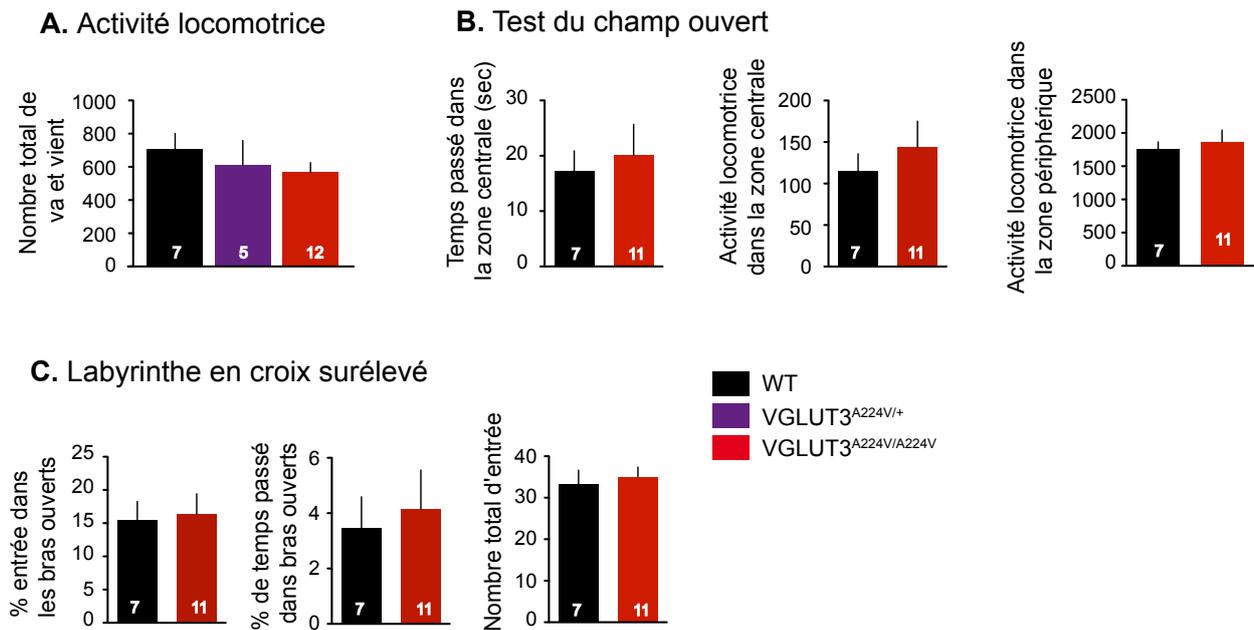


Figure 1. Caractérisation du phénotype comportemental des souris VGLUT3^{A224V/A224V} à 6 mois. (A) Activité locomotrice spontanée horizontale enregistrée pendant 5 heures des souris WT (n = 7), VGLUT3^{A224V/+} (n = 5) et VGLUT3^{A224V/A224V} (n = 12). Il n'y a aucune différence significative entre les différents génotypes. (B) Test du champ ouvert ou *Open field* (WT n = 7, VGLUT3^{A224V/A224V} n = 11). Les souris VGLUT3^{A224V/A224V} passent autant de temps dans la zone centrale que les souris WT. Leur activité locomotrice dans l'*open field* est similaire. (C) Labyrinthe en croix surélevé (WT n = 7, VGLUT3^{A224V/A224V} n = 11). Le pourcentage d'entrée dans les bras ouverts est équivalent entre les deux génotypes ainsi que le pourcentage de temps. Il n'y a pas de différence significative dans le nombre total d'entrée entre les souris WT et VGLUT3^{A224V/A224V}.

Etude du système auditif des souris VGLUT3^{A224V/A224V}

Le travail mené par l'équipe du Pr Puel a permis de découvrir l'implication de VGLUT3 dans une pathologie héréditaire de l'audition chez l'homme (surdité de type DFNA25). Il s'agit de la première mutation d'un VGLUT associée à une pathologie humaine (Ruel *et al.*, 2008). Une mutation ponctuelle (p.A211V) du gène codant VGLUT3 humain est, en effet, responsable de cette surdité de perception qui est progressive et qui touche les hautes fréquences en premier. La pénétrance est de 77% pour les sujets âgés de plus de 20 ans et de 80% pour ceux de plus de 30 ans (Ruel *et al.*, 2008). Cette surdité est très proche cliniquement de la presbycousie. En effet, la presbycousie est une baisse de l'audition, lentement évolutive, survenant chez des sujets âgés de plus de 50 ans. Elle est la principale cause de surdité chez l'homme. Elle entraîne une chute sélective dans les fréquences aiguës, celles qui sont les plus utilisées pour la compréhension.

L'étude de cette mutation est réalisée sur la lignée de souris exprimant cette mutation (VGLUT3^{A224V/A224V}).

La caractérisation du système auditif de cette souris est effectuée dans l'équipe du Pr Puel par Stéphanie Miot (étudiante en thèse en cotutelle U Montpellier et Paris VI) et Dr Jing Wang ainsi que par Marie Guillet.

L'étude de cette mutation permettra d'avoir une meilleure compréhension du rôle de VGLUT3 dans la cochlée ainsi qu'une meilleure compréhension de la presbycousie afin de pouvoir proposer de nouvelles cibles thérapeutiques. Notre étude sur le système nerveux centrale est très complémentaire de celle portant sur le système auditif.

Dans cette annexe, sont présentés quelques uns des résultats obtenus au cours de l'étude du système auditif de cette souris VGLUT3^{A224V/A224V} par le groupe du Pr Puel.

Le modèle murin a, tout d'abord, été validé en vérifiant que le phénotype auditif des souris VGLUT3^{A224V/A224V} était bien similaire à celui décrit chez l'homme (à savoir une perte auditive progressive). Pour cela, les potentiels évoqués auditifs du tronc cérébral auditif (ABR, *Auditory Brainstem Response*) ont été mesurés à différents âges chez les souris WT, VGLUT3^{A224V/+} et VGLUT3^{A224V/A224V}. Ce test consiste à enregistrer les réponses suite à

l'application d'un son pur d'une fréquence et d'une intensité données (**Figure 1**). Les 5 ondes observées correspondent aux 5 relais que font les voies auditives entre le neurone auditif primaire et le cortex auditif. Ces ABRs mesurent et renseignent sur le fonctionnement de l'ensemble de la voie auditive.

Les enregistrements ont été faits avec les fréquences 2, 4, 6, 8, 16 et 32 kHz. Ce test recherche les ondes cérébrales qui indiquent qu'un son d'un certain ton et d'une certaine sonorité est perçu par le cerveau. Dès que l'on ne voit plus d'onde, on considère que l'on est au seuil auditif. Il a ainsi été observé qu'à l'âge de 2 mois, les souris $VGLUT3^{A224V/A224V}$ entendent aussi bien que les WT et les $VGLUT3^{A224V/+}$. En revanche, à 6 mois, une élévation des seuils auditifs chez les mutants comparés aux souris sauvages est observée. Cette élévation des seuils augmente encore à 12 mois. Les souris $VGLUT3^{A224V/A224V}$ entendent moins bien à partir de 6 mois et cette surdité s'accroît avec l'âge contrairement aux WT dont une élévation des seuils auditifs est observée à partir de 12 mois. Cela est dû au vieillissement normal du système auditif. Toutefois, cette élévation des seuils chez le WT est moins importante que celle observée chez les souris mutantes.

Les souris $VGLUT3^{A224V/A224V}$ présentent donc bien une surdité progressive. Cette expérience valide notre lignée de souris pour l'étude du phénotype auditif causé par la mutation humaine p.A211V sur VGLUT3.

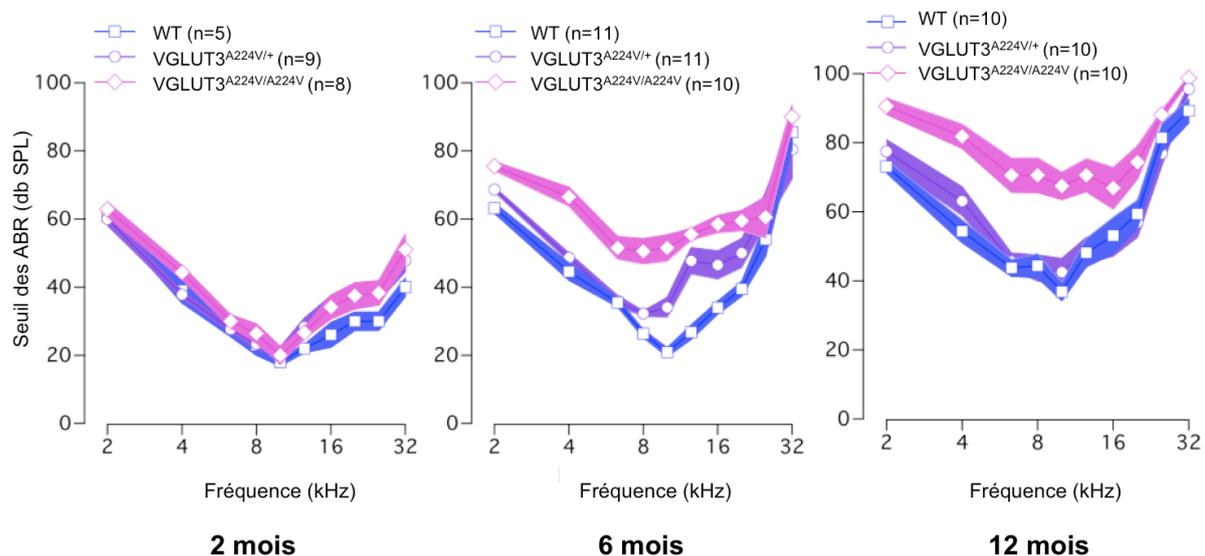


Figure 1. Mesure des ABRs à différentes fréquences et à différents âges chez les souris WT, $VGLUT3^{A224V/+}$ et $VGLUT3^{A224V/A224V}$

Le seuil des ABRs des $VGLUT3^{A224V/A224V}$ est similaire à celui des WT et $VGLUT3^{A224V/+}$ à 2 mois. A 6 mois, une élévation des seuils auditifs est observée chez les souris $VGLUT3^{A224V/A224V}$. A 12 mois, cette élévation s'accroît. Le n entre parenthèse correspond au nombre d'animaux par génotype.

Les émissions oto-acoustiques (DPOAE) ont ensuite été mesurées. L'amplitude des DPOAEs est un excellent indicateur de l'état des cellules sensorielles de l'oreille interne. C'est particulièrement vrai pour les cellules ciliées externes car les Produits de Distorsion des Oto-Émissions Acoustiques (DPOAE) sont créés par la non-linéarité des mécanismes amplificateurs actifs des cellules ciliées externes de l'organe de Corti. L'amplitude des DPOAE est similaire entre les différents génotypes de souris à 2, 6 et 12 mois (**Figure 2**). Les souris $VGLUT3^{A224V/A224V}$ conservent donc leurs produits de distorsion acoustiques indiquant que les CCE seraient toujours fonctionnelles. On peut donc en conclure que la surdité observée ne provient pas d'un problème au niveau des CCE.

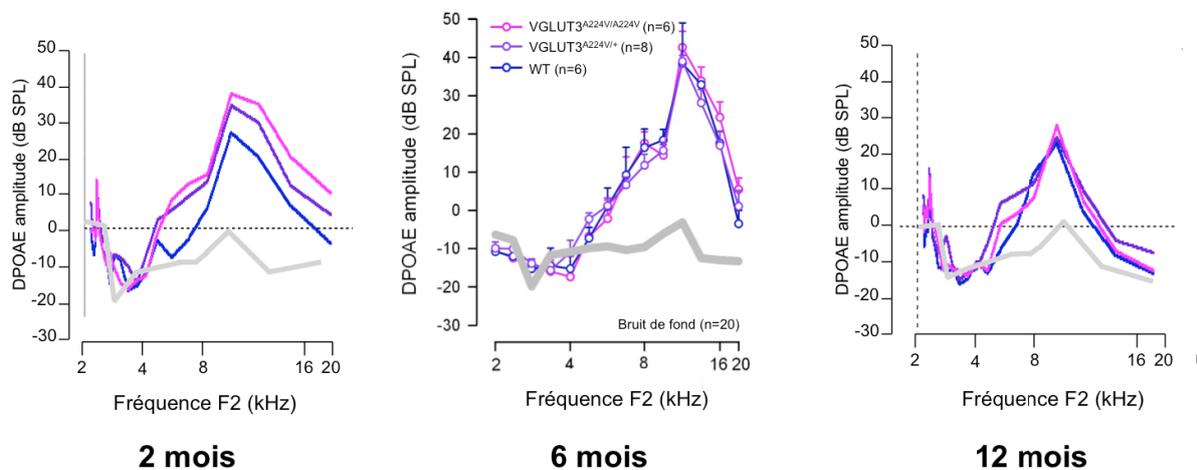


Figure 2. Enregistrement des DPOAEs à 2, 6 et 12 mois.

Aucune différence significative d'amplitude n'est observée entre les différents génotypes à 2, 6 et 12 mois. (6 WT, 8 $VGLUT3^{A224V/+}$, 6 $VGLUT3^{A224V/A224V}$).

Des études d'anatomie ont également été réalisées. Les CCE et les CCI ont été observées en microscopie électronique à balayage à 6 mois (**Figure 3**). La morphologie des cils des CCE des $VGLUT3^{A224V/A224V}$ est semblable à celle des WT. Par contre, une différence de morphologie est observée entre les CCI des $VGLUT3^{A224V/A224V}$ et des souris WT. En effet, les cils des CCI des $VGLUT3^{A224V/A224V}$ sont fusionnés et beaucoup moins nombreux que chez les WT (**Figure 3B**).

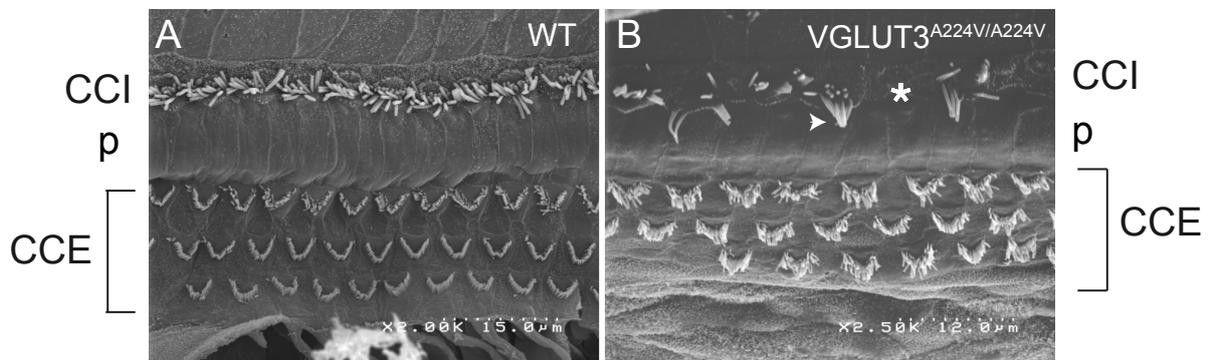


Figure 3. Morphologie des CCE et CCI en microscopie électronique à balayage.

(A) Les stéréocils des trois rangées de CCE des souris WT sont bien organisés ainsi que ceux de la rangée des CCI. (B) Les trois rangées de stéréocils des CCE des souris $VGLUT3^{A224V/A224V}$ sont bien organisées. En revanche, les cils des CCI sont fusionnés entre eux (tête de flèche). Il manque des stéréocils dans la rangée des CCI (astérisque). Abréviations : CCE, cellules ciliées externes ; CCI, cellules ciliées internes ; p, cellules piliers.

Cette mutation a donc pour effet, d'altérer profondément la morphologie des stéréocils des CCI. En effet, comme le montre les images de microscopie électronique de la **figure 4**, les cils des CCI des souris $VGLUT3^{A224V/A224V}$, en plus d'être fusionnés entre eux, « pénètrent » dans la cellule comme s'ils n'étaient plus soutenus par la plaque cuticulaire (**Figure 4B**).

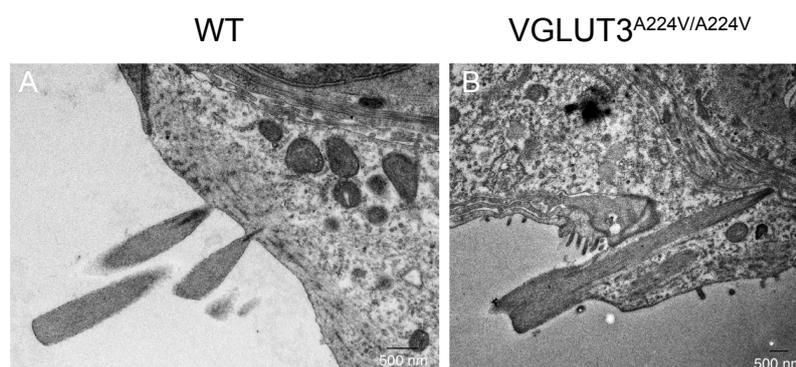


Figure 4. Coupe de l'apex d'une cellule ciliée interne au niveau de la plaque cuticulaire. Visualisation de l'insertion des cils au niveau de la plaque cuticulaire d'une CCI de souris WT (A) ou $VGLUT3^{A224V/A224V}$ (B).

2

Cette mutation a donc des effets importants sur les CCI des souris VGLUT^{A224V/A224V}. Leurs cils fusionnent et présentent une insertion anormale dans la membrane. Il semblerait également que certaines synapses à ruban aient une morphologie anormale telle que des rubans surnuméraires, une forme en bâtonnet et non arrondie (données non montrées). Tous ces résultats montrent que les CCI sont en souffrance. Sur la **figure 3** (représenté par un astérisque), on observe même une perte du nombre de CCI. Ces cellules meurent donc prématurément.

VGLUT3 est le seul des trois VGLUTs à être exprimé dans les CCI d'où le fait que les souris VGLUT3-KO soient sourdes (Seal *et al.*, 2008; Ruel *et al.*, 2008). VGLUT3 est exprimé aussi bien au niveau basal qu'au niveau apical de la CCI. L'expression de VGLUT3 a été quantifiée en western blot (**Figure 5**). On observe une baisse de l'expression de VGLUT3 chez les souris VGLUT3^{A224V/+} (-39%) et VGLUT3^{A224V/A224V} (-68%) dès l'âge de 2 mois. Cette baisse s'accroît avec l'âge.

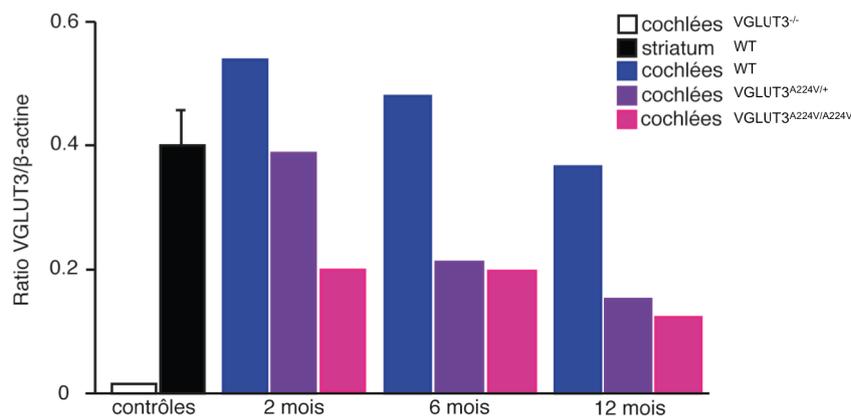


Figure 5. Quantification par western blot de VGLUT3 dans la cochlée des souris WT, VGLUT3^{A224V/+} et VGLUT3^{A224V/A224V} à 2, 6 et 12 mois.

Comme dans le cerveau, cette mutation provoque donc une diminution de l'expression de VGLUT3.

Le remplissage vésiculaire et l'exocytose de glutamate ont été mesurés chez les souris WT et VGLUT3^{A224V/A224V} en électrophysiologie. Cette mutation n'affecte ni le remplissage ni l'exocytose de glutamate par les CCI. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans le système nerveux central.

Le processus par lequel les CCI meurent a ensuite été caractérisé. Des vacuoles d'autophagie ont été observées en microscopie et des westerns blot ont montré qu'il y avait

une augmentation de la forme phosphorylée de becline 1 chez les mutants par rapport aux WT. Cela suggère donc que les CCI meurent par autophagie.

En revanche, nous ne savons pas encore pourquoi les CCI meurent et pourquoi par autophagie. La becline 1 phosphorylée joue un rôle très important dans l'autophagie. Elle peut-être phosphorylée par une kinase appelée DAPK (*death-associated protein kinase*) lorsqu'elle est activée et donc sous forme phosphorylée. La DAPK est phosphorylée par un complexe comprenant la culline 3. Or, cette protéine est détectée par le crible double hybride comme étant un interactant de VGLUT3.

Se pose alors la question : est-ce que VGLUT3 en interagissant avec la culline 3 induit une modification d'interaction de la culline 3 avec la DAPK ? Cette interaction pourrait provoquer une augmentation de la forme becline 1 phosphorylée et entraînerait ainsi une autophagie. C'est une hypothèse qui est à l'heure actuelle testée par Stéphanie Miot. Il est aussi important de noter que la maladie et la perte cellulaire est entièrement spécifique des CCI et n'est pas du tout observée au niveau des neurones VGLUT3-positifs du SNC.

