

Rôle du transporteur vésiculaire du glutamate de type 3 (VGLUT3) dans la réponse au stress hypoxique néonatal et la surdité DFNA25

Stéphanie Miot

► To cite this version:

Stéphanie Miot. Rôle du transporteur vésiculaire du glutamate de type 3 (VGLUT3) dans la réponse au stress hypoxique néonatal et la surdité DFNA25. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT: 2017PA066011. tel-02048943

HAL Id: tel-02048943 https://theses.hal.science/tel-02048943

Submitted on 26 Feb 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.





UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

École doctorale Cerveau, Cognition, Comportement

Au sein des unités de recherche

INSERM U1130 CNRS UMR 8246 Neurosciences Paris Seine équipe *Systèmes glutamatergiques normaux et pathologiques*

INSERM UMR 1051 Institut des Neurosciences de Montpellier équipe *Surdités acouphènes et thérapies*

RÔLE DU TRANSPORTEUR VÉSICULAIRE DU GLUTAMATE DE TYPE 3 (VGLUT3) DANS LA RÉPONSE AU STRESS HYPOXIQUE NÉONATAL ET LA SURDITÉ DFNA25

Présentée par **Stéphanie MIOT**

Thèse de doctorat de Neurosciences

Dirigée par le Dr Salah EL MESTIKAWY et le Pr Jean-Luc PUEL

Soutenue et présentée publiquement le 24.02.2017

devant un jury composé de

Mr. Christian GESTREAU MCU-HDR, Aix Marseille Université	Rapporteur
Mr. Philippe VERNIER, DR, Université Paris Sud	Rapporteur
Me. Amaraia BAGHDADLI, PUPH, CHU Montpellier	Examinatrice
Me. Laurence BODINEAU, PU, UPMC	Examinatrice
Mr. Claude JEANDEL PUPH, CHU Montpellier	Examinateur
Mr. Marc VERNY PUPH, CHU La Pitié Salpétrière	Examinateur
Mr. Salah EL MESTIKAWY, DR1 CNRS, Professeur, Université Mc Gill	Co-directeur de thèse
Mr. Jean-Luc PUEL PU, Université Montpellier 1	Co-directeur de thèse

À mes grands-mères,

« Seul le présent est, l'avant et l'après ne sont pas ; mais le présent concret est le résultat du passé et il est plein de l'avenir. Le Présent véritable est, par conséquent, l'éternité »

« Même quand on a tout vu, la curiosité invente du nouveau »

Martin Heidegger, Être et temps, 1927

« All things are ready, if our minds be so »

William Shakespeare, Henri V, Act. 4, scene 3, 1599

Je remercie messieurs Christian Gestreau et Philippe Vernier d'avoir accepter d'être les rapporteurs de cette thèse.

Je remercie les membres de mon jury d'avoir pris le temps de lire ce mémoire et pour leur jugement.

Je remercie très chaleureusement Monsieur Salah El Mestikawy, ainsi que Monsieur le Professeur Jean-Luc Puel, en leur qualité de directeurs de thèse, pour leurs enseignements, leur soutien, leurs conseils et la motivation qu'ils m'ont insufflée. Je tiens à souligner toute l'estime et l'affection que je leur porte. Salah m'a pour ainsi dire vue grandir dans les laboratoires et je le remercie profondément pour sa bienveillance depuis ces 11 années de travail et surtout d'amitié partagées. Jean-Luc m'a accueillie avec toute la chaleur et l'intelligence qui le caractérisent dans son laboratoire, et je le remercie très sincèrement pour ses encouragements et sa grande humanité.

Je remercie très profondément Stéphanie Daumas qui m'a encadrée et aidée dans le projet SAMP8. Merci pour son intelligence, sa bonne humeur, ses conseils de maman, nos discussions pour refaire le monde, et son aide et son optimisme très précieux dans l'adversité face aux congélateurs. Je tiens à souligner toute l'admiration que je lui porte et le grand plaisir que j'ai à travailler avec elle. Merci également à Nida Chabbah pour son aide inestimable pour réaliser et quantifier les IAR.

Je remercie très sincèrement Régis Nouvian pour son aide, ses encouragements, ses enseignements, sa finesse d'esprit, sa gentillesse et son sens de l'humour. Ce travail n'aurait jamais pu être terminé sans lui et je lui en suis très reconnaissante.

Je remercie très chaleureusement Jing Wang, pour son sourire, ses conseils, et les nuits passées ensemble à opérer des cochons d'Inde.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Bruno Giros, directeur de l'unité INSERM U1130, qui m'accueille toujours avec une grande bienveillance et beaucoup de générosité dans son laboratoire.

Je remercie très sincèrement Monsieur le Professeur Claude Jeandel, chef du service clinique dans lequel je travaille, pour avoir prodigué tout au long de mon internat ses enseignements et son soutien. Je tiens à souligner toute l'estime que je lui porte et le plaisir que j'ai à travailler dans son service pour les années à venir.

Je remercie très profondément Madame la Professeur Amaria Baghdadli, directrice de ma thèse de médecine. Un très grand merci pour tout ce qu'elle m'a appris et m'apprend encore, pour son affection, ses conseils, son soutien, et son enthousiasme contagieux. Je tiens à souligner toute l'admiration que je lui porte et le grand plaisir que j'ai à travailler avec elle.

Je remercie très sincèrement Monsieur le Professeur Hubert Blain pour ses enseignements et son soutien, et pour nos discussions scientifiques enrichissantes.

Je remercie très profondément tous les chercheurs que j'ai croisés, pour leur gentillesse, leurs enseignements, et la passion qu'ils mettent tous les jours dans leur travail : Marie Gillet, Gaston Sendin, Lauriane Ramet, Michel Eybalin, Marc Lenoir, Sabine Ladrech, Guy Rebillard, Jérôme Bourien, Benjamin Delprat, Odile Poirel, Eleni Tzavara, Catalina Bettencour, Stéphanie, Amaia, Nina, Marion et Elsa, Bénédicte Amilhon, Eléa... et toutes les équipes de l'INM et de l'institut Paris Seine avec lesquelles j'ai travaillé.

Je remercie L'École de l'INSERM-Liliane Bettencourt, Aude Desanges de la fondation L'Oréal, et l'équipe du programme *For Women in Sciences* pour leurs encouragements et l'aide financière qu'ils m'ont apportée. Un grand merci à Anne-Marie Laffaye, Christian Bréchot, Barro Sow, Cécile Burban, Jean-Claude Chottard et Philippe Asher, sans qui je ne me serais jamais lancée dans une thèse de sciences. Merci au Professeur Jean-Paul Saint André pour m'avoir permis de suivre ce double cursus si enrichissant et passionnant.

Je remercie le Professeur Philippe Courtet pour ses enseignements et ses encouragements tout au long de mon internat. Merci aux personnes que j'ai croisé tout au long de mon internat : au Docteur Fabrice Jollant, maître parmi les maîtres, au Professeur Jean-Philippe Boulenger pour ses enseignements, ses encouragements et sa grande humanité, à la Professeur Michèle Maury pour ses enseignements et son indéfectible soutien, à la Professeur Diane Purper Ouakil pour ses enseignements et sa douceur, au Docteur Charles Alezrah pour ses enseignements et sa bienveillance, au Docteur Isabelle Maurs Ferrer pour ses enseignements et ses encouragements dans la voie de la gérontopsychiatrie, au Docteur Nathalie Franc pour son amitié et ses enseignements, aux Docteurs Denis Arbault, Jalel Ben Ayed, et toute l'équipe du secteur 4 du CHS de Thuir, aux docteurs Ioana Dragonu, Radu Florea, Maria Pop, Marie Olié, Emilie Olié, Fanny Molière, Céline Floret, Adela Ionita, et toute l'équipe de psychologie médicale et Nadia...

Merci au docteur Priscille Pons pour ses enseignements, sa bonne humeur et sa bienveillance, au docteur Henri Leroux pour son humour, au Docteur Aurélie Terminet pour ses encouragements, sa bonne humeur et ses enseignements, au Docteur Béatrice Celton, au docteur Stéphanie Thomas, aux docteurs Marie-Suzanne Léglise, Christian Geny, René Cros, Grégory Baptista, Ernestine Ferreira, Chokri Boubakri, Hortense Catimel, et à toute l'équipe du centre Antonin Balmès...

Merci à la formidable équipe du Centre Ressource Autisme en Languedoc Roussillon, au docteur Vincent Henry pour ses enseignements et ses encouragements, au docteur Fanny Grossman, au docteur Julie Majorelle, au docteur Aurore Blanc-Perrin, au docteur Amandine Contard...

Merci aux docteurs Bonnecuelle, Bonaz et Aspe pour leurs enseignements et leur bienveillance.

Merci à mes formidables internes, Sophie, Oriane, Emilie, Agnès, Elodie, Johnathan, Monia, Samuel...

Je remercie très chaleureusement Emmanuelle Aubert, pour son travail de codirection de mon mémoire de DES, ses conseils, son intelligence et sa très précieuse amitié. Merci à Flo pour ses petits plats et son sourire.

Un très grand merci à Alexandra MacGregor, Sébastien et Olivier pour leur irremplaçable amitié, leurs encouragements, et les week-end détente piscine-brunch, merci d'avoir testé mes recettes avec autant de confiance.

Un immense merci à Laurence Cauchard pour son inestimable amitié, doux parangon toujours présente et bienveillante.

Un très grand merci à Marilyn Wyart pour sa très précieuse amitié, la soirée sac poubelle, nos fous rires, son intelligence et son chat.

Un grand merci à Amélie Frangeul pour sa gentillesse, son amitié et son optimisme. Un grand merci à Laurent Ceratto et sa petite famille.

Enfin je remercie ma famille et mes amis : Lulu et les boutiques du 11ème, Nathalie et Christian pour leur délicieuse raclette et les longueurs de bassin, l'équipe du MANUC, les copains de Nantes, Alexis le chaman grec, mes proches, Bibiche, Bruno et Margaux, Papou et Manet toujours présents qui m'ont permis de mener à bien ce travail, mes parents, mon époux et ma fille pour leur patience et leur soutien. Merci à mes sœurs d'être toujours présentes, pour notre complicité et nos moments pour refaire le monde et la science, à mes formidables beaux frères Olivier et Nail, à Romane, Côme, Adélie, Domitille, pour leur bonne humeur, à Emilie et Thibaut.

Un immense merci à Charles sans qui je ne serais jamais parvenue jusque là, pour son amour et son indulgence. Merci à notre « cocodoute » d'amour Esther pour sa patience, ses petits mots rigolos et son sens déjà aiguisé des sciences. Je vous dédie ce travail.

Enfin je ne remercie pas Martin Bouygues, ses sous-traitants bruyants, ni les climatisations défectueuses.

LISTE DES ABBREVIATIONS	10
INTRODUCTION GENERALE	14
1 DÉVELOPPEMENT NEONATAL NORMAL ET PATHOLOGIOUE	17
1.1. MATURATION DU SYSTÈME RESPIRATOIRE NÉONATAL	17
1.1.1. GÉNÉRALITÉS	17
1.1.2. SÉROTONINE ET MATURATION RESPIRATOIRE	18
1.2. PATHOLOGIES RESPIRATOIRES NÉONATALES : LE CAS DU SYNDROME DE MORT SU	JBITE
DUNOURRISSON	21
2. VIEILLISSEMENT NORMAL ET PATHOLOGIQUE	23
2.1. MÉCANISMES CELLULAIRES IMPLIQUÉS DANS LE PROCESSUS DE VIEILLISSEMENT Erreur ! Signet non défini.	
2.1.1. LA NÉCROSE PROGRAMMÉE	24
2.1.2. LA SÉNESCENCE	25
2.1.3. L'APOPTOSE	27
2.1.4. L'AUTOPHAGIE, UNE VOIE DE SURVIE CELLULAIRE	31
2.1.5. L'AUTOPHAGIE, UNE VOIE DE MORT CELLULAIRE ?	36
2.2. PATHOLOGIES AU COURS DU VIEILLISSEMENT	42
2.2.1. TROUBLES NEURO-COGNITIFS MAJEURS	42
2.2.1.1. EPIDEMIOLOGIE ET CLINIQUE	42
2.2.1.2. PHYSIOPATHOLOGIE	44
2.2.2. PRESBYACOUSIE	46
2.2.2.1. RAPPELS ANATOMO-FONCTIONNELS	46
2.2.2.2. EPIDEMIOLOGIE EI CLINIQUE	50
2.2.2.3. PRISIOPATROLOGIE 2.2. COUDIC CAMDO MODÈLE D'ÉTUDE DU VIEU LICCEMENT CÉDÉDDAL ET CENCODIEL	50
2.5. SOURIS SAMPO, MODELE D'ETODE DO VIEIELISSEMENT CEREDRAL ET SENSORIEL PRÉCOCE	53
2 3 1 GENÈSE DE LA LIGNÉE MURINE SAM	53
2.3.2. PROFIL COGNITIF ET COMPORTEMENTAL	55
2.3.3. PROFIL NEURO-PATHOLOGIOUE	56
2.3.4. PROFIL NEURO-CELLULAIRE	58
2.3.5. PROFIL NEUROCHIMIQUE	59
2.3.6. PROFIL NEURO-PHARMACOLOGIQUE	61
3. VGLUTS	64
3.1. GÉNÉRALITÉS SUR LA NEUROTRANSMISSION	64
3.2. GÉNÉRALITÉS SUR LES VGLUTS	65
3.2.1. DÉCOUVERTE DES TROIS VGLUTs	65
3.2.2. STRUCTURE	66
3.2.3. PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES	67
3.2.4. ONTOGENESE ET DISTRIBUTION ANATOMIQUE	70
3.3. FONCTIONS DES VGLUTS	74
3.3.1. EXPRESSION DES VGLUTS DANS DES NEURONES NON GLUTAMATERGIQUES	74
3.3.1.1. NEURONES DOPAMINERGIQUES ET VGLUTZ	74

3.3.1.2. NEURONES SÉROTONINERGIQUES ET VGLUT3	75
3.3.1.3. NEURONES CHOLINERGIQUES ET VGLUTs	76
3.3.1.4. NEURONES GABAERGIQUES ET VGLUTs	77
3.3.2. CO-PHENOTYPE GLUTAMATERGIQUE ET SYNERGIE VESICULAIRE	78
3.3.3. IMPLICATION DES VGLUTS DANS LE SYSTÈME NERVEUX CENTRAL	79
3.3.4. IMPLICATION DES VGLUTS DANS L'OREILLE INTERNE	80
3.3.4.1. CELLULE CILIÉE INTERNE ET VGLUTS	80
3.3.4.2. NEURONE AUDITIF PRIMAIRE DE TYPE I ET VGLUTS	82
HYPOTHESES DE TRAVAIL	85
ARTICLE #1 ROLE DE VGLUT3 DANS L'ADAPTATION AU STRESS HYPOXIQUE NEONATAL	88
ARTICLE #2 ROLE DE VGLUT3 DANS LA SURDITE DFNA25 : IMPLICATION DANS LE VIEILLISS PREMATURE DE LA CELLULE CILIEE INTERNE ET LE PROCESSUS DE MORT AUTOPHAGIQUE	SEMENT 108
ANNEXE #1 EFFET D'UN INHIBITEUR DES VGLUTS SUR L'AUDITION	163
<u>ANNEXE #2</u> INFLUENCE DE L'ENVIRONNEMENT ENRICHI SUR L'EXPRESSION DES VGLUTS AU <u>DU VIEILLISSEMENT CEREBRAL PRECOCE (RESULTATS PRELIMINAIRES)</u>	J COURS <u>170</u>
CONCLUSION GÉNÉRALE	<u>191</u>
RÉFÉRENCES	<u>194</u>
TABLE DES ILLUSTRATIONS	238

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

Aβ : protéine β-amyloïde

Ach : acétylcholine

AMPA-R : aminométhylphosphonic acid receptor

APA : american psychiatric association

Apaf1 : apoptotic peptidase activating factor 1

APP : amyloïd precursor protein

Atg : autophagy related genes

AVC : accident vasculaire cérébral

Bak : Bcl-2 antagonist Killer Bax : Bcl-2 Associated X protein Bcl-XL : B cell lymphoma extra large BHE : barrière hémato encéphalique BH3 : Bcl-2 homology domain BID : BH3 Interacting Domain death agonist Bik : Bcl-2 interacting killer BIM : Bcl-2 interacting mediator of cell death BMF : Bcl-2 modifying factor BNPI : brain specific Na⁺ dependent inorganic phosphate type I

CCCP : carbonyl-cyanide-m-chlorophényldrazone

CCD : coiled-coiled domain

CCE : cellule ciliée externe

CCI : cellule ciliée interne

CTBP2 : corepressor C-terminal protein binding protein 2

DA : dopamine DAPK : death associated protein kinase DFCP1 : double FYVE-domain-containing protein 1 DIDS : acide 4,4'-diiothioganatostilbène-2,2'-disulfonique DIF1 : damage regulated import facilitator DNF : dégénérescence neurofibrillaire DNPI : differenciation associated Na⁺ dependent inorganic phosphate transporter DR : death receptor Drpr : draper

ECD : conserved domain E. Coli : Escherichia Coli EE : environnement enrichi EPM : elevated plus maze EPSP : excitatory post synaptic potential

Fas-L: Fas-Ligand

GABA : acide γ-amino-butirique GlpT : glycerol 3 phosphate transporter Glut : glutamate

HRK : harakiri protein HVG : hypoxic ventilatory declive

IAPs : inhibitors of apoptotic proteins IGF-1 : insuline growth factor type 1

JNK1 : jun kinase 1

LAMP-2A : lysosome associated membrane protein type 2 LC : locus coeruleus LTP : long term potentiation lVGLUT : lamproie VGLUT

NMDA-R : N-méthyl-D-aspartate receptor Noxa : NADPH oxidase activator Mcl1 : myeloid celle leukemia 1 protein mGLUR : récepteurs glutamatergiques métabotropiques MLKL : mixed lineage kinase domain like protein MSN : syndrome de mkrt subite du nourrisson mTOR : mammalian target of rapamycin MWM : Morris water maze

NAF1 : nutrient deprivation autophagy factor 1 NE : noradrénaline NEM : N-éthylmaleimide NES : nuclear export signal

pBt : preBötzinger complex PE : phosphatidyl ethanolamine PI3K : phosphatidyl inositol 3 phosphate kinase PT : probe test PUMA : p53 Upregulated Modulator of Apoptosis

RIHM : RIP homology interaction motif RIP3 : receptor interacting kinase 3 ROS : reactiv oxygen species rpF : respiratory parafacial group RRG : respiratory rythm generators RTN : retrotrapezoïd nucleus

SAMP : senescence accelerated mouse prone SAMR : senescence accelerated mouse resistant SLA : sclérose latérale amyotrophique

SLC : Solute Carriers

SN : substance noire

SNARE : soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor

SPCD : symptômes psycho-comportementaux liés aux démences

SRM : spatial reference Morris SV : synaptic vesicle

TNC : trouble neurocognitif majeur TNF : tumor necrosis factor TRAIL : TNF-related apoptosis inducing ligand TST : tail suspension test

ULK1/2 : unc 51 like kinase ½ UVRAG : UV radiation resistance associated gene protein

V-ATPase : vacuolar ATPase VGLUTs : vesicular glutamate transporters VMAT : vesicular monoamine transporter Vps34 : vacuolar sorting protein 34

WIPI1 : WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 1

5-HT : sérotonine

INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'adaptabilité est un terme usité de nos jours dans de nombreux domaines, tant socioéconomiques que médico-biologiques. Si l'on en croit la définition académique, l'adaptabilité est la *capacité à s'adapter*. Adapter consiste *à ajuster une chose à une autre*. En biologie s'adapter est synonyme de *procéder à son adaptation*. Et l'adaptation est *l'action d'adapter, ou le processus par lequel un être vivant se transforme pour s'acclimater au milieu qui lui est imposé* (Littré, 2013). Nous pouvons considérer cette notion de *milieu* sous un angle plus large, en y intégrant à la fois l'échelle plus vaste du temps ainsi que le milieu physique extérieur à l'être vivant, mais également l'échelle plus petite du *milieu intérieur* (Bernard, 1878) de l'organisme jusqu'au milieu intracellulaire.

Lors de la trajectoire développementale d'un individu, deux moments essentiels impliquent cette notion d'adaptabilité : lors de la vie néonatale, et lors du processus de vieillissement.

Pour le nouveau-né, le passage de la vie in utero à la vie néonatale est un moment critique. Les échanges gazeux se modifient et l'homéostasie établie au cours de la vie *in utero* est considérablement bouleversée. L'adaptation du nouveau né dans ses premiers mois de vie, notamment sur le plan respiratoire et thermique, conditionne sa survie.

Le vieillissement d'un organisme est un processus physiologique concourant à l'ensemble des modifications physiologiques durables survenant après la phase de maturité. Il est progressif, universel, inéluctable et irréversible (Belmin, 2005). Une des caractéristiques du vieillissement consiste en la perte de flexibilité, au niveau moléculaire, cellulaire, tissulaire, ou de l'organisme dans son ensemble tant sur le plan physique que psychologique. Cette diminution des capacités d'adaptation au cours de l'avancée en âge peut aboutir à un état connu en gériatrie sous le terme de fragilité : un sujet âgé fragile est plus vulnérable. Un stress mineur ou une exposition à une situation nouvelle pourra alors entraîner des conséquences majeures telles qu'une perte d'autonomie, des chutes, une hospitalisation voire le décès du patient âgé fragile (Clegg, Young et al. 2013).

Il semble donc essentiel de se pencher sur la question des éléments qui concourent à une adaptation réussie au cours de la vie. Quels sont les marqueurs de cette adaptabilité ? Existe-t-il des processus ou des facteurs communs lors de l'adaptation à ces différents âges de la vie ?

Dans cette introduction générale, nous décrirons d'abord quelques processus impliqués dans le développement néonatal et le vieillissement, ainsi que quelques pathologies associées à ces stades de la vie. Puis nous exposerons des éléments bibliographiques concernant les transporteurs vésiculaires du glutamate (VGLUTs). Ces protéines dont nous révèleront le rôle de potentiels senseurs de l'adaptabilité aux deux extrémités de la vie dans les travaux de recherche exposés par la suite.

1. DÉVELOPPEMENT NÉONATAL NORMAL ET PATHOLOGIQUE

De très nombreux processus physiologiques sont impliqués dans le développement néonatal. Nous avons choisi de ne nous pencher que sur le développement respiratoire néonatal et sur un syndrome affectant la respiration du nouveau né, celui de la mort subite du nourrisson.

Dans la vie intra-utérine, le poumon de l'embryon mammifère n'assure aucun échange gazeux. L'hématose est assurée par le placenta et est donc exclusivement dépendante de la mère. Ce n'est qu'au passage à la vie extra-utérine que le système respiratoire du nouveau né doit faire preuve d'adaptation. Le travail, la rupture de la poche des eaux et les modifications de l'organisme maternel qui en découlent sont autant de stimuli physiques, sensoriels et neuroendocriniens permettant de provoquer chez le nouveau né son adaptation respiratoire à la vie extra-utérine. Les hormones de stress, dont le cortisol, favorisent la synthèse et la libération du surfactant alvéolaire. La compression de la cage thoracique lors du passage du détroit inférieur du bassin maternel permet l'expulsion du liquide amniotique des poumons du nouveau né. Enfin, le contact de l'air avec le visage et la filière laryngée du nouveau né force l'inspiration et provoque son premier cri qui conditionne la capacité pulmonaire résiduelle fonctionnelle (Haddad, 2004).

Par la suite, pour que le nouveau né survive, son système respiratoire doit rapidement maturer et se stabiliser.

1.1. MATURATION DU SYSTÈME RESPIRATOIRE NÉONATAL

1.1.1. GÉNÉRALITÉS

La régulation de la fréquence et de l'amplitude respiratoire est un élément important de la survie du nouveau né. Anatomiquement, plusieurs entités interviennent dans cette régulation. Au niveau périphérique, les muscles laryngés et le diaphragme sont essentiels. Au niveau central un certain nombre de réseaux neuronaux permettent d'interpréter les échanges gazeux (pH sanguin, taux d'oxygène dans le sang ou pO_2 et taux de dioxyde de carbone dans le sang ou pCO_2) et d'adapter la dynamique respiratoire à ces derniers. Enfin la thermogenèse intervient également dans ces régulations, en modulant la consommation d'oxygène.

Le rythme respiratoire est intimement lié à l'activité de générateurs de rythme respiratoires dit RRG. Il s'agit de deux circuits couplés et en constante interaction : le complexe préBötzinger (pBt) et le groupe respiratoire parafacial (rpF) associé au noyau rétrotrapézoïde (RTN) (Thoby-Brisson, Karlen et al. 2009). Le RRG fonctionne comme un pacemaker (Wittmeier, Song et al. 2008) et son développement dépend d'une synaptogenèse pré et post natale précise (Bouvier, Thoby-Brisson et al. 2010). Il dépend également de l'expression post natale d'un certain nombre de gènes tels que Phox2B (Amiel, Dubreuil et al. 2009), Maf3 (Blanchi, Kelly et al. 2003) ou encore Teashirt3 (Caubit, Thoby-Brisson et al. 2010). Le RRG reçoit par ailleurs des afférences sérotoninergiques issues du raphé (Hilaire, Voituron et al. 2010) qui influent sur la maturation et le fonctionnement néonatal du RRG (Bras, Gaytan et al. 2008).

La rythmogenèse respiratoire est régulée à partir de E15 chez la souris par les complexes pBt et la moelle épinière ventro-latérale (Abadie, Champagnat et al. 2000). Cette rythmogenèse se poursuit lors de la vie extra-utérine, mais sur un rythme d'abord irrégulier, qui se stabilise entre E18 et P2 chez la souris (Viemari, Burnet et al. 2003). Entre P3 et P9, la fréquence respiratoire et la ventilation s'accroissent durant une période de grande vulnérabilité, dite aussi période critique (Viemari, Burnet et al. 2003). Par la suite, le système se stabilise et fait preuve d'une plus grande robustesse.

De nombreux neurotransmetteurs interviennent dans ce processus de maturation préet post-natale : le glutamate, le GABA, la noradrénaline mais aussi la sérotonine (Hilaire and Duron 1999) (Hilaire 2006).

1.1.2. SÉROTONINE ET MATURATION RESPIRATOIRE

La sérotonine (5-HT) est impliquée à plusieurs niveaux dans la maturation du système respiratoire.

En périphérie, elle joue un rôle dans le développement des motoneurones, notamment ceux contrôlant la musculature laryngée essentielle, comme nous l'avons vu plus haut, dans l'adaptation du nouveau né à l'environnement extra-utérin (Sun, Berkowitz et al. 2002).

Au niveau central, la 5-HT joue un rôle dans la synaptogenèse néonatale. Au sein du système nerveux central, le développement néonatal est marqué par une phase de synaptogenèse intense, au cours de périodes dites critiques, notamment dans les régions cérébrales impliqués dans les modalités sensorielles. La croissance des axones et des dendrites neuronaux est couplée à une sélection et une mort de nombreuses synapses afin de limiter les réseaux redondants ou aberrants. La 5-HT semble jouer ici un rôle essentiel. L'augmentation de la synthèse de 5-HT altère par exemple la ségrégation synaptique dans le cortex visuel (Upton, Salichon et al. 1999). La maturation du système nerveux central dépend de la 5-HT ainsi que de son interaction avec la microglie via le récepteur 5-HT_{2A} (Kolodziejczak, Bechade et al. 2015). Cette maturation synaptique sous la dépendance de la 5-HT intervient dans les réseaux neuronaux centraux, aussi bien sensoriels que respiratoires (Gaspar, Cases et al. 2003).

La 5-HT intervient également dans la sensibilité à l'acidose respiratoire et le contrôle végétatif (Hilaire, Voituron et al. 2010). Un traitement par fluoxétine altère par exemple le métabolisme sérotoninergique et diminue la réponse du RRG à l'acidose (Voituron, Shvarev et al. 2010).

La 5-HT joue aussi un rôle dans la rythmogenèse respiratoire. Les souris n'exprimant plus le facteur de transcription PET (souris Pet-1^{-/-}) sont déficientes en 5-HT (Cummings, Commons et al. 2011 ; Hendricks, Fyodorov et al. 2003). En situation neutre, ces souris présentent une baisse de leur fréquence respiratoire et une augmentation de la fréquence et de la durée des pauses respiratoires. Ces souris sont également plus sensibles à l'hypoxie qui aggrave leurs pauses respiratoires. Il n'est par contre pas observé de modification de leur sensibilité à l'hypercapnie (Erickson, Shafer et al. 2007). La diminution de 5-HT entraîne également une baisse du chémoréflexe laryngé durant le sommeil, augmentant la fréquence et la durée des apnées, via le récepteur 5-HT₃ (Donnelly, Bartlett et al. 2016).

Le développement normal et la maturation des circuits neuronaux gouvernant la respiration néonatale des mammifères dure au delà de la naissance pendant une période critique de quelques jours à quelques semaines (Hilaire and Duron 1999). Le déficit en sérotonine des souris Pet-1^{-/-} semble étendre cette période critique néonatale durant laquelle l'adaptabilité respiratoire à l'environnement est faible, les rendant vulnérables plus longtemps. Il s'agit ici certainement d'une action indirecte de la sérotonine. Elle retarde en effet la maturation du système GABAergique qui d'activateur au cours du développement devient inhibiteur dans la première semaine de vie post-natale chez la souris (Allain, Meyrand et al. 2005). Cela impacte notamment le fonctionnement des neurones du pBt et donc la fréquence respiratoire (Zhang, Barnbrock et al. 2002).

Il existe par ailleurs dans la régulation de la respiration néonatale des éléments comportementaux. L'hypoxie induit un mouvement d'éveil, là où l'hypercapnie n'en provoque pas (Ramirez, Allen et al. 2016). Cette réaction d'éveil doit permettre au nouveau né de réagir à l'hypoxie en réduisant ses apnées. La 5-HT intervient également dans ce contrôle comportemental de la respiration (Trowbridge, Narboux-Neme et al. 2011).

Les souris Pet-1^{-/-} sont enfin plus sensibles aux pathogènes extérieurs, capables d'aggraver leur phénotype respiratoire (Erickson, Shafer et al. 2007). Il semble donc que la 5-HT participe également aux processus épigénétiques pouvant perturber la maturation du système respiratoire du nouveau né.

La 5-HT parait constituer un senseur positif de l'excitabilité des réseaux neuronaux centraux impliqués dans la respiration lors de la période critique post-natale de maturation du contrôle respiratoire. Le dysfonctionnement sérotoninergique favoriserait l'instabilité respiratoire, la baisse de la réponse d'éveil à l'hypoxie, la durée et la fréquence des apnées, et le déficit de réflexe d'auto-ressuscitation (Cummings 2016). Elle serait essentielle pour achever la stabilisation du système respiratoire central après la naissance, mais pas pour son maintien au long cours. Les souris Pet-1-/- présentent un phénotype respiratoire moins sévère avec l'avancée en âge. La 5-HT jouerait donc un rôle au cours de la seule période critique de maturation du contrôle respiratoire.

1. 2. PATHOLOGIES RESPIRATOIRES NÉONATALES : LE CAS DU SYNDROME DE MORT SUBITE DU NOURRISSON

Le syndrome de mort subite du nourrisson (MSN) est la première cause de décès chez les enfants de plus d'un mois dans le monde, et de moins d'un an dans les pays industrialisés (Christensen, Berger et al. 2016; Matthews and MacDorman 2013). Des troubles métaboliques et de la thermorégulation (déficits de la bêta-oxydation des acides gras notamment), et des troubles de la conduction cardiaque ont été impliqués dans la MSN (Christensen, Berger et al. 2016). Un dysfonctionnement du système respiratoire a été mis en cause dans la physiopathologie de ce terrible syndrome. Notamment un défaut de régulation du rythme respiratoire, plus particulièrement en situation extrême d'hypoxie et d'hypercapnie (Kinney, Richerson et al. 2009).

Les neurones du raphé sont chémosensibles (Wang, Tiwari et al. 2001). Or ces mêmes neurones sont plus nombreux et plus immatures chez les nouveaux nés ayant présenté une MSN (Duncan, Paterson et al. 2010). Les neurones sérotoninergiques du raphé semblent présenter une différenciation dysfonctionnelle dans la MSN. Il existe par ailleurs chez le nouveau né humain décédé de MSN une diminution des récepteurs 5-HT_{1A} dans les noyaux du raphé, ainsi qu'une baisse du transporteur de la 5-HT (Paterson, Trachtenberg et al. 2006). Ces mêmes neurones 5-HT du raphé sont en outre probablement l'une des cibles de la nicotine, faisant du tabagisme maternel le premier facteur de risque de MSN (Cerpa, Aylwin Mde et al. 2015). Ainsi la sérotonine, le RRG et la maturation de ce dernier semblent être impliqués dans la physiopathologie de la MSN.

Points clef

Maturation du système respiratoire néonatal et pathologies

> La maturation du système respiratoire néonatal :

- dépend de processus pré et postnataux
- est soumise à une période critique néonatale.
- > Le RRG :
 - est constitué du pBt et du rpF/RTN,
 - est un élément essentiel de la rythmogenèse respiratoire,
 - reçoit des afférences sérotoninergiques issues du raphé.
- > La 5-HT:
 - joue un rôle dans la maturation des motoneurones contrôlant les muscles laryngés,
 - participe à la modulation de la synaptogenèse néonatale,
 - contrôle la maturation des centres respiratoires et notamment du RRG,

- intervient dans la modulation de la durée de la période critique de maturation des centres respiratoires via le GABA,

- contrôle la réponse comportementale à l'hypoxie,

- est impliquée dans l'influence de l'environnement sur la maturation néonatale du contrôle respiratoire.

> Dans le syndrome de mort subite du nourrisson :

- un dysfonctionnement du contrôle respiratoire a été mis en évidence,
- la 5-HT, le RRG et la maturation de ce dernier semblent être impliqués.

2. VIEILLISSEMENT NORMAL ET PATHOLOGIQUE

Comme nous l'avons évoqué plus haut, le vieillissement est un processus qui met à l'épreuve nos capacités d'adaptation. Dans la théorie gériatrique de fragilité, il existe plusieurs modèles d'évaluation de cette dernière : le modèle phénotypique de Fried (Fried, Tangen et al. 2001), et le modèle cumulatif de Mitnitski et Rockwood (Mitnitski, Mogilner et al. 2001). Dans le modèle cumulatif, la fragilité est considérée comme un syndrome multidimensionnel de perte de réserves engendrant une vulnérabilité. Ce modèle s'appuie sur une myriade de variables clinico-biologiques permettant de calculer l'index de fragilité selon la formule suivante (Mitnitski, Mogilner et al. 2001) :

Index de fragilité = somme des variables (cotées chacune +1 ou 0) somme totale des variables évaluées

En population générale, l'index de fragilité suit une distribution gamma selon l'âge (Mitnitski, Mogilner et al. 2001). Le paramètre de forme est proche de 2, décrivant deux phases du processus d'évolution de l'index de fragilité en fonction de l'âge : une phase de stabilité durant laquelle l'organisme s'adapte au vieillissement, et une phase d'augmentation de l'index de fragilité à partir de laquelle l'adaptabilité de l'organisme n'est plus suffisante (Mitnitski, Mogilner et al. 2001). La variance (carré de la déviation standard) correspond à l'hétérogénéité absolue (Rockwood and Mitnitski 2007). L'hétérogénéité relative est pour sa part mesurée par le coefficient de variation (ratio de la déviation standard sur la moyenne). Le coefficient de variation de l'index de fragilité est un reflet de l'adaptabilité lors de l'avancée en âge (Rockwood and Mitnitski 2007). En population générale il suit deux phases évolutives : avant 45 ans, il est élevé et stable, correspondant à un besoin de capacités d'adaptation en période de fertilité. Après 45 ans, il baisse progressivement, correspondant à une diminution de la variété de réponses possibles à la nouveauté au cours du vieillissement (Rockwood and Mitnitski 2007). Le vieillissement est donc un moment de vie durant lequel l'adaptabilité est moindre.

Afin de mieux appréhender les facteurs biologiques pouvant participer à cette variation d'adaptabilité au cours du vieillissement, nous avons choisi de nous pencher sur certains mécanismes cellulaires impliqués dans le processus de vieillissement, et sur deux grandes pathologies du vieillissement neurologique central et sensoriel : les troubles neurocognitifs et la presbyacousie.

2. 1. MÉCANISMES CELLULAIRES IMPLIQUÉS DANS LE PROCESSUS DE VIEILLISSEMENT

Les mécanismes biologiques impliqués dans le vieillissement sont multiples et complexes. Les processus de mort et de survie cellulaire sont des éléments essentiels dans le développement embryonnaire et néonatal, mais également dans le vieillissement normal et pathologique. Il y a quelques années, la classification de la mort cellulaire se faisait en fonction de la morphologie des cellules : il s'agissait de l'apoptose ou de la nécrose (Kerr, Wyllie et al. 1972). Actuellement la classification se fonde sur les mécanismes moléculaires mis en jeu. On trouve à ce jour plusieurs types de grands mécanismes mis en jeu dans la mort cellulaire : la nécrose programmée, la sénescence et l'apoptose (intrinsèque et extrinsèque). L'autophagie est pour sa part considérée comme une voie de survie cellulaire (Galluzzi, Vitale et al. 2012).

2.1.1. LA NÉCROSE PROGRAMMÉE

La nécrose programmée - ou nécroptose - est un processus de mort cellulaire de découverte récente. Elle est caractérisée par la rupture membranaire de la cellule et le gonflement de ses organelles. La nécrose programmée est évoquée en l'absence de l'activation des caspases (des enzymes impliquées dans l'apoptose, voir paragraphe 2.1.3) (Zhou and Yuan 2014). Elle peut être induite par de nombreux récepteurs tels que les récepteurs de mort de la famille du TNF (*Tumor Necrosis Factor*), les récepteurs Toll-like, ou encore les récepteurs de l'interféron (Holler, Zaru et al. 2000), (He, Liang et al. 2011), (Robinson, Jung et al. 2012). Tous convergent vers l'activation de RIP3 (*receptor-interacting kinase 3*) par des protéines contenant le motif d'interaction homotypique RIP (RHIM, RIP *homotypic interaction motif*) (Yu and He 2016). RIP3 activée phosphoryle les

substrats MLKL (*Mixed Lineage Kinase domain Like protein*) (Sun, Wang et al. 2012), entraînant leur oligomérisation et leur translocation à la membrane plasmatique pour aboutir à la nécroptose (Chen, Li et al. 2014). Lorsque la cellule meurt par nécrose programmée, elle relâche dans son environnement de multiples composants intracellulaires immunostimulants possédant un fort impact sur les cellules environnantes. À l'opposé, les cellules mourant par apoptose ont elles un très faible impact sur leur environnement immédiat (Wallach, Kang et al. 2016).

La nécroptose est induite par une agression. Elle est impliquée dans de très nombreuses pathologies telles que l'inflammation systémique, la reperfusion post ischémique cérébrale, la maladie de Gaucher, l'athérosclérose, certaines infections virales, ou encore la neurodégenérescence (Yu and He 2016).

2.1.2. LA SÉNESCENCE

Certaines altérations acquises du matériel génétique interviennent dans les phénomènes liés au vieillissement. Un événement particulier va influencer la survie cellulaire : la perte des télomères. Au cours des divisions cellulaires successives, la longueur de ces extrémités des chromosomes diminue. L'altération structurelle du télomère entraîne une altération fonctionnelle de cette région qui assure habituellement la stabilité de l'ADN. Associée à d'autres mécanismes contrôlant la cinétique de prolifération cellulaire, ce phénomène participe à la perte du potentiel de division des cellules, aboutissant à l'arrêt du renouvellement cellulaire. Ce stade est également nommé « catastrophe mitotique » ou sénescence cellulaire (Hayflick and Moorhead 1961).

Un stress cellulaire prolongé participe à l'émergence des dommages de l'ADN et à la réduction de taille des télomères, favorisant la sénescence (Chandra and Kirschner 2016). Il semblerait par ailleurs que l'impact de ce stress cellulaire capable d'induire la sénescence varie d'un type cellulaire à un autre (Georgakopoulou, Evangelou et al. 2016). Les radicaux libres (ou *Reactiv Oxygen Species*, ROS) jouent également un rôle prépondérant dans la genèse des dépôts protéiques, l'atrophie tissulaire et les troubles

inflammatoires participant à la sénescence. Il n'existe cependant pas à ce jour de voie de signalisation intracellulaire clairement identifiée dans l'induction de la sénescence en dehors de la taille des télomères, ni de biomarqueur fiable (Matjusaitis, Chin et al. 2016). La sénescence est un outil essentiel du remodelage tissulaire (Duan and Bonewald 2016). L'accumulation de cellules sénescentes est en outre impliquée dans le vieillissement et les pathologies associées à l'avancée en âge (Sharpless and Sherr 2015), (Opresko and Shay 2016). En diminuant le nombre de progéniteurs, mais également en modifiant la production de cytokines pro-inflammatoires ou de facteurs de croissance, les cellules sénescentes favorisent le vieillissement des organes (Campisi 2013). Cela est notamment le cas si leur clairance s'avère trop lente (Childs, Baker et al. 2016).

Prenons l'exemple de la maladie d'Alzheimer durant laquelle la neurodégenérescence semble plus dépendre d'un processus de sénescence que d'un processus apoptotique (Wang and Wang 2015). Dans cette pathologie, on voit s'accumuler dans le cerveau des protéines riches en feuillets β plissés formant les plaques dites β -amyloïdes. Ces dépôts extracellulaires toxiques favorisent la perte neuronale, mais également l'atteinte de la paroi des vaisseaux, notamment des petites artères méningées et corticales. Ce processus favorise l'émergence de l'angiopathie amyloïde, une forme particulière de trouble neurocognitif associant atteinte cognitive et micro-AVC (accident vasculaires cérébraux) hémorragiques. Il est également noté dans la maladie d'Alzheimer des dépôts neurofibrillaires intracellulaires constitués d'agrégats de filaments hélicoïdaux formés par la protéine Tau hyperphosphorylée. Cette protéine Tau maintient habituellement la stabilité des microtubules afin d'assurer le transport axonal neuronal. Elle perd cette fonction essentielle lorsqu'elle est hyperphosphorylée (Buée L., 2008). Le caractère pathogène des protéines β -Amyloïde et Tau n'est pas évident. Alors que la surexpression des protéines β -amyloïdes seule active l'apoptose, la surexpression concomitante de la protéine Tau l'inhibe (Wang, Li et al. 2010). L'hyperphosphorylation de Tau aurait tendance à :

diminuer le stress cellulaire lié au réticulum endoplasmique (Liu, Song et al. 2012),

- augmenter l'expression de la β-caténine (promoteur de survie cellulaire) (Wang and Wang 2015),

- diminuer l'apoptose mitochondriale (Wang, Li et al. 2010) et

- activer la microglie (Wang, Jiang et al. 2013).

Elle permettrait ainsi de protéger les neurones de la mort rapide par apoptose mais favoriserait la sénescence cellulaire aboutissant à une mort cellulaire beaucoup plus lente, nommée la « neurodegenerasis » par certains auteurs (Wang, Wang et al. 2014) . Cette période d'activation de la sénescence avant la perte neuronale semble être essentielle pour éviter la mort par apoptose. Mais à long terme elle pourrait induire une mort neuronale par activation directe ou épuisement de ce processus protecteur. Agir sur la sénescence cellulaire constitue donc une voie thérapeutique prometteuse dans le traitement de la maladie d'Alzheimer, mais aussi des pathologies liées à l'âge en général (van Deursen 2014).

2.1.3. L'APOPTOSE

L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire bien décrit. Il est utile au cours de l'embryogenèse et intervient tout au long de la vie, aussi bien dans la synaptogenèse, la genèse des cancers, que dans le vieillissement cellulaire.

L'apoptose est activée via deux grandes voies (Figure 1) :

- la voie intrinsèque - ou mitochondriale - impliquant des protéines de la famille
Bcl-2 (*B cell lymphoma 2*); et

- la voie extrinsèque, impliquant des protéines de la famille des récepteurs de mort (*Death Receptors*) (Kiraz, Adan et al. 2016).



Figure 1: Représentation schématique des voies apoptotiques. La voie intrinsèques (ou mitochondriale) est induite par un stress cellulaire qui active les protéines BH3-only puis favorise la formation du pore MAC. La voie extrinsèque est induite par les récepteurs de mort qui activent la cascade de caspases. Au sein de ces deux voies de nombreux systèmes de régulation interviennent, tels que Bcl-XL ou BID. Bax : *Bcl-2 Associated X protein*; Bak : *Bcl-2 Antagonist Killer*; Bcl-2 : *B cell lymphoma 2*; Bcl-XL : *B cell lymphoma extra large*; BH3-only : protéines possédant un seul domaine BH3 ; BID : *BH3 Interacting Domain detah agonist* ; t-BID : forme tronquée de BID.

La voie intrinsèque est induite par des stimuli intracellulaires tels que le stress oxydatif, des dommages de l'ADN, une hypoxie ou encore une déprivation de facteurs de croissance (Galluzzi, Vitale et al. 2012). Ce stress intracellulaire entraîne l'activation de protéines pro-apoptotiques BH3-only cytoplasmiques (Bid, Bim, PUMA, Noxa, Bad, BMF, HRK et Bik). Ces protéines BH3-only activées se lient alors à la membrane externe mitochondriale par leur extrémité C-terminale. Elles sont ensuite capables de se lier à des protéines pro- ou anti-apoptotiques et de provoquer leur insertion dans la membrane externe mitochondriale pour certaines (Bak par exemple) (Shamas-Din, Brahmbhatt et al. 2011). Par un système d'interactions et de régulations complexe, ces protéines BH3-only activent directement les facteurs pro-apoptotiques Bax et Bak (tBid, Bim, PUMA...), ou se lient aux facteurs anti-apoptotique Bcl-2 qui libèrent alors Bax et/ou Bak (Bad, Noxa...) (Adams and Cory 2007; Renault, Teijido et al. 2013).

Une fois activés, Bax et Bak s'oligomérisent pour former un pore de perméabilisation dans la membrane externe de la mitochondrie : le pore MAC (*Mitochondrial Apoptosis-induced Channel*) (Kuwana, Mackey et al. 2002; Dejean, Martinez-Caballero et al. 2005). Il en résulte : une diminution du potentiel membranaire mitochondrial, une surproduction de radicaux libres, une dépletion énergétique et une libération dans le cytoplasme de protéines cytotoxiques contenues dans l'espace inter-membranaire mitochondrial telles que le cytochrome c (Figure 1). Le cytochrome c s'associe alors à Apaf-1 pour initier la formation de l'apoptosome. Cet apoptosome active la pro-caspase 9 en caspase 9, qui va activer à son tour la caspase 3, engendrant la cascade de caspases (Liu, Wang et al. 2016). Dans ce processus, la formation du pore MAC est généralement l'étape critique qui va précéder la mort cellulaire (Volkmann, Marassi et al. 2014).

Pour sa part, la voie extrinsèque est déclenchée par un signal extérieur à la cellule, tels que FasL (Ligand de la protéine Fas), TNF α (*Tumor necrosis factor* α), ou encore TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*). Il en résulte l'activation des récepteurs dit de mort (DR ou *Death Receptors*). Ce processus active à son tour des caspases, dont la caspase 8 capable d'activer d'autres caspases mais aussi la voie intrinsèque pour amplifier le signal apoptotique dans certains types cellulaires (Kiraz, Adan et al. 2016).

Ces deux voies vont entraîner l'activation en cascade de caspases, aboutissant à une fission du réseau mitochondrial puis la fragmentation de la cellule, scindée en corps apoptotiques phagocytés par les cellules environnantes.

Il existe au sein des cellules des mécanismes de régulation de l'apoptose, via la régulation de la cascade des caspases. La régulation de l'apoptose implique également des interactions complexes entre protéines pro- et anti-apoptotiques au sein du cytosol ou de la membrane externe mitochondriale.

La cascade des caspases est régulée par des protéines qui se lient aux dites caspases et les inhibent : les IAPs (*Inhibitor of Apoptotic Proteins*). Lors de l'activation de la voie intrinsèque, des protéines telles que Smac/DIABLO et HtrA2/Omi sont libérées de la mitochondrie pour inhiber les IAPs, favorisant ainsi la mort cellulaire (Altieri 2010).

Comme le montre la Figure 1, les interactions entre protéines pro- et anti-apoptotiques sont variées. Les protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 ou Bcl-XL forment des hétérodimères avec les protéines pro-apoptotiques telles que Bax ou Bak. La perte d'interaction entre protéines anti- et pro-apoptotiques va favoriser l'entrée dans la voie de l'apoptose. Dans la voie intrinsèque, les protéines BH3-only vont entraîner la dissociation des protéines pro- et anti-apoptotiques, notamment de Bcl-2 et de Bax ou Bak. Ce processus libère les protéines Bax et Bak, devenues ainsi disponibles pour former des pores de transition appelés pores MAC. La formation de ces pores aboutit à la perméabilisation mitochondriale puis à la cascade d'activation des caspases cytosoliques via la libération du cytochrome c (Figure 1).

Bcl-2 et Bcl-XL sont également capables d'agir sur Bax au sein de la membrane externe mitochondriale pour limiter la formation du pore MAC (Renault, Teijido et al. 2013). Dans la voie extrinsèque, la caspase 8 clive le facteur pro-apoptotique Bid en deux fragments, l'un N-terminal inactif et l'autre C-terminal (appelé tBID) (Figure 1) (Jost, Grabow et al. 2009). La forme tronquée tBid ainsi que d'autres protéines BH3-only (telles que Bim ou PUMA) vont neutraliser les facteurs anti-apoptotiques Bcl-2/-XL. Ces protéines sont ainsi capables d'activer directement Bax ou Bak, permettant la poursuite du processus apoptotique (Luo, Budihardjo et al. 1998; Gross, Yin et al. 1999).

La localisation des protéines pro- et anti-apoptotiques entre cytosol et membrane externe mitochondriale est aussi un élément clef de la régulation du processus apoptotique. La protéine pro-apoptotique Bak est principalement localisée au sein de la membrane externe mitochondriale. En revanche, la protéine pro-apoptotique Bax est essentiellement cytosolique. Dans la voie intrinsèque, les protéines BH3-only activées vont favoriser l'ancrage de Bax à la membrane externe mitochondriale, entraînant la formation des pores MAC (Hsu, Wolter et al. 1997). Dans cette voie, tBid se charge d'activer la translocation de Bax à la membrane externe mitochondriale (Eskes, Desagher et al. 2000). Les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL vont également protéger la cellule de l'apoptose en interagissant avec Bax, Bid ou d'autres protéines BH3-only pour les séquestrer dans le cytoplasme et limiter ainsi leur translocation à la membrane externe mitochondriale ou leur activation (Cheng, Wei et al. 2001). Par ailleurs certains signaux intracellulaires de survie peuvent promouvoir la retranslocation de Bax de la membrane externe mitochondriale vers le cytosol. À l'inverse, la perte de ces signaux de survie va conduire à l'accumulation de Bax au sein de la membrane externe mitochondriale et donc favoriser la formation des pores MAC (Volkmann, Marassi et al. 2014).

Ainsi l'équilibre entre ces trois grands groupes de protéines (protéines BH3-only, Bax/Bak et Bcl-2/-XL), leur niveau d'interaction ainsi que leur localisation intracellulaire vont déterminer la survie ou la mort de la cellule (Westphal, Dewson et al. 2011).

2.1.4. L'AUTOPHAGIE, UNE VOIE DE SURVIE CELLULAIRE

L'autophagie est un processus cytoprotecteur très conservé au cours de l'évolution. La fonction primaire de l'autophagie est la dégradation et la clairance de substrats variés : composants cytoplasmiques, protéines à longue durée de vie ou ubiquitinilées, organelles aberrants, en excès ou endommagés, pathogènes intracellulaires (Chen and Yu 2013). Elle peut être sélective exclusivement des mitochondries (mitophagie), des peroxisomes (pexophagie), des ribosomes (ribophagie), des bactéries des virus (xénophagie). Elle peut également être non sélective (Kraft and Martens 2012). L'autophagie participe ainsi à la clairance basale des organelles endommagées, des protéines et des contenus cytoplasmiques. Elle contribue aussi à la délivrance de substrats métaboliques permettant d'adapter la consommation énergétique de la cellule

lorsque cette dernière subit un stress (Mukhopadhyay, Panda et al. 2014). Elle participe donc à la croissance et à la survie cellulaire.

Il existe trois grands type d'autophagie : la micro-autophagie, l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes, et la macro-autophagie (Wirawan, Vanden Berghe et al. 2012). La micro-autophagie est assez peu connue. Elle consiste en la phagocytose de protéines cytoplasmiques par le lysosome lui-même (Li, Li et al. 2012). L'autophagie médiée par les protéines chaperonnes s'intéresse aux protéines exposant un motif KFERQ-like. Elles sont dirigées par des protéines chaperonnes (complexe HSC-0) pour être absorbées dans les lysosome via le récepteur LAMP-2A (Kaushik, Bandyopadhyay et al. 2011). Enfin la macro-autophagie se caractérise par la formation de vacuoles à double membrane transportant vers le lysosome du matériel cytoplasmique. Elle est communément appelée autophagie et c'est sous ce terme que nous allons détailler ciaprès les mécanismes moléculaires impliqués dans cette voie.

L'autophagie permet l'engloutissement de cargos cytoplasmiques dans des organelles à double membrane -les autophagosomes-, leur transport jusqu'aux lysosomes puis leur dégradation. Elle implique de très nombreuses protéines dont la trentaine de protéines issues des gènes reliées à l'autophagie (dites Atg pour *AuTophaGy-related genes*) (Xie and Klionsky 2007).

Il existe plusieurs grandes phases dans le processus d'autophagie : l'induction et l'initiation, la nucléation, l'élongation puis la maturation, la dégradation et le recyclage (Yang and Klionsky 2010 ; Denton, Nicolson et al. 2012; Harris 2011; Kang, Zeh et al. 2011; Wirawan, Vanden Berghe et al. 2012; Kraft and Martens 2012; Ouyang, Shi et al. 2012; Bhutia, Mukhopadhyay et al. 2013; Mukhopadhyay, Panda et al. 2014) (figure 2).



Figure 2: Représentation schématique du processus autophagique. L'initiation est induite par un stress cellulaire via les récepteurs mTOR, activant le complexe ULK1/2. S'en suit une translocation du complexe 1 des microtubules vers le réticulum endoplasmique, favorisant la nucléation. Cette dernière consiste en la formation de phagophores, qui s'associent lors de la phase d'élongation pour former un autophagosome. Durant cette phase, les phosphatidyl-Ethanolamines jouent un rôle essentiel dans l'activation de LC3, permettant le passage à la phase de maturation. Lors de la phase de maturation, les éléments intracellulaires altérés sont incorporés dans les autophagosomes grâce au complexe 2. L'autophagosome fusionne ensuite avec les lysosomes, formant un autolysosome capable de dégrader son contenu avant recyclage. Atg : *AuTophagy related genes*; E1 : Atg7 ; E2 : Atg3 (complexes de conjugaison ubiquitine-like) ; LC3 : *microtubule associated protein 1A* ; mTOR : *mammalian TargetOf Rapamycin* ; PE : *Phosphatidyl-Ethanolamine* ; PI3K : *Phosphatidyl-Inositol-3-Phosphates Kinase* ; ULK1/2 : *Unc-51-Like Kinase 1/2*, UVRAG : UV radiation Resistance-Associated Gene protein, Vps34 : *Vacuolar sorting protein 34*.

L'inactivation de mTOR au cours d'un stress métabolique (jeun prolongé par exemple) ou cellulaire entraîne l'initiation de l'autophagie avec une activation des complexes ULK, induisant la phosphorylation d'Atg13 et de ULK1 lui même. ULK1 phosphoryle alors Ambra1 au sein du complexe 1 (contenant les protéines PI3K, Becline1, Vps34, Vps15 et Atg14) lié aux microtubules. La phosphorylation de Ambra1 permet la libération du complexe 1, et sa translocation au réticulum endoplasmique, lieu privilégié de formation de l'autophagosome.

Vient alors la phase de nucléation durant laquelle des doubles membranes isolées en forme de croissant, dites phagophores, sont formées. Atg13 phosphorylée se lie à Atg1 qui, avec l'aide d'Atg17, recrute Atg9. Ce complexe est ensuite capable d'extraire des lipides des endosomes, de l'appareil de Golgi, de la membrane nucléaire, de la membrane externe mitochondriale ou encore du réticulum endoplasmique, pour former des phagophores. Le complexe 1 génère également des phospholipides phosphorylés (Phosphatidyl-Inositol-3-Phosphates, PI3P), participant à la formation d'une double membrane et recrutant DFCP1 et WIPI1. Durant cette phase de nucléation, la protéine Becline1 joue un rôle primordial en permettant la localisation de protéines autophagiques dans les phagophores. Elle se lie à Vps34 pour promouvoir la nucléation, interaction induite par Ambra1.

S'en suit la phase d'élongation, phase durant laquelle les phagophores sont associées entre eux. Le complexe 1 recrute d'autres protéines Atg dont deux complexes de conjugaison ubiquitine-like E1 (Atg7) et E2 (Atg3). Atg7 et Atg 10 régulent la formation du complexe Atg5-Atg12 qui se lie à Atg16L1, générant le complexe Atg16L1. Parallèlement, LC3 est clivée par une cystéine protéase –Atg4- en LC3-I. D'autre part, Atg3 régule la production de Phosphatidyl-Ethanolamine (PE). Survient ensuite une étape de lipidation essentielle : à l'aide d'Atg7, Atg10 et du complexe Atg16L1, LC3-I est conjuguée à une PE, générant ainsi la protéine LC3-II. Cette protéine est alors ancrée à la membrane des phagophores.

La maturation de l'autophagosome et sa croissance dépendent de la protéine activée LC3-II qui dans la membrane du phagophore joue le rôle de récepteur pour des fragments présents à surface des protéines agrégées ou encore des mitochondries altérées. LC3-II va donc permettre une assimilation et une dégradation sélective, notamment des protéines ubiquitinilées. Le complexe 2 (Becline1, Vps34 et UVRAG) participe également à ce processus de maturation.

Il aboutit ensuite à la fusion de l'autophagosome avec les lysosomes, pour devenir un autolysosome. La dégradation et l'extrusion permettent ensuite de produire des nutriments utiles à la cellule.

Pour finir, un recyclage s'initie afin de maintenir une certaine homéostasie lysosomale et d'éviter le recrutement des lysosomes uniquement à des fins d'autophagie. La voie mTOR est activée par des facteurs de croissance et inactive le complexe Atg1. La dénutrition ou le stress inactive cette voie, permettant l'initiation de l'autophagie (Neufeld 2010). Cependant la production prolongée d'autolysosomes réactive la voie mTOR, inhibant l'autophagie (Chen and Yu 2013).

Au cours du vieillissement, l'autophagie diminue, tout comme l'efficacité de recyclage du protéasome, participant à l'accumulation de déchets intracellulaires. L'autophagie médiée par les protéines chaperonnes et la macroautophagie – en particulier la mitophagie – sont diminuées chez les mammifères âgés (Nardai, Csermely et al. 2002), (Terman and Brunk 2004). L'autophagie régule la longévité au niveau cellulaire en participant au recyclage du matériel intracellulaire. Au niveau moléculaire, plusieurs protéines impliquées dans l'autophagie régulent la longévité (Salminen and Kaarniranta 2009). Par exemple, mTOR est inhibée pour permettre l'initiation de l'autophagie, mais réactivée après formation de l'autolysosome pour assurer le recyclage lysosomal. Elle participe à la dégradation du protéasome et favorise la réponse inflammatoire, aggravant le phénotype sénescence. Becline1 à l'inverse est capable de se lier à des facteurs anti-apoptotiques ou pro-autophagiques, assurant un recyclage du matériel cytoplasmique endommagé (Pattingre, Espert et al. 2008).

Le vieillissement est un processus impliquant des interactions complexes entre survie et mort cellulaire. La suractivation de l'autophagie entraîne par exemple un relargage
d'enzymes protéolytiques dans le cytoplasme, induisant une mort par apoptose. Les liens entre autophagie et apoptose sont donc étroits et complexes.

2.1.5. L'AUTOPHAGIE, UNE VOIE DE MORT CELLULAIRE ?

L'autophagie est naturellement pensée comme un processus de survie cellulaire. Cependant ses liens avec les processus de mort cellulaire sont complexes, via notamment des systèmes d'inter-régulation. Un rôle direct de l'autophagie dans la mort cellulaire a également récemment émergé dans la littérature.

Les protéines de la famille Bcl-2 contiennent plusieurs domaines conservés de motifs en hélices alpha dits domaines BH (1 à 4). Il existe au sein de cette famille trois sous groupes : celui des protéines inhibant l'apoptose et possédant les domaines BH1 à -4 (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl1...), celui des protéines pro-apoptotiques possédant trois domaines BH (Bax et Bak), et celui des protéines activant l'apoptose et ne possédant qu'un seul domaine BH3, dites protéines BH3-only (Bad, Bid, Bim, Nova, PUMA...) capables d'interagir avec des protéines anti-apoptotiques (Mukhopadhyay, Panda et al. 2014). La protéine autophagique Becline1 possède également un domaine BH3, ainsi que des sites d'ubiquitinylation et de phosphorylation (Kang, Zeh et al. 2011) (Figure 3).



Figure 3: Représentation schématique de la structure de la protéine Becline 1. Le domaine BH3 est situé dans sa partie N-terminale et se lie à Bcl-2 ou Bcl-XL, inhibant l'autophagie. la phosphorylation de la Thréonine (Thr) 119 contenue dans ce domaine par DAPK dissocie Becline 1 de Bcl-2 et active l'autophagie. Les protéines Vps34 et UVRAG se lient au domaine CCD, favorisant l'activation de l'autophagie. le clivage de Becline 1 sur son acide aspartique (D) 149 empêche son interaction avec Vps34 et inhibe donc l'autophagie. le fragment C-terminal qui en résulte, sans domaine BH3, favorise la libération du cytochrome c et donc l'apoptose. BH3 : *Bcl-2 Homology domain*; CCD : *coiled-coiled domain*; ECD : *conserved domain*; NES : *nuclear export signal*.

Ce domaine BH3 lorsqu'il se lie à Bcl-2, Bcl-XL ou Mcl1 entraîne l'inhibition de l'autophagie. Bcl-2 est localisé en plusieurs sites intracellulaires. Dans la membrane externe mitochondriale, il séquestre Bax et inhibe l'apoptose. Il y séquestre également Ambra1, inhibant l'autophagie (Strappazzon, Vietri-Rudan et al. 2011). Dans le réticulum endoplasmique, il se lie à Becline1, stabilise l'interaction en recrutant NAF1, et bloque là encore l'autophagie (Chang, Nguyen et al. 2010). Le stress cellulaire induit une déconnection de Bcl-2 et Becline1, permettant à l'autophagie de se poursuivre (Marquez and Xu 2012). L'activation de JNK1 entraîne une phosphorylation de Bcl-2 sur sa sérine 87, sa sérine 70 et sa thréonine 69, le dissociant de Becline1 (Strappazzon, Vietri-Rudan et al. 2011). Mais ces phosphorylations peuvent également favoriser une dissociation de Bax et Bcl-2, activant la formation du pore MAC et l'apoptose (Wei, Sinha et al. 2008). Par ailleurs le stress cellulaire va également activer DAPK qui, phosphorylant Becline1 sur sa thréonine 119, la rend plus hydrophobique. Ce qui diminue l'affinité de Becline1 pour Bcl-2 et favorise la nucléation autophagique (Feng, Huang et al. 2007; Oberstein, Jeffrey et al. 2007; Zalckvar, Berissi et al. 2009).

Certaines protéines impliquées dans l'apoptose régulent l'autophagie. Bad, Bak ou encore Nix interrompent la liaison entre Bcl-2 et Becline1, activant ainsi l'autophagie (Levine, Sinha et al. 2008), (Zhang and Ney 2009). Dans le cytoplasme, Bax active des caspases capables de cliver Becline1 sur son acide aspartique (D) 149, bloquant ainsi son interaction avec Vps34 et inhibant l'autophagie (Luo and Rubinsztein 2010). Ce clivage de Becline1 semble être un point critique pour empêcher le processus autophagique. Par ailleurs, Bim séquestre Becline1 sur les microtubules en favorisant la liaison entre Becline1 et DYNLL-1 (aussi appelé LC8). Cela permet de limiter l'initiation de l'autophagie. La phosphorylation de Bim par JNK en cas de stress cellulaire prolongé permet la dissociation de Becline1 et DYNLL-1, induisant la translocation de Becline1 au réticulum endoplasmique et la formation de l'autophagosome (Luo, Garcia-Arencibia et al. 2012). Enfin Ambra1 est également clivée par des caspases, limitant l'initiation de l'autophagie.

Symétriquement, certaines protéines autophagiques sont impliquées dans l'apoptose. D'une manière générale, l'autophagie favorise la survie cellulaire et lutte donc contre les processus apoptotiques. L'autophagosome engloutit les mitochondries endommagées et les protéines apoptotiques. Elle promeut ainsi la survie cellulaire et protège la cellule des radicaux libres (Liu, Chen et al. 2012).

Le rôle des protéines de l'autophagie dans l'apoptose est cependant plus complexe qu'il n'y paraît. La caspase 3 clive par exemple Becline1, ce qui inhibe l'autophagie mais active également l'apoptose. Le fragment C-terminal de Becline1 perd en effet son domaine BH3 et favorise la libération du cytochrome c (Zhu, Zhao et al. 2010). De la même manière des caspases clivent Atg5 dont le fragment N-terminal ainsi obtenu se transloque à la membrane externe mitochondriale, s'associe à Bcl-XL et permet la libération du cytochrome c (Yousefi, Perozzo et al. 2006). Atg12 se lie pour sa part à Mcl1 et Bcl-2, activant la voie intrinsèque de l'apoptose. En se liant à Atg3, elle sensibilise également la cellule à cette voie (Radoshevich, Murrow et al. 2010; Rubinstein, Eisenstein et al. 2011).

Concernant la voie extrinsèque, la polyubiquitinylation régule l'apoptose via une protéine de liaison à l'ubiquitine : p62. Cette dernière favorise l'agrégation de culline3 et de la caspase 8 (Jin, Li et al. 2009). La membrane de l'autophagosome sert de catalyseur pour auto-activer la caspase 8 via p62 et former des complexes pro-apoptotiques (Young, Takahashi et al. 2012).

Outre la capacité de certaines protéines autophagiques à activer l'apoptose, les données de la littérature étayent l'hypothèse d'une voie de mort cellulaire autophagique indépendante de l'apoptose. Cette voie serait notamment impliquée au cours du développement. Chez les plantes, l'autophagie joue un rôle dans la formation du système vasculaire et l'inhibition d'Atg5 entraîne le développement d'un système vasculaire aberrant (Kwon, Cho et al. 2010). Chez la drosophile, l'involution des glandes salivaires de la larve permet un passage à l'âge adulte. Dans ce processus d'involution, l'apoptose et l'autophagie sont nécessaires. Elles permettent l'une et l'autre d'induire cette involution, mais sont plus efficaces si elles agissent en synergie (Berry and Baehrecke 2007). Dans le mésentère des drosophiles, l'inactivation des caspases associée à une activation d'Atg1 permet le développement de cet organe par sélection cellulaire. Cette fois, l'autophagie paraît suffisante à elle seule et ce processus de maturation larvaire ne semble pas dépendre de l'apoptose (Denton, Nicolson et al. 2012). L'autophagie vectrice de mort cellulaire semble également être impliquée dans des processus pathologiques et

la réponse au stress cellulaire prolongé. Chez l'amibe Dictyostelium discoideum par exemple, le jeun associé à une surexpression de DIF-1 entraîne une activation d'Atg1 – impliquée dans la nucléation de l'autophagosome - puis une mort cellulaire indépendante de l'apoptose. Ni l'activation isolée d'Atg1, ni le jeun isolé, ni la surexpression isolée de DIF-1 ne suffisent pas à induire la mort cellulaire (Luciani, Giusti et al. 2011). Il semblerait donc que nous ayons à faire avec un processus de synergie complexe.

Cette voie de mort cellulaire autophagique serait une voie rarement mise en jeu et confinée à des situations pathologiques très spécifiques dans les cellules mammifères (Shen and Codogno 2011). Dans la tumorigenèse, cette voie semble jouer un rôle complexe. Les souris n'exprimant plus les protéines Atg5, Atg7 ou Becline1 ne présentent par exemple pas de modification de la mort des cellules tumorales. Cela est probablement du à la redondance de nombreux systèmes. La réponse aux traitements anti-cancéreux semble par contre dépendre en partie de la voie autophagique de mort cellulaire. En effet lorsque la voie apoptotique, intrinsèque ou extrinsèque, n'est pas fonctionnelle, la mort cellulaire peut être induite par autophagie (Grander, Kharaziha et al. 2009; Laane, Tamm et al. 2009). Par exemple, si Bax et Bak sont inactivés dans des fibroblastes murins, la mort cellulaire peut être induite via la voie autophagique. L'inactivation concomitante d'Atg5 ou de Becline1 permet d'inhiber la mort cellulaire (Shimizu, Kanaseki et al. 2004). De la même manière, l'inhibition de la caspase 8 permet d'activer la mort cellulaire autophagique, secondairement inhibée par l'inactivation de Becline1 ou Atg7 (Yu, Alva et al. 2004).

Il existe donc une dépendance de cette voie autophagique de mort cellulaire au type d'organisme. De plus, il semblerait que le type cellulaire au sein d'un même organisme puisse influencer la capacité d'une cellule à mourir par autophagie. Au niveau neuronal par exemple, l'autophagie protège habituellement les neurones de la mort cellulaire en évacuant les agrégats de protéines ubiquitinylées. Mais dans l'hippocampe, après une déprivation insulinique prolongée, l'autophagie indépendante des caspases peut aboutir à une neurodégenérescence (Yu, Baek et al. 2008).

Les voies autophagiques de mort et de survie cellulaire semblent être différentes. Par exemple, Draper (Drpr) est indispensable pour induire la mort cellulaire par autophagie chez la drosophile, mais inutile pour permettre la survie cellulaire via cette même autophagie (McPhee and Baehrecke 2010). Les signaux cellulaires d'activation de l'autophagie restent par contre identiques, que l'autophagie induise la survie ou la mort cellulaire : à savoir la voie mTOR-PI3K et la voie du récepteur Ras. Les modulateurs participant à la direction vers le processus de survie ou de mort cellulaire ne sont par contre pas identifiés (Denton, Nicolson et al. 2012). Les modèles *in vitro* ont permis de décrire une voie impliquant l'autophagie et induisant la mort cellulaire. La voie du récepteur Ras une fois activé, entraîne l'augmentation de l'expression de Noxa et Becline1. Cela précipite la dégradation de p62 et favorise la formation de l'autophagosome puis la lipidation de LC3. Cette voie aboutit à une diminution de la prolifération cellulaire et une augmentation de la mort cellulaire indépendamment de l'apoptose (Elgendy, Sheridan et al. 2011).

Ainsi Becline1 semble jouer un rôle important à la fois dans la voie de l'autophagie de survie et dans celle de mort cellulaire. Cette activation possible de la mort cellulaire par autophagie est également fortement régulée par Bcl-2 (Shimizu, Kanaseki et al. 2004). Il existerait par ailleurs une voie autophagique indépendante de LC3 mais pour laquelle Becline1 resterait indispensable. Elle est notamment impliquée dans la clairance mitochondriale. Cependant nous ne savons pas à ce jour si cette voie est directement impliquée dans la mort autophagique, la survie autophagique ou les deux (Nishida, Arakawa et al. 2009; Zhang and Ney 2009).

L'autophagie joue un rôle dans le processus de vieillissement et a été impliquée dans de nombreuses pathologies telles que le sepsis, les processus hémorragiques, l'infection par le HIV, les dommages neuronaux ou encore la maladie d'Alzheimer. Il s'agit généralement d'un défaut d'activation de l'autophagie conduisant à une diminution de la survie cellulaire. Il peut également s'agir d'une activation de l'autophagie conduisant à une résistance au stress oxydatif, à l'hypoxie, ou à la déprivation en nutriment des cellules cancéreuses, ou encore la résistance des cellules cancéreuses à l'apoptose ainsi qu'à certaines chimiothérapies (Mukhopadhyay, Panda et al. 2014). À notre connaissance, il n'a par contre pas à ce jour été révélé de pathologie impliquant une mort cellulaire par autophagie.

Points clef

Mécanismes cellulaires impliqués dans le processus de vieillissement

- > La nécrose programmée :
 - est induite par une agression,
 - implique la voie RIP3,
 - aboutit à la mort cellulaire par lyse membranaire.
- > La sénescence :
 - est induite par la diminution de taille des télomères,
 - correspond à un arrêt du renouvellement cellulaire,
 - ne possède pas à ce jour de voie de signalisation intracellulaire clairement identifiée.
- > L'apoptose :
 - est une mort cellulaire programmée,
 - comprend la voie intrinsèque et la voie extrinsèque,
 - est exécutée par des caspases activées en cascade,
 - est régulée par des protéines BH3-only, Bcl-2/-XL et IAPs,

- aboutit à la mort cellulaire par suppression rapide d'organelles et d'autres structures cellulaires.

> L'autophagie :

- est un processus cytoprotecteur d'engloutissement de matériel cytoplasmique dans des vésicules à double membrane,

- est exécutée par des complexes protéiques contenant des Atg activées en cascade,
- est régulée par des protéines BH3-only, Bcl-2/-XL,
- aboutit à la dégradation du matériel cellulaire concerné via la voie lysosomale,
- aboutit dans des circonstances particulières à la mort cellulaire.

Il existe des liens complexes entre apoptose et autophagie via les protéines anti-apoptotiques Bcl-2/-XL ou le clivage de protéines autophagiques par les caspases.

> La mort cellulaire induite par autophagie :

-est indépendante de l'apoptose

-implique la voie du récepteur Ras et Becline1

- -est régulée entre autres par Bcl-2
- -dépend de l'organisme et du type cellulaire étudié

2. 2. PATHOLOGIES AU COURS DU VIEILLISSEMENT

Les voies de mort et de survie cellulaire sus-citées sont impliquées dans le vieillissement normal mais aussi pathologique. Les pathologies liées au vieillissement sont multiples. Nous avons décidé de nous intéresser plus particulièrement à deux grands types de pathologies, qui influent l'une sur l'autre : les troubles neurocognitifs majeurs et la presbyacousie.

2.2.1. TROUBLES NEURO-COGNITIFS MAJEURS

2.2.1.1 ÉPIDÉMIOLOGIE ET CLINIQUE

En 2050, 30% de la population mondiale aura plus de 65 ans. Une partie de population souffrira de pathologies neurodégénératives, aux conséquences économiques, individuelles, émotionnelles et sociétales non négligeables pour le patient ainsi que pour ses proches {Pallas:2008wl}.

Le vieillissement normal s'accompagne d'un déclin progressif léger de la mémoire épisodique, de la mémoire de travail et de la mémoire spatiale. Les fonctions exécutives requièrent également un recrutement plus étendu de réseaux neuronaux, rendant l'organisation et l'adaptation à la nouveauté plus difficile, avec une tendance à la persévération dans l'erreur (Romero-Garcia, Atienza et al. 2014). Lorsque ce déclin devient significatif, le vieillissement devient pathologique et des troubles neurocognitifs majeurs tels que la maladie d'Alzheimer apparaissent (Dujardin et Lemaire, 2008). Les troubles neurocognitifs majeurs (TNC), ou démences neurodégénératives, sont définies par le DSM-5, système de classification des pathologies mentales proposé par l'*American Psychiatric Association* (APA), selon les critères suivants (APA, 2013) :

A	déclin cognitif <i>significatif</i> comparativement à un niveau de performance antérieur dans ≥ 1 domaine cognitif, tel qu'en font foi :	
	1. déclin cognitif significatif noté par le patient, un tiers ou le clinicien	
	 une atteinte significative de la performance cognitive démontrée par une évaluation neurpsychologique standardisée (préférablement) ou une autre évaluation clinique quantitative 	
В	les déficits cognitifs empêchent de réaliser seul les activités quotidiennes	
С	les déficits cognitifs ne surviennent pas exclusivement au cours d'un syndrome confusionnel	
D	les déficits cognitifs ne sont pas mieux expliqués par un autre trouble mental	
	préciser	
	* avec ou sans trouble comportemental	
	* sévérité	

La sévérité du TNC est évaluée selon le retentissement sur les activités de la vie quotidienne. S'y associent la plupart du temps, à des stades très variés de la maladie, des troubles du psycho-comportementaux dits « symptômes psycho-comportementaux liés à la démence « (SPCD). Il peut s'agir de comportements de désinhibition, de délires, d'hallucinations, d'agressivité verbale ou physique, d'agitation, d'anxiété ou de dépression (Carson, McDonagh et al. 2006). Ces SPCD concernent plus de 80% des patients atteints de TNC, sont parfois prodromiques de la maladie, et augmentent au cours de cette dernière (Jost and Grossberg 1996). Ils sont source d'un déclin cognitif plus rapide, d'institutionnalisation, d'épuisement des aidants et de coûts directs ou indirects des soins majeurs. Ils diminuent l'adaptabilité des patients et augmentent les risques de maltraitance, d'exclusion ou de rejet des patients (Jost and Grossberg 1996).

Parmi les troubles neurocognitifs majeurs, la prévalence la plus forte est atteinte par maladie d'Alzheimer (Cummings 2004), suivie de la démence vasculaire et de la démence à corps de Lewy. On trouve ensuite les démences lobaires fronto-temporales, puis des démences plus rares telles que post traumatisme crânien, infectieuses (Creutzfeldt Jacob, herpétique, VIH...), métaboliques (carences en vitamine B12 ou folates, dysthyroïdies, hypercorticisme...) ou encore dysimmunitaires (vascularites...) (Weiner et Lipton, 2012).

Enfin il est à noter une entité psychiatrique spécifique au sujet âgé : la dépression pseudo-démentielle. En effet les épisodes dépressifs majeurs du sujet âgé peuvent se caractériser par une plainte cognitive au premier plan, affectant plus spécifiquement que chez le sujet jeune les fonctions attentionnelles et le rappel mnésique. L'attitude négativiste du patient, l'inefficacité de l'indiçage lors des tâches de rappel, le caractère brutal d'apparition des troubles cognitifs et la disparition des troubles sous antidépresseurs sont autant d'éléments permettant de distinguer un TNC débutant d'une dépression pseudo-démentielle. On sait cependant que la dépression est un facteur de risque de TNC sur le long terme et que tout patient présentant une dépression pseudo-démentielle doit faire l'objet d'un suivi cognitif régulier, même après traitement bien conduit (Thomas, 2013).

2.2.1.2 PHYSIOPATHOLOGIE

La physiopathologie des TNC est complexe et très variée. Selon le type de TNC (Alzheimer, vasculaire, à corps de Lewy, lobaire fronto-temporal ou encore métabolique, infectieux ou dysimmunitaire...), la physiopathologie diffère. Nous avons choisi de ne citer que quelques éléments physiopathologiques ayant trait à la maladie d'Alzheimer.

Nous avons déjà évoqué l'implication des protéines Tau et β -amyloïde (ou A β) dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer dans un chapitre précédent (cf. paragraphe 2.1.2). Les plaques neurales, composées de dépôts de protéine A β dérivées de l'APP (*Amyloïd precusor protein*), sont essentiellement extracellulaires. On y retrouve également des éléments intracellulaires dégradés tels que des lysosomes ou des mitochondries. Au centre et autour de ces plaques sont retrouvées des cellules de la microglie activées, tandis qu'en périphérie des astrocytes fibrillaires sont accumulés (Wisniewski and Wegiel 1991). L'hyper-expression de la protéine A β induit des troubles de la motilité membranaire et de la libération des neurotransmetteurs. Son accumulation dans les vaisseaux sanguins cérébraux est à l'origine de l'angiopathie amyloïde. Celle ci se traduit cliniquement par la présence de microsaignements intracérébraux (dit *microbleeds*) visibles à l'IRM, et une atteinte cognitive plus sévère et

plus rapide. Les oligomères de protéines $A\beta$ sont également synaptotoxiques (Lacor, Buniel et al. 2004). La perte synaptique se concentre dans le cortex temporal, l'hippocampe, ainsi que dans les neurones cholinergiques des noyaux gris centraux, et les neurones monoaminergiques du raphé et du locus coeruleus (Masliah and Terry 1993).

La dégénérescence neurofibrillaire (DNF) consiste pour sa part en l'accumulation de filaments anormaux intracellulaires. On trouve les DNF plus particulièrement dans le néocortex, les noyaux limbiques, la substance noire, le raphé, le locus coeruleus et certains noyaux gris centraux. Les cellules pyramidales, dont les axones assurent les projections interhémisphériques essentielles à la cognition, sont les plus touchées (Mann, Yates et al. 1985). L'hyperphosphorylation de Tau, outre l'activation des processus de sénescence, favorise la formation des DNF et la mort neuronale, essentiellement dans l'hippocampe et le cortex entorhinal (Ihara 2006).

Il existe également des données en faveur d'une implication du stress oxydatif (Swerdlow and Khan 2004), ou d'une altération de l'unité neurovasculaire dans la maladie d'Alzheimer (Nelson, Sweeney et al. 2016). On soupçonne également une implication des cellules dites de soutien (astrocytes et oligodendrocytes) dont la fonction est certainement bien plus complexe qu'un simple « remplissage » interneuronal (Garwood, Ratcliffe et al. 2016).

Au niveau moléculaire, il existe une baisse de la transmission cholinergique dans la maladie d'Alzheimer influençant les capacités attentionnelles et mnésiques des patients (Bierer, Haroutunian et al. 1995). La baisse de la transmission sérotoninergique dans le raphé influe sur l'humeur, l'anxiété et l'attention (Lyness, Zarow et al. 2003). L'atteinte noradrénergique du locus coeruleus provoque des troubles de l'éveil, de l'apprentissage et de la mémoire (Panchal, Rholam et al. 2004). La dysfonction GABAergique corticale a probablement des effets sur les rythmes thêta, indispensables à divers processus cognitifs complexes (Ellison, Beal et al. 1986). Enfin la diminution du métabolisme glutamatergique temporal joue certainement un rôle dans la perte synaptique et la mort neuronale (Butterfield and Pocernich 2003).

La physiopathologie de la maladie d'Alzheimer est encore mal comprise. En effet il s'agit sans doute d'une pathologie « impressionniste », associant divers facteurs de risques et facteurs protecteurs spécifiques à chaque individu mais dont l'expression clinique est la même. La question des éléments physiopathologiques primaires à l'origine du basculement d'un vieillissement cérébral normal à pathologique est encore peu élucidée mais reste essentielle. Il existe cependant quelques pistes, telle que le rôle du récepteur de l'IGF-1 et du céramide. L'expression de ce précurseur lipidique de la production de sphingomyéline augmente dans les membranes avec le vieillissement. Il régule le cycle cellulaire et prend part aux processus inflammatoires, mais aussi favoriserait la production de protéine $A\beta$ et est activé par les ROS (Costantini, Scrable et al. 2006).

2.2.2. PRESBYACOUSIE

2.2.2.1 RAPPELS ANATOMO-FONCTIONNELS

La voie principale de l'audition chez les mammifères suit un trajet allant de l'oreille externe au cortex auditif primaire. Lorsqu'un son est émis, il pénètre d'abord dans l'oreille externe, constituée d'un pavillon puis d'un conduit auditif externe. Au fond de ce conduit auditif externe, les vibrations sonores mettent en mouvement une fine membrane délimitant l'oreille moyenne : le tympan. Elles sont ensuite transmises par les osselets (marteau, enclume puis étrier) jusqu'à la fenêtre ovale, qui sépare l'oreille moyenne de l'oreille interne. Cette dernière se situe dans la bulle tympanique et comporte deux organes sensoriels : le vestibule, essentiel pour l'équilibre, et la cochlée, organe de l'audition. La vibration sonore est transmise le long de la cochlée et y est transformée en influx nerveux. Au sein de la cochlée, un premier relai se fait entre la cellule ciliée interne et le neurone auditif primaire. Les neurones auditifs primaires se regroupent au sein du ganglion spiral et forment le nerf auditif primaire qui se projette sur les noyaux cochléaires du tronc cérébral. Un troisième relais se fait dans le complexe olivaire supérieur, puis un quatrième dans le colliculus supérieur du mésencéphale. Un dernier relais est effectué dans le thalamus avant la projection finale sur le cortex auditif (Figure 4).



Figure 4 : Représentation schématique des voies auditives issues de la cochlée et aboutissant au cortex auditif primaire. On note une décussation des voies entre le noyau cochléaire et le complexe olivaire supérieur.

Tout au long de cette voie auditive principale, un organe nous intéresse tout particulièrement : la cochlée et en son sein, les cellules ciliées internes.

La cochlée est enchâssée dans la capsule otique. Elle prend la forme d'une spirale composée d'un axe osseux, le modiolus, et de trois compartiments enroulés : les rampes vestibulaires, tympaniques et le canal cochléaire. Elle communique avec l'oreille externe par deux orifices fermés par une membrane :

- la fenêtre ovale sur laquelle est posé l'étrier et qui constitue la base de la rampe vestibulaire et

- la fenêtre ronde qui limite la base de la rampe tympanique et constitue une zone d'échappement de pression.

Les rampes vestibulaire et tympanique sont emplies d'endolymphe et communiquent entre elles par un orifice situé à l'apex de la cochlée : l'hélicotrème. Le canal cochléaire est empli d'endolymphe. Entre le canal cochléaire et la rampe tympanique se trouve l'organe de Corti, organe sensori-nerveux de la cochlée (Figure 5).



D'après R Pujol, S Blatrix, www.cochlea.eu

Figure 5: Représentation schématique de la cochlée et coupe transversale de l'organe de Corti. La cochlée possède en son centre un axe osseux contenant les axones des neurones du ganglion spiral, composant le nerf auditif. Autour de cet axe prend place une spirale de trois compartiments : les rampes vestibulaires et tympaniques emplies de périlymphe (bleue) et le canal cochléaire empli d'endolymphe (verte). L'organe de Corti (rose) porte les cellules sensorielles coiffées de stéréocils, recouvertes par la membrane tectoriale. Leur base repose sur la membrane basilaire au travers de laquelle émerge le nerf auditif.

Cet organe contient les cellules sensorielles, ou cellules ciliées, les fibres nerveuses, et les structures annexes ou de support. Les cellules sensorielles sont coiffées de stéréocils à leur apex. Ils sont recouverts de la membrane tectoriale qui flotte dans l'endolymphe du canal cochléaire. En dehors des stéréocils des cellules ciliées qui sont en contact avec l'endolymphe, le corps et la base des cellules ciliées baigne dans la périlymphe. Dans l'organe de Corti, on retrouve une rangée de cellules ciliées internes (CCI), et trois rangées de cellules ciliées externes (CCE). Les CCI et les CCE diffèrent par leur forme et leur fonction. Les fibres nerveuses contactent la partie basale des cellules ciliées internes et gagnent ou quittent l'organe de Corti au travers de la membrane basilaire. Les neurones bipolaires dont elles sont issues ont leur corps cellulaires dans le ganglion spiral qui s'enroule autour du modiolus. Leurs axones forment le nerf cochléaire qui occupe l'intérieur du modiolus d'une part, et le nerf auditif d'autre part (Figure 5).

La vibration sonore, lorsqu'elle atteint la fenêtre ovale, est transmise à la périlymphe de la rampe vestibulaire. Cette onde de pression va déformer la membrane basilaire en un lieu de la cochlée qui dépend de la fréquence. Les fréquences aigues agissent à la base de la cochlée, et les fréquences graves à son apex. On nomme ce codage en fréquence la tonotopie cochléaire. L'onde de pression est ensuite évacuée au sein de la périlymphe de la rampe tympanique jusqu'à la fenêtre ronde.

Au sein de l'organe de Corti, le mouvement vertical de la membrane basilaire, induit par l'onde de pression de la périlymphe de la rampe vestibulaire, met en mouvement horizontalement les stéréocils des cellules ciliées externes puis internes. Ces derniers sont associés à la membrane tectoriale. Les stéréocils des cellules ciliées sont le siège de la transduction mécano-électrique, c'est à dire de la transformation de la vibration sonore en un message nerveux. La déflection des stéréocils provoque l'ouverture de canaux sensibles à l'étirement. L'endolymphe dans laquelle baigne les stéréocils est très riche en potassium, tandis que la périlymphe dans laquelle baigne le corps de cellules ciliées est riche en sodium. La différence entre le potentiel endocochléaire (+80mV) et le potentiel de membrane des cellules ciliées (entre -70 et -55mV) provoque donc une entrée massive de potassium dans les cellules ciliées lors de l'ouverture des canaux sensibles à l'étirement, et les dépolarise. Le calcium entrant également dans la cellule ciliée se fixe sur les canaux potassiques, et permet ainsi une fermeture partielle et rapide des canaux. À cela s'ajoute une fermeture mécanique plus lente des canaux potassiques par activation des myosines par le calcium et leur déplacement le long des filaments d'actine des stéréocils. Cette fermeture auto-induite des canaux potassiques permet aux cycles de stimulation de s'enchainer rapidement.

La dépolarisation des cellules ciliées n'a pas le même effet selon que l'on se situe dans les cellules ciliées externes ou internes. Les cellules ciliées externes dépolarisées se contractent et amplifie ainsi la vibration initiale, tout en assurant le rôle de filtre sélectif. Les cellules ciliées internes dépolarisées vont pour leur part permettre la libération de glutamate au niveau des synapses dites en ruban situées en leur base. Ce glutamate va stimuler les neurones auditifs primaires, permettant la transmission de l'information auditive (Nouvian, 2006).

2.2.2.2 ÉPIDÉMIOLOGIE ET CLINIQUE

La presbyacousie est une perte auditive liée à l'âge qui concerne en moyenne entre 33 et 66% des personnes de plus de 70 ans selon les études (Cruickshanks, Wiley et al. 1998; Campbell, Crews et al. 1999). Elle touche préférentiellement les hommes, les sujets consommateurs d'alcool et de tabac, présentant une hypertension artérielle ou un antécédent de dépression (Davanipour, Lu et al. 2000).

Elle est connue pour favoriser l'apparition de troubles cognitifs, les amplifier et accélérer leur évolution péjorative. Elle augmente également le risque de chute et de dépression (Martini, Mazzoli et al. 2001; Campbell, Crews et al. 1999).

Cliniquement, la presbyacousie se caractérise par une élévation progressive des seuils auditifs. Aux stades débutants, le patient présente des difficultés de compréhension dans le bruit. À des stades plus avancés, la surdité de perception bilatérale touche d'abord les hautes fréquences. La presbyacousie s'accompagne parfois d'acouphènes, probablement en lien avec un facteur de risque commun à ces deux pathologies : l'exposition au bruit (Bouccara, 2005).

2.2.2.3 PHYSIOPATHOLOGIE

Les facteurs favorisant l'apparition de la presbyacousie sont à la fois génétiques et liés à l'environnement.

L'exposition au bruit provoque des lésions des CCE, CCI et de la synapse en ruban plus ou moins réversibles, favorisant l'apparition de la presbyacousie lors de l'avancée en âge. Certains facteurs de risque cardiovasculaires, en provoquant certainement des lésions de la strie vasculaire, sont également corrélés à un risque accru de presbyacousie. Comme dans la maturation du système respiratoire du nouveau né, l'exposition à divers agents pathogènes favorise le développement d'une presbyacousie. Enfin les radicaux libres et le stress oxydant, comme dans la plupart des pathologies liées au vieillissement, ont un impact négatif sur l'audition lors de l'avancée en âge (Bouccara, 2005).

De nombreuses études se sont penchées sur les facteurs génétiques impliqués dans la presbyacousie. Certaines surdités non syndromiques cliniquement proches des symptômes de la presbyacousie permettent d'envisager certains gènes candidats. Les mutations de l'ADN mitochondrial, via notamment le stress oxydatif, semblent jouer le rôle de cofacteur de risque de presbyacousie (Bouccara, 2005).

En dehors de la prévention des facteurs de risque et de l'appareillage audioprothétique permettant de compenser le handicap lié à la presbyacousie, aucun traitement curatif n'est à ce jour disponible.

Points clef Pathologies au cours du vieillissement

> Les troubles neurocognitifs majeurs :

- sont associés à des symptômes psycho-comportementaux invalidants,
- présentent une physiopathologie très diverse.

> La physiopathologie de la maladie d'Azheimer comprend :

- des plaques neuritiques extracellulaires composées de protéines β -amyloïdes,
- une dégenérescence neurofibrillaire impliquant la protéine Tau hyperphosphorylée,
- une perte synaptique touchant essentiellement les cellules pyramidales,

- une atteinte de tous les systèmes de neurotransmetteurs,

-une atteinte de l'unité neurovasculaire, des astrocytes, et une activation du stress oxydatif.

> La presbyacousie :

-altère la compréhension des sons dans le bruit puis l'audition des hautes fréquences - présente une physiopathologie non encore élucidée,

- nécessite d'étudier des surdités génétiques non syndromiques cliniquement,proches afin de découvrir des pistes physiopathologiques et thérapeutiques.

2. 3. SOURIS SAMP8, MODÈLE D'ÉTUDE DU VIEILLISSEMENT CÉRÉBRAL ET SENSORIEL PRÉCOCE

Il existe de très nombreux modèles animaux ou cellulaires d'étude du vieillissement. Nous avons choisi ici de nous intéresser à un modèle murin de sénescence accélérée, les souris SAMP, et plus particulièrement les SAMP8.

L'avancée en âge d'un individu suit plusieurs étapes : la différenciation, le développement, la maturation puis la sénescence (Figure 6). Elle dépend du temps et est un processus progressif. En théorie, nous pouvons distinguer la sénescence accélérée du vieillissement prématuré (Figure 6). Dans la pratique, ces deux phénomènes se chevauchent et les souris SAMP sont un modèle de cette avancée en âge pathologique (Hosokawa, Abe et al. 1997). Ces souris ne sont pas obtenues par mutagenèse dirigée, et sont considérées comme un modèle animal écologique – car spontané - de la fragilité au sens gériatrique du terme (Lopez-Ramos, Jurado-Parras et al. 2012).



Figure 6 : Représentation schématique du modèle de vieillissement selon Hosokawa et al.

2.3.1. GENÈSE DE LA LIGNÉE MURINE SAM

En 1968, quelques souris AKR/J ont été données par le laboratoire Jackson à l'institut de recherche sur les maladies thoraciques de l'université de Kyoto. Durant le maintien de

cette lignée, certaines souris présentaient une sénescence accélérée. En 1975, l'équipe du Professeur Takeda a croisé ces souris sélectionnées selon leur degré de sénescence et leur phénotype pathologique (Higuchi 1997). Les souris SAMP (*Senescence Accelerated Mouse Prone*) au vieillissement prématuré, et les souris SAMR (*Senescence Accelerated Mouse Resistance*) au vieillissement normal, ont ainsi été obtenues. L'équipe de Takeda annonça en 1981 la naissance de ce modèle murin consanguin de sénescence accélérée (Takeda, Hosokawa et al. 1981). Il existait initialement 5 progéniteurs SAMP et 3 SAMR. Puis après un travail précis de sélection et d'endogamie, 14 sous-lignées SAMP et 4 SAMR ont été stabilisées (Hosokawa, Abe et al. 1997; Takeda 2009).

Chacune de ces sous-lignées possède un phénotype particulier. Les déficits décrits chez les différentes sous-lignées SAMP dépendent du pourcentage de gènes hérités. Lorsque l'on réalise des croisements avec des lignées saines, les déficits s'atténuent progressivement (Morley 2002). Les mécanismes impliqués dans la sénescence accélérée de ces souris sont multiples. L'immortalisation en culture de fibroblastes issus de souris SAMP est deux fois plus rapide que celle des souris SAMR. Ces fibroblastes présentent également plus d'aberrations chromosomiques et de dommages de leur ADN. Enfin la décroissance de la taille de leurs télomères est plus rapide (Hosokawa, Fujisawa et al. 1997). Les gènes impliqués dans cette sénescence accélérée sont nombreux. Dans ce modèle animal, on ne peut définir une mutation particulière responsable de cette accélération de la sénescence. Toutes ces particularités font des souris SAMP8 un outil de choix pour étudier les processus de vieillissement pathologique.

Parmi les différentes sous-lignées de souris SAMP, les SAMP8 constituent un excellent modèle d'étude de la maladie d'Alzheimer. Nous détaillons ci-après les caractéristiques comportementales, neuro-pathologiques, neurochimiques et pharmacologiques de ces animaux (Morley 2002). Les souris SAMP8 présentent une sénescence avancée irréversible, une baisse de leur espérance de vie, une lordose, une perte de leurs poils et des troubles mnésiques (Takeda, Hosokawa et al. 1994). Dans les études portant sur les souris SAMP8, les témoins sains habituellement utilisés sont les souris SAMR1, dont le vieillissement est considéré comme normal (Takeda 1999).

2.3.2. PROFIL COGNITIF ET COMPORTEMENTAL

Sur le plan cognitif et en comparaison avec les souris SAMR1, les souris SAMP8 présentent une altération de l'acquisition des réponses passives d'évitement dès 2 mois (Miyamoto 1997). Ce défaut d'apprentissage s'aggrave avec l'âge et est associé à un défaut de rétention de l'information apprise (Miyamoto, Kiyota et al. 1992). Dans le test de la piscine de Morris (Morris Water Maze, MWM) qui permet d'évaluer la mémoire spatiale et l'apprentissage, les souris SAMP8 présentent également une altération de leur mémoire spatiale à partir de 4 à 6 mois, caractérisée par une augmentation de la latence dans cette tâche (Miyamoto, Kiyota et al. 1986; Miyamoto 1997; Markowska, Spangler et al. 1998; Hu, Liu et al. 2012). Dans des tâches d'apprentissage spatial par appétence, l'apprentissage ainsi que la mémoire de travail sont également déficitaires (Miyamoto 1997; Flood and Morley 1992). Le test de la piscine à 6 bras (Radial six-arm Water Maze) détecte précocement un déficit de la mémoire spatiale et de travail dès 3 mois chez les souris SAMP8 (Chen, Wang et al. 2004). Enfin ces anomalies se confirment dans des tâches de reconnaissance d'objet dès l'âge de 6 mois (Lopez-Ramos, Jurado-Parras et al. 2012). Les tâches de conditionnement à la peur (*Fear Conditioning*) évaluent quant à elles la mémoire associative et l'apprentissage spatial, testant le lien entre mémoire, lieu et émotion. Les souris SAMP8 ne présentent pas de déficit de la mémoire associative, mais il existe des persévérations et un déficit d'apprentissage contextuel (Ohta, Akiguchi et al. 2001).

Il semblerait cependant que ces altérations mnésiques précoces décrites chez les souris SAMP8 soient à pondérer en raison d'une diminution de leur motivation (Flood and Morley 1992) et de l'attrait pour la nouveauté avec l'avancée en âge (Lopez-Ramos, Jurado-Parras et al. 2012). Les souris SAMP8 semblent ainsi présenter un syndrome néophobique, évoquant la néophobie gustative décrite chez des rats âgés (Collier, Greene et al. 2004).

Sur le plan comportemental, les souris SAMP8 présentent une diminution de l'anxiété dans le test du labyrinthe en croix surélevé (*Elavated Plus Maze*, EPM). En EPM, les souris SAMP8 passent plus de temps dans les bras ouverts dès l'âge de 4 mois

(Miyamoto, Kiyota et al. 1992). Ce profil anxiolytique est également observé chez les souris SAMR1, mais à partir de 20 mois (Miyamoto, Kiyota et al. 1992).

Enfin il est noté une augmentation de l'activité motrice spontanée dès 4 mois mais qui s'atténue à 12 mois chez les souris SAMP8. Cette hyperactivité diurne s'accompagne d'une augmentation de la boisson le jour, et d'une baisse la nuit, signe d'un trouble du rythme circadien (Miyamoto 1997; Takeda 2009).

Outre ce vieillissement cérébral précoce, les souris SAMP8 présentent également une presbyacousie dès l'âge de 6 mois (Menardo, Tang et al. 2012).

Notons qu'il existe une différence entre souris SAMP8 mâles et femelles. Les femelles présentent un défaut d'apprentissage supérieur à celui des mâles à partir de 5 mois, ainsi qu'une altération plus sévère de la rétention des informations apprises (Tomobe and Nomura 2009). L'ovariectomie n'influence pas cette différence de phénotype (Flood, Farr et al. 1995).

2.3.3. PROFIL NEURO-PATHOLOGIQUE

Sur le plan neuro-pathologique, Takeda décrit trois grands types de modifications (Takeda 2009) :

Les modifications du groupe A concernent des anomalies physiologiques liées à l'âge. On y classe : i) la présence d'inclusions intra-neuronales thalamiques, ii) la baisse de densité des épines dendritiques des cellules pyramidales de la région CA1 hippocampique (Sugiyama, Akiyama et al. 1987 ; del Valle, Bayod et al. 2012), iii) des dystrophies axonales sphénoïdales au sein du noyau cunéiforme dorsal, iv) une astrogliose (Nomura and Okuma 1999), ou encore v) une letopigmentose. Ces anomalies sont anormalement précoces chez les souris SAMP8.

Les modifications du groupe B ne sont pas des anomalies identitaires, mais sont comparables à celles observées dans la maladie d'Alzheimer. Il s'agit des dépôts β amyloïdes dans le cortex, l'hippocampe, le cervelet et les noyaux des nerfs crâniens (Morley, Kumar et al. 2000; Del Valle, Duran-Vilaregut et al. 2010; Butterfield and Poon 2005). Notons également une hyperphosphorylation de la protéine Tau sur sa Serine³⁹⁶, sa Sérine⁴⁰⁴, et sa Thréonine²³¹ dans le cortex, l'hippocampe et le striatum (Canudas, Gutierrez-Cuesta et al. 2005). Il n'est par contre pas retrouvé de plaques séniles (Takeda 2009). Dans la maladie d'Alzheimer, la densité de plaques amyloïdes selon les régions corticales ou sous corticales étudiées sont peu corrélées à la sévérité des troubles neurodégénératifs (Samuel, Terry et al. 1994). Dans les études post-mortem, c'est la perte de neurones dans la région CA1 de hippocampe qui est la plus distinctive (West, Coleman et al. 1994). Chez les souris SAMP8, on retrouve cette même perte neuronale précoce dans les régions CA1, CA3 et le gyrus denté hippocampiques, corrélant avec les déficits mnésiques à 8 mois (Li, Cheng et al. 2013). De la même manière, la densité synaptique est prédictive des troubles cognitifs observés dans la maladie d'Alzheimer (Samuel, Terry et al. 1994). Cette densité synaptique est diminuée chez les souris SAMP8 (Tomobe and Nomura 2009).

Les modifications du groupe C sont spécifiques aux souris SAMP8. On y trouve une dégénérescence spongiforme (Yagi, Irino et al. 1989) et des vacuolisations intraneuronales (Yagi, Akiguchi et al. 1998).

Enfin il existe une myriade d'autres anomalies telles que : i) une prolifération et l'activation de la microglie (Amano, Nakanishi et al. 1995), ii) une réaction inflammatoire chronique (Kawamata, Akiguchi et al. 1998), iii) une dégénérescence cérébelleuse, iv) une atteinte précoce des neurones dopaminergiques de la substance noire et noradrénergique du locus coeruleus (Karasawa, Nagatsu et al. 1997), ou encore v) une dégénérecence oligodendrocytaire à l'origine d'une démyélinisation entre 2 et 5 mois suivie d'une remyélinisation aberrante à partie de 8 mois (Kawamata, Akiguchi et al. 1998), (Tanaka, Okuma et al. 2005). Il est également noté une atteinte de la barrière hémato-encéphalique (BHE) dès 6 mois (Del Valle, Duran-Vilaregut et al. 2009), comme le suggère l'augmentation de l'extravasation des immunoglobulines au travers de la BHE dans l'hippocampe des souris SAMP8 (Pelegri, Canudas et al. 2007). Les vaisseaux cérébraux sont endommagés précocement, comme le montrent des lésions évocatrices d'angiopathie amyloïde (del Valle, Duran-Vilaregut et al. 2011) ou des plaques athéromateuses (Fenton, Huang et al. 2004), et la microcirculation cérébrale s'en trouve altérée (Ueno, Sakamoto et al. 2001).

2.3.4. PROFIL NEURO-CELLULAIRE

Sur le plan cellulaire les souris SAMP8 présentent une altération du fonctionnement mitochondrial. Il existe une augmentation du potentiel redox mitochondrial et une augmentation de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale, associées à une baisse du contrôle de cette chaîne respiratoire mitochondriale. Il en résulte une hyperactivité respiratoire mitochondriale inefficace (Nakahara, Kanno et al. 1998). Cette dysfonction mitochondriale entretient et s'ajoute à une suractivation du stress oxydatif et une diminution de l'efficacité des systèmes de lutte contre les radicaux libres ou ROS (Sato, Kurokawa et al. 1996; Sato, Oda et al. 1996; Gong, Liu et al. 2008; Zhang, Ding et al. 2009). Le nombre de mutation de l'ADN mitochondrial est également considérablement augmenté (Fujibayashi, Yamamoto et al. 1998). Dans le cerveau des souris SAMP8, le stress oxydatif et l'inflammation sont très largement augmentés par rapport aux souris SAMR1, et ce dès l'âge de 5 mois (Sureda, Gutierrez-Cuesta et al. 2006; Alvarez-Garcia, Vega-Naredo et al. 2006; Bayram, Nikolai et al. 2013). Dans l'oreille interne, les souris SAMP8 présentent par ailleurs une inflammation, un stress oxydatif et une activation de l'apoptose et de l'autophagie accrus à l'origine de leur presbyacousie (Menardo, Tang et al. 2012). À noter que les femelles SAMP8 présentent un stress oxydatif moins marqué que les mâles (Pallas, Camins et al. 2008).

Les souris SAMP8 présentent également une altération de la LTP (*Long Term Potentialisation*). Il existe deux phases dans la LTP : la phase précoce (E-LTP, *Early-Long Term Potentialisation*), dépendante des récepteurs NMDA, de la CAMKII et de la PKC ; et la phase tardive (L-LTP, *Late-Long Term Potentialisation*) dépendante de la protéine CREB (Tomobe and Nomura 2009). Les souris SAMP8 présentent une baisse drastique de la E-LTP du fait de l'atteinte des récepteurs NMDA. On observe également une baisse de L-LTP du fait d'une baisse de l'expression de la protéine CREB phosphorylée (Tomobe and Nomura 2009). La L-LTP est associé à la formation d'épines dendritiques dans l'hippocampe (Toni, Buchs et al. 1999). La densité des épines est donc réduite sur les dendrites des cellules pyramidales de la région CA1 hippocampique des souris

SAMP8 (Tomobe and Nomura 2009). Une atteinte de la régulation des flux calciques intracellulaires participe également au déficit de LTP observé dans l'hippocampe des souris SAMP8 (Yamada, Uchida et al. 1996). Ceci explique en partie les troubles mnésiques sus-décrits. Cette baisse de la LTP est liée à un déficit de plasticité synaptique du circuit reliant l'hippocampe au cortex préfrontal médian, déficit corrélé au défaut d'apprentissage des souris SAMP8 (Lopez-Ramos, Jurado-Parras et al. 2012).

La formation des épines dendritiques, et la plasticité synaptique qui résulte de ces épines dendritiques, dépendent en partie de l'imprégnation oestrogénique (Leranth, Shanabrough et al. 2000). L'oestradiol augmente la sensibilité des cellules pyramidales de la région CA1 hippocampique aux stimulations liées aux récepteurs NMDA, induisant ainsi une augmentation de la densité synaptique (Woolley, Weiland et al. 1997). Chez les souris SAMP8, il existe dès deux mois une diminution de l'expression du récepteur aux oestrogènes dans la région CA1 hippocampique. Cette baisse est corrélée à une réduction de la taille des épines dendritiques des neurones pyramidaux hippocampique plus marquée chez les femelles que chez les mâles (Tomobe and Nomura 2009). Ces données constituent une piste pour expliquer les différences comportementales observées entre mâles et femelles chez les souris SAMP8.

2.3.5. PROFIL NEUROCHIMIQUE

Sur le plan neurochimique, de nombreux systèmes de neurotransmetteurs sont altérés dans le cerveau des souris SAMP8.

Il existe une hyperglutamatergie corticale et hippocampique associée à une augmentation de la libération de glutamate après une dépolarisation chez les souris SAMP8 (Kitamura, Zhao et al. 1992). En théorie, cette libération accrue de glutamate pourrait être source d'excitotoxicité. Les récepteurs NMDA post-synaptiques hippocampiques sont pour leur part sous exprimés et moins fonctionnels (Kitamura, Zhao et al. 1992; Nomura, Kitamura et al. 1997). Cette altération anatomique et fonctionnelle des récepteurs NMDA aboutit à une modification de la libération d'acétylcholine et de noradrénaline dépendante des récepteurs NMDA (Zhao, Kitamura et al. 1992). Il en résulte une baisse fonctionnelle d'acétylcholine hippocampique et une augmentation de la libération de noradrénaline dans le cortex frontal (Kitamura, Zhao et al. 1989). Du fait de la diminution de l'expression et de la fonctionnalité des récepteurs NMDA, le récepteur sérotoninergique 5HT_{1A} est également moins fonctionnel dans l'hippocampe des souris SAMP8 (Nomura and Okuma 1999).

La dysfonction glutamatergique précoce observée chez les souris SAMP8 entraîne ainsi une altération de la voie septo-hippocampique (Figure 7) (Flood and Morley 1998).



Figure 7 : Représentation schématique des régulations de la voie septo-hippocampique. Les flèches rouges figurent une inhibition. DA : dopamine ; NE : noradrénaline ; 5-HT : sérotonine ; GABA : acide γ -aminobutirique ; Ach : acétylcholine ; Glut : glutamate ; SN : substance noire ; LC : locus coeruleus.

Chez les souris SAMP8, il existe une baisse de la libération des neurotransmetteurs issus des neurones dopaminergiques de la substance noire, noradrénergiques du locus coeruleus, et sérotoninergiques du raphé, se projetant sur les interneurones GABAergiques septaux. En résulte une augmentation de l'inhibition des neurones cholinergiques hippocampiques par ces interneurones GABAergiques. La dysfonction glutamatergique perturbe également la boucle de régulation négative issue des neurones glutamatergiques hippocampiques. Ces dysfonctionnements aboutissent à l'altération des oscillations thêta pilotées par cette voie septo-hippocampique (Flood and Morley 1998).

La diminution de la libération d'acétylcholine est bien décrite dans l'hippocampe de souris âgées. Chez les souris SAMP8, cette détérioration est très précoce, dès l'âge de 4 à 6 mois, signe d'un vieillissement cérébral précoce. Elle contribuerait à la baisse des performances cognitives (Takei, Nihonmatsu et al. 1989). La détérioration du système noradrénergique et sérotoninergique expliquerait pour sa part le caractère moins anxieux des souris SAMP8 (Miyamoto 1997).

De fait, les souris SAMP8 présentent un déficit précoce de plasticité synaptique et de LTP dans la région CA1 hippocampique qui s'aggrave avec l'âge (del Valle, Bayod et al. 2012). Il semblerait que ce déficit soit d'abord fonctionnel, en raison de la baisse in vivo des afférences septo-hippocampiques. Intrinsèquement la LTP n'est pas altérée précocement. Des études en stimulation directe montrent en effet une préservation de la LTP à 5 mois chez des souris SAMP8. Mais lors de l'avancée en âge l'atteinte fonctionnelle des récepteurs NMDA et muscariniques dans l'hippocampique chronique. Ceci aboutirait finalement à une altération intrinsèque de la LTP à 12 mois (Flood and Morley 1998). Ce défaut de LTP lié à l'atteinte de récepteurs NMDA semble également être influencé par un dysfonctionnement astrocytaire (Yang, Qiao et al. 2005).

2.3.6. PROFIL NEURO-PHARMACOLOGIQUE

De très nombreux traitements ont été testés afin de limiter la senescence accélérée des souris SAMP8.

Les agonistes cholinergiques et sérotoninergiques améliorent le déficit de rétention des souris SAMP8, avec une augmentation des doses nécessaire lors de l'avancée en âge (Flood, Morley et al. 1993). Le glutamate à doses croissantes améliore également la LTP hippocampique des souris SAMP8 (Flood, Harris et al. 1996). Ces données concordent avec l'atteinte de la voie septo-hippocampique décrite ci-dessus.

Le propanolol diminue pour sa part l'hyperphosphorylation de la protéine Tau et l'expression de la protéine A β -42. Ceci conduit à une amélioration de la plasticité synaptique et réduit ainsi les altérations cognitives des souris SAMP8, via une action de la kinase JNK1 (Dobarro, Orejana et al. 2013).

Enfin divers herbes chinoises et antioxydants en administration chronique ont montré des effets bénéfiques sur les troubles cognitifs et neuro-pathologiques décrits chez les souris SAMP8 (Nishizawa, Saito et al. 1990), (Miyamoto 1997).

La physiopathologie impliquée dans le vieillissement cérébral et sensoriel précoce des souris SAMP8 est donc complexe. Elle implique à la fois des processus cellulaires inflammatoires, oxydatifs. Au niveau central, la dysfonction synaptique glutamatergique semble retentir sur les autres systèmes de neurotransmetteurs (Butterfield and Poon 2005).

Points clef Souris SAMP8, modèle d'étude du vieillissement cérébral et sensoriel précoce > Les souris SAMP8 : - sont des modèles écologiques de sénescence accélérée, équivalent de fragilité gériatrique, - sont un modèle d'étude de la maladie d'Alzheimer. > Sur le plan comportemental, les souris SAMP8 présentent : - une atteinte de l'apprentissage et de la rétention mnésique, - une baisse de leur motivation et un moindre attrait pour la nouveauté, - un phénotype moins anxieux, - une augmentation de leur activité locomotrice. > Sur le plan neuropathologique, les souris SAMP8 présentent : - un vieillissement pysiologique précoce, - un vieillissement pathologique (dépôts β -amyloïdes, hyperphosphorylation de Tau, pertes neuronales), - des anomalies spécifiques, - une atteinte de la barrière hémato-encéphalique et de la microglie, - un stress oxydatif accru. > Sur le plan neurochimique, les souris SAMP8 présentent : - une augmentation de la transmission glutamatergique, - une hypocholinergie hippocampique, - une hypernoradrénergie du cortex frontal, - une hyposérotoninergie hippocampique, - une atteinte de la voie septo-hippocampique provoquant : *une altération des oscillations GABA et des rythmes θ *un défaut de LTP et de plasticité synaptique.

3. VGLUTs

3. 1. GÉNÉRALITÉS SUR LA NEUROTRANSMISSION

Le glutamate est le neurotransmetteur excitateur principal du système nerveux central. Il est présent dans tous les types cellulaires et peut franchir la barrière hématoencéphalique. Dans les neurones, il est synthétisé à partir de l' α -cétoglutarate et de la glutamine au sein des mitochondries des terminaisons axonales (Reijnierse, Veldstra et al. 1975; Bradford and Ward 1976). Il est ensuite accumulé dans les vésicules synaptiques (SV) par les transporteurs vésiculaires du glutamate (VGLUTs). Après sa libération dans la fente synaptique, le glutamate stimule des récepteurs ionotropiques NMDA ou AMPA ainsi que des récepteurs métabotropiques (mGLUR). L'inactivation du signal se fait très rapidement et essentiellement grâce à des transporteurs présents à la surface des cellules gliales environnantes (Danbolt 2001).

Le glutamate provoque une réponse excitatrice sous forme d'un potentiel postsynaptique excitateur (EPSP, *Excitatory Post-Synaptic Potential*). En cas de transmission synaptique à basse fréquence, le glutamate se lie aux récepteurs AMPA. Les récepteurs NMDA ne sont activés que par une transmission synaptique à haute fréquence, permettant l'entrée massive de calcium dans le neurone post-synaptique. Cette entrée de calcium est à l'origine de la potentialisation à long terme (LTP), permettant une augmentation durable de l'efficacité synaptique.

Les neurones combinent donc un mode de transmission chimique et électrique. Une très large majorité des neurones (90%) utilisent le glutamate pour communiquer entre eux. Ils sont sous le contrôle d'une petite population de neurone GABAergiques (\approx 10%). Un interneurone GABAergique contrôle de façon inhibitrice plusieurs neurones glutamatergiques. C'est cette divergences des interneurones GABAergique qui permet une synchronisation de l'activité de larges ensembles de neurones glutamatergiques. Cela génère des oscillations (comme les rythmes thêta par exemple) essentiels à bon nombre de processus cognitifs. Le glutamate est ainsi impliqué dans les processus d'apprentissage et de mémorisation (Chen, Wang et al. 2004). Au cours du développement, un subtil équilibre entre le système GABAergique et glutamatergique intervient dans la construction des réseaux neuronaux, la synaptogenèse et la plasticité synaptique (Deng, Yao et al. 2007; Gatto and Broadie 2010). En participant à l'induction et à l'élimination des synapses, le glutamate jouerait un rôle dans le développement du système nerveux central et peut être également dans la neurodégenérescence (Collingridge, Peineau et al. 2010).

Dans ces systèmes glutamatergiques complexes, les VGLUTs sont des marqueurs anatomiques et fonctionnels essentiels. Ces transporteurs sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques.

3. 2. GÉNÉRALITÉS SUR LES VGLUTS

3.2.1. DÉCOUVERTE DES TROIS VGLUTS

Les transporteurs vésiculaires des neurotransmetteurs permettent l'accumulation de ces derniers dans les vésicules synaptiques. À ce jour, plusieurs sous-types de transporteurs vésiculaires ont été décrits dans le système nerveux central. Ils appartiennent à trois grandes familles dites SLC (*Solute Carriers*) : SLC17, SLC18 et SLC32. La famille SLC18 assure le transport des neurotransmetteurs cationiques, tels que l'acétylcholine, l'adrénaline, la dopamine, l'histamine et la sérotonine (Eiden 2000), (Parsons 2000). La famille SLC32 comprend des transporteurs des neurotransmetteurs neutres tels que le GABA et la glycine (Sagne, El Mestikawy et al. 1997, Gasnier 2000). Enfin, les transporteurs vésiculaires membres de la famille SLC17 transportent des neurotransmetteurs anioniques tel que le glutamate (El Mestikawy, Wallen-Mackenzie et al. 2011; Miyaji, Echigo et al. 2008).

Depuis 2000, trois VGLUTs (VGLUT1-3) ont été identifiés.

Le premier à avoir été décrit est VGLUT1. Il a d'abord été appelé BNPI (*brain-specific Na⁺-dependent inorganic phosphate transporter type I*). BNPI fut initialement identifié

comme un transporteur de phosphate inorganique dépendant du sodium présent entre autre dans les neurones du cortex cérébral, hippocampique et cérébelleux (Ni, Rosteck et al. 1994). Par la suite, BNPI fut détecté dans des terminaisons synaptiques de neurones glutamatergiques (Bellocchio, Hu et al. 1998). Il faudra attendre 2000 pour que deux équipes confirment simultanément l'implication de BNPI dans le transport vésiculaire du glutamate, rebaptisant cette protéine VGLUT1 (Bellocchio, Reimer et al. 2000; Takamori, Rhee et al. 2000).

La même année, un second transporteur de la famille SLC17 est découvert. Il est nommé DNPI (*Differenciation-Associated Na⁺-Dependent Inorganic Phosphate Transporter*) en raison de son homologie importante avec la protéine humaine BNPI/VGLUT1 (près de 92% d'homologie) (Aihara, Mashima et al. 2000). En 2001, sa fonction de transporteur vésiculaire de glutamate est identifiée, en faisant le VGLUT2 (Bai, Xu et al. 2001; Fremeau, Troyer et al. 2001; Herzog, Bellenchi et al. 2001; Takamori, Rhee et al. 2001; Varoqui, Schafer et al. 2002). La structure de VGLUT1 et VGLUT2 est hautement conservée au cours de l'évolution des vertébrés (Tabb and Ueda 1991). Fonctionnellement, VGLUT2 partage les mêmes propriétés que VGLUT1. De plus, ils sont tous les deux exprimés par les terminaisons glutamatergiques « classiques » (Herzog, Bellenchi et al. 2001)

Enfin en 2002, un troisième transporteur, appelé VGLUT3, est identifié (Gras, Herzog et al. 2002). Il est structurellement et fonctionnellement très proche de VGLUT1 et VGLUT2 (Gras, Herzog et al. 2002; Fremeau, Burman et al. 2002; Schafer, Varoqui et al. 2002; Takamori, Malherbe et al. 2002). VGLUT3 est cependant exprimé par des neurones qui utilisent d'autre transmetteur que le glutamate, laissant présager un rôle atypique (Herzog, Bellenchi et al. 2001; Gras, Herzog et al. 2002).

3.2.2. STRUCTURE

Au cours de l'ontogenèse, l'apparition des VGLUTs est synchrone à la synaptogenèse chez les mammifères (Tabb and Ueda 1991). Les trois VGLUTs présentent un fort degré d'identité, proche des 70% au sein d'une même espèce (Gras, Herzog et al. 2002). Depuis quelques années, il est possible de prédire la structure tridimensionnelle des VGLUTs à

partir d'un lointain orthologue bactérien (*Glycerol-3-Phosphate Transporter* (GlpT)) de E. coli (PDB ID: 1PW4, 19% identité, 39% similarité avec VGLUT3 (Almqvist, Huang et al. 2007)). Les VGLUTs se composeraient de 12 domaines transmembranaires organisés en deux groupes symétriques de 6 domaines transmembranaires chacun, reliés par une longue boucle cytoplasmique (Almqvist, Huang et al. 2007). Ils possèderaient une conformation intra-vésiculaire fermée d'une part, et intra-cytoplasmique ménageant une cavité hydrophile accessible aux substrats d'autre part. Dans la famille des transporteurs vésiculaires SLC17, le 4^{ème} domaine transmembranaire du transporteur de la sialine, très proche de celui des 3 VGLUTs, semble être essentiel à la formation de cette cavité hydrophile (Courville, Quick et al. 2010). En outre, les mutations ponctuelles des acides aminés présents au sein du pore putatif de ce transporteur et des VGLUTs ne mettent pas en péril l'activité de transport du neurotransmetteur concerné. En revanche, ces mutations modifient la conformation des transporteurs et perturbent la liaison des substrats (Courville, Quick et al. 2010; Juge, Yoshida et al. 2006). Cette dernière semble par ailleurs dépendre à la fois des substrats eux-mêmes mais également du flux de protons (Courville, Quick et al. 2010).

La structure des VGLUTs est donc encore assez mal connue. Mieux identifier la conformation et la fonctionnalité de cette dernière permettrait de mieux comprendre l'impact des mutations ponctuelles affectant les VGLUTs, ainsi que les fonctions de ces derniers.

3.2.3. PROPRIÉTÉS PHARMACOLOGIQUES

L'activité des transporteurs vésiculaires dépend de l'existence d'un gradient de protons (H⁺) dans les vésicules synaptiques. Ce gradient est généré par l'ATPase vacuolaire (V-ATPase) (Gasnier 2000). Cette dernière utilise l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP en ADP pour acidifier l'intérieur des vésicules synaptiques. L'accumulation de protons génère un gradient transmembranaire électrochimique ($\Delta\mu$ H⁺). Ce gradient de protons se compose d'un gradient de pH (Δ pH) dû à l'acidité de la vésicule, et d'un gradient électrique ($\Delta\psi$)

dû à la différence de charges positives entre la lumière vésiculaire et le cytoplasme. Ces deux gradients ΔpH et $\Delta \psi$ sont eux-mêmes modulés par la perméabilité de la vésicule aux ions chlore (Cl⁻). Pour un gradient de proton constant, plus la perméabilité aux ions chlore est importante, plus le gradient de pH sera grand par rapport au gradient électrique (Njus, Kelley et al. 1986; Nishi, Shimizu et al. 2002). Le transporteur vésiculaire utilise l'énergie issue de la dissipation du gradient de protons pour accumuler le neurotransmetteur contre son gradient de concentration. Le remplissage vésiculaire est donc le produit d'un antiport proton-neurotransmetteur. Cet antiport dépend principalement de la composante ΔpH ou $\Delta \psi$ du gradient de protons selon que le neurotransmetteur est à l'état cationique, neutre ou anionique dans le cytoplasme. Le glutamate est sous forme anionique dans le cytoplasme. L'activité du transporteur vésiculaire du glutamate dépendra donc principalement du gradient électrique (Maycox, Deckwerth et al. 1988; Edwards 2007) (Figure 8). L'activité des VGLUTs dépend non seulement de la différence de charge ($\Delta \psi$) entre les vésicules synaptiques et le cytoplasme, mais aussi très étroitement de la concentration en chlore (Figure 8).



Figure 8 : Représentation schématique des propriétés bioénergétiques des VGLUTs. Le transport du glutamate dépend essentiellement du gradient électrique ($\Delta \psi$) et très peu du gradient de pH (Δp H). La perméabilité aux ions chlore influe également sur le transport vésiculaire du glutamate.

Le rôle du chlore dans la régulation de l'activité des transporteurs vésiculaires du glutamate est encore mal compris. Les VGLUTs présentent une dépendance biphasique à cet ion. En effet, à forte concentration le chlore inhibe les VGLUTs, à faible concentration (1 – 5 mM) il les active, tandis que son absence totale inhibe les VGLUTs (Omote, Miyaji

et al. 2011). Certains travaux suggèrent d'ailleurs la présence d'un canal chlore non identifié sur les vésicules présynaptiques (pour revue voir (El Mestikawy, Wallen-Mackenzie et al. 2011)).

Les VGLUTs possèdent par ailleurs une faible affinité pour le glutamate, de l'ordre du millimolaire, mais conservent cependant une grande spécificité (Naito and Ueda 1985; Maycox, Deckwerth et al. 1988).

Il existe de nombreux agents agissant sur les transporteurs vésiculaires, mais très peu sont spécifiques des VGLUTs, et aucun n'est spécifique d'un sous-type de VGLUT plutôt qu'un autre. Certains agents inhibent les VGLUTs (et les autres transporteurs vésiculaires) en dissipant le gradient électrochimique de protons, d'autres en agissant comme de puissants antagonistes.

Parmi les composés agissant sur le gradient de protons, on trouve les inhibiteurs non spécifiques et spécifiques des ATPases vacuolaires tels que le N-éthylmaléimide (NEM), ou la bafilomycine (Bowman, Siebers et al. 1988). Les ionophores à protons tels que le Carbonyl Cyanide M-Chloro-Phényldrazone (CCCP) dissipent également le gradient de protons. Enfin l'action sur l'entrée d'anions, en l'occurrence le chlore, permet aussi de réduire l'activité des transporteurs vésiculaires comme dans le cas de l'acide 4,4'-diiothiocyanatostilbène-2,2'-disulfonique (DIDS) (Hartinger and Jahn 1993).

Plusieurs colorants capables d'inhibition compétitive des VGLUTs ont également été identifiés. La concentration nécessaire pour inhiber 50% du transport vésiculaire du glutamate (IC₅₀) est de l'ordre de 10 à 100 nM. Le bleu Evans, dont l'IC₅₀ se situe à 87 nM, inhibe le transport vésiculaire du glutamate à faible concentration mais est peu spécifique (Roseth, Fykse et al. 1995). Le Chicago Blue Sky agit de la même manière que le bleu Evans mais avec une IC₅₀ plus élevée (3 μ M) (Roseth, Fykse et al. 1995). Le rose Bengale, initialement décrit comme un inhibiteur spécifique non compétitif des VGLUTs, s'avère agir également sur le transporteur vésiculaire des monamines (VMAT) (Ogita, Hirata et al. 2001; Pietrancosta, Kessler et al. 2010). Le bleu Trypan est quant à lui un inhibiteur compétitif spécifique des VGLUTs à la Cl₅₀ de 49 nM (Roseth, Fykse et al. 1995). À ce jour, le jaune brillant, dont l'IC₅₀ se situe à 40 nM, est l'inhibiteur compétitif spécifique des VGLUTs que affinité, avec une K_i de 12,5 nM contre 50 nM pour le bleu Trypan (Tamura, Ogita et al. 2014). Plus récemment, de petits colorants azoïques inhibiteurs des VGLUTs ont été produits et possèdent une spécificité

importante, préfigurant des outils très utiles pour l'étude des VGLUTs (Favre-Besse, Poirel et al. 2014).

3.2.4. ONTOGENÈSE ET DISTRIBUTION ANATOMIQUE

Au cours du développement prénatal du rat, l'expression de VGLUT1 est faible et augmente progressivement après la naissance (Gras, Vinatier et al. 2005). L'expression de VGLUT2 est forte avant la naissance. On le trouve alors dans des territoires qui à l'âge adulte vont exprimer VGLUT1, comme l'hippocampe ou le cortex. Dans ces zones, VGLUT2 disparait progressivement pour laisser la place à VGLUT1; c'est qu'on a appelé le «*switch* » VGLUT2/VGLUT1 (Gras, Vinatier et al. 2005). L'expression de VGLUT3 quant à elle est observée dans certaines structures (comme les noyaux du raphé) dés la période embryonnaire. Dans d'autres régions (hippocampe, striatum, cortex), elle augmente au cours du développement post-natal (Boulland, Qureshi et al. 2004; Gras, Vinatier et al. 2005; Nakamura, Hioki et al. 2005). Enfin, il faut noter l'expression transitoire de VGLUT3 dans les cellules de Purkinje ou dans les noyaux auditifs du tronc cérébral entre les jours postnataux 5 et 15 chez le rat (Gillespie, Kim et al. 2005; Gras, Vinatier et al. 2005). La raison d'être de cette expression transitoire n'est pas élucidée à l'heure actuelle.

L'ARNm codant pour VGLUT1 est essentiellement détecté dans les régions corticales du système nerveux central. Nous le retrouvons dans les neurones glutamatergiques du bulbe olfactif, des couches II-IV du cortex cérébral, de l'hippocampe (gyrus denté et CA1-3) des couches granulaires du cervelet et de la matière grise périacqueductale (Ni, Rosteck et al. 1994; Herzog, Bellenchi et al. 2001; Varoqui, Schafer et al. 2002). Une quantité moins importante est décrite dans le septum latéral, certains noyaux thalamiques et dans le subiculum. L'ARNm codant pour VGLUT2 est pour sa part fortement exprimé dans les régions sous corticales du système nerveux central, principalement dans le thalamus, l'habénula latérale et médiane, et le noyau subthalamique. Il est également détecté plus modérément dans l'hypothalamus (Aihara, Mashima et al. 2000; Herzog, Bellenchi et al. 2001). L'ARNm codant pour VGLUT3 suit

une distribution plus atypique. Exprimé plus discrètement et de façon plus éparse, il se retrouve dans les ventricules latéraux, les noyaux du raphé, le striatum, les tubercules olfactifs, l'hippocampe, et le cortex cérébral (Herzog, Gilchrist et al. 2004), (Nickerson Poulin, Guerci et al. 2006) (Figure 9).



Figure 9 : Distribution des ARNm codant pour VGLUT1-3 sur des coupes horizontales de cerveau de souris. Abréviations : Cbnu, noyaux cérébelleux ; Cx, cortex ; DR, raphé dorsal ; Hi, hippocampe ; S ; subicculum ; St ; striatum ; Thal, thalamus.

Les neurones glutamatergiques sont des neurones de projection (neurones principaux). De plus VGLUT1 et VGLUT2 sont adressés exclusivement vers les terminaisons nerveuses. Par conséquent, la distribution protéique de VGLUT1 et VGLUT2 est très ubiquitaire et on les retrouve dans toutes les régions cérébrales (Herzog, Bellenchi et al. 2001). VGLUT1 est retrouvé dans le cortex cérébral, l'hippocampe, les bulbes et tubercules olfactifs, le noyau caudé et le putamen, le noyau accumbens, le septum, le thalamus, la couche moléculaire et les fibres moussues de la couche granulaire du cervelet, le noyau pontin, l'hypothalamus, ainsi que dans le tronc cérébral et la moelle épinière dorsale et ventrale (Bellocchio, Hu et al. 1998; Fremeau, Troyer et al. 2001; Fujiyama, Furuta et al. 2001; Kaneko and Fujiyama 2002; Varoqui, Schafer et al. 2002). VGLUT2 est pour sa part exprimé dans toutes les couches corticales, mais plus particulièrement les couches I et IV. On l'observe également dans la couche superficielle externe de la couche des grains du gyrus denté, l'amygdale, le thalamus, le noyau caudé, le putamen, le globus pallidum, les colliculi inférieurs et supérieurs, la substance noire, le tronc cérébral, le cervelet, le bulbe rachidien et la moelle épinière (Fremeau, Troyer et
al. 2001; Herzog, Bellenchi et al. 2001; Fujiyama, Furuta et al. 2001; Kaneko and Fujiyama 2002; Varoqui, Schafer et al. 2002). Enfin, contrairement à VGLUT1 VGLUT2, la protéine VGLUT3 est exprimée dans les somas, dendrites et terminaisons des neuronesVGLUT3-positifs. On trouve VGLUT3 dans les couches corticales II, V et VI, le septum latéral, le striatum, certains noyaux amygdaliens, la substance noire compacte, l'aire tegmentale ventrale, le noyau interpédonculaire et les raphés dorsal et médian (Schafer, Varoqui et al. 2002; Herzog, Gilchrist et al. 2004).

À noter que nous retrouvons également VGLUT1 et VGLU2 dans des motoneurones cholinergiques de la moelle épinière (Herzog, Gilchrist et al. 2004), ainsi que dans différentes cellules rétiniennes (Stella, Li et al. 2008). La présence de VGLUT3 dans la moelle épinière est plus controversée. Enfin VGLUT3 est également exprimé dans l'oreille interne, situation que nous décrirons plus en détail par la suite (cf. paragraphe 3.3.4).

VGLUT1 et VGLUT2 sont quasi exclusivement exprimés dans des terminaisons nerveuses situées à distance du soma neuronal (El Mestikawy, Wallen-Mackenzie et al. 2011). En microscopie électronique dans le système nerveux central, ils sont présents sur de petites vésicules synaptiques localisées dans des terminaisons formant la plupart du temps des contacts asymétriques, morphologie typique des synapses glutamatergiques (Bellocchio, Hu et al. 1998; Herzog, Bellenchi et al. 2001). VGLUT3 est pour sa part exprimé dans des terminaisons glutamatergiques mais aussi cholinergiques, sérotoninergique et GABAergiques, lui conférant des fonctions très particulières (El Mestikawy, Wallen-Mackenzie et al. 2011).

Notons que l'expression des VGLUTs dans le cerveau humain est comparable à la distribution décrite chez le rongeur (Vigneault, Poirel et al. 2015).

Points clef VGLUTs - Généralités

Les transporteurs vésiculaires accumulent les neurotransmetteurs dans les vésicules synaptiques.

> Les VGLUTs :

- appartiennent à la famille des transporteurs SLC17,
- sont au nombre de trois (VGLUT1-3),
- sont très conservés au niveau structurel.

> Le transport vésiculaire de glutamate catalysé par les VGLUTs :

- dépend d'un gradient de protons $\Delta \mu H^+$ possédant deux composantes :
 - *un gradient de pH : ∆pH
 - *un gradient électrique : $\Delta \psi$
 - *modulé par la concentration en chlore intravésiculaire
- dépend essentiellement du $\Delta \psi$.

> La distribution des VGLUTs est essentiellement :

- corticale dans des neurones glutamatergiques pour VGLUT1,
- sous-corticale dans des neurones glutamatergiques pour VGLUT2,
- moins dense et plus éparse, dans des neurones glutamatergiques et non glutamatergiques pour VGLUT3.

3. 3. FONCTIONS DES VGLUTS

3.3.1. EXPRESSION DES VGLUTS DANS DES NEURONES NON GLUTAMATERGIQUES

En 1935, Dale avait établit un principe éponyme selon lequel le neurone fonctionne comme une entité unique, capable de ne libérer qu'un seul type de neurotransmetteur dans toutes ses synapses. À ce jour, il semblerait que ce postulat se vérifie dans de nombreuses synapses mais il existe des exceptions. Certains neurones utilisent en fait plus d'un neurotransmetteur (Strata and Harvey 1999; El Mestikawy, Wallen-Mackenzie et al. 2011). On retrouve ainsi les VGLUTs dans certains neurones non glutamatergiques. Les trois VGLUTs sont exprimés dans quelques neurones cholinergiques et GABAergiques du système nerveux central (Gras, Herzog et al. 2002; Herzog, Landry et al. 2004; Ren, Qin et al. 2011). Seul VGLUT2 est détecté dans des neurones noradrénergiques, adrénergiques et dopaminergiques (Stornetta, Sevigny et al. 2002; Dal Bo, Berube-Carriere et al. 2008). Enfin certains neurones sérotoninergiques des noyaux du raphé expriment VGLUT3 (pour revue voir (El Mestikawy, Wallen-Mackenzie et al. 2011)).

3.3.1.1 NEURONES DOPAMINERGIQUES ET VGLUT2

Pendant le développement embryonnaire, VGLUT2 est exprimé dans des neurones dopaminergiques mésostriés (Dal Bo, Berube-Carriere et al. 2008). Après la naissance, seul 1 à 2% des neurones dopaminergiques maintiennent l'expression de VGLUT2. En revanche après une lésion à la 6-hydroxydopamine (6-OHDA), on retrouve VGLUT2 dans plus d'un quart des neurones dopaminergiques survivants (Dal Bo, Berube-Carriere et al. 2008). Cette observation suggère une induction de l'expression de VGLUT2 dans certaines conditions pathologiques, ou sa régulation négative par la dopamine au sein de

cette voie mésostriée (Berube-Carriere, Riad et al. 2009). Par ailleurs les interneurones GABAergiques striataux semblent être de puissants inhibiteurs des neurones dopaminergiques exprimant VGLUT2 (El Mestikawy, Wallen-Mackenzie et al. 2011). VGLUT2 pourrait donc jouer un rôle complexe dans la régulation de la voie mésostriée au sein d'une triple interaction impliquant dopamine, glutamate et GABA. En culture primaire *in vitro*, les neurones dopaminergiques libèrent du glutamate (Sulzer, Joyce et al. 1998). L'activation optogénique de terminaisons dopaminergiques issues de l'aire tegmentale ventrale permet par ailleurs d'activer les récepteurs AMPA de neurones du noyau accumbens (Stuber, Hnasko et al. 2010). Les neurones dopaminergiques semblent dopaminergiques ou glutamatergiques, et les fibres mixtes dopaminergiques et glutamatergique. La co-transmission dopaminergique et glutamatergique parait donc exister mais reste encore à être démontrée formellement (El Mestikawy, Wallen-Mackenzie et al. 2011).

3.3.1.2 NEURONES SÉROTONINERGIQUES ET VGLUT3

L'ARNm codant pour VGLUT3 est exprimé dans environ 30% des neurones sérotoninergiques du raphé (Gras, Herzog et al. 2002; Schafer, Varoqui et al. 2002; Hioki, Nakamura et al. 2010). Ces neurones sérotoninergiques se projettent dans la plupart des régions du prosencéphale de façon diffuse. Dans le cortex cérébral et dans l'hippocampe, seul un sous groupe de terminaisons axonales sérotoninergiques expriment VGLUT3 (Schafer, Varoqui et al. 2002; Hioki, Fujiyama et al. 2004; Shutoh, Ina et al. 2008; Varga, Losonczy et al. 2009; Amilhon, Lepicard et al. 2010). Des terminaisons sérotoninergiques issues du raphé se projetant dans les bulbes olfactifs, l'amygdale, l'aire tegmentale ventrale, le plexus supra-épendymaire, ou encore une partie de la moelle épinière expriment également VGLUT3 (Oliveira, Hydling et al. 2003; Shutoh, Ina et al. 2008; Amilhon, Lepicard et al. 2010).

Les noyaux les plus caudaux du raphé (magnus et pallidus) expriment également VGLUT3 dans leurs varicosités. Dans les noyaux du raphé la situation est complexe. En effet on trouve des neurones purement glutamatergiques, purement sérotoninergiques ou mixtes sérotoninergiques et glutamatergiques (5-HT/VGLUT3) (Gras, Herzog et al. 2002; Nakamura, Wu et al. 2004; Nakamura, Hioki et al. 2005). VGLUT3 serait responsable de cette différenciation (Voisin, Mnie-Filali et al. 2016). Il semblerait par ailleurs que cette ségrégation des varicosités 5-HT de l'hippocampe permettent deux types de réponse : une réponse rapide médiée par les récepteurs AMPA des neurones GABAergiques hippocampiques, et une réponse lente médiée par des récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{1A} hippocampiques (Varga, Losonczy et al. 2009). Contrairement au cas de la dopamine, la co-transmission sérotonine/glutamate que VGLUT3 permet dans ces neurones sérotoninergiques du raphé est ici bien établie. Une autre fonction de VGLUT3 a par ailleurs été décrite sans ces neurones sérotoninergiques, que nous détaillerons plus loin : celle de la synergie vésiculaire (cf. paragraphe 3.3.2).

3.3.1.3 NEURONES CHOLINERGIQUES ET VGLUTs

Les ARNm codant pour les VGLUTs sont également retrouvés dans des neurones cholinergiques. Les ARNm codant pour VGLUT1 et VGLUT2 sont par exemple exprimés dans des neurones cholinergiques de la moelle épinière (Herzog, Landry et al. 2004; Kraus, Neuhuber et al. 2004; Nishimaru, Restrepo et al. 2005). Chez la souris et le rat adultes, l'ARNm codant pour VGLUT3 est exprimé dans des neurones cholinergiques du striatum dorsal et ventral (Schafer, Varoqui et al. 2002; Gras, Herzog et al. 2002). La protéine VGLUT3 est retrouvée dans le corps cellulaire, les dendrites proximales et les varicosités cholinergiques (Boulland, Qureshi et al. 2004). L'ARNm codant pour VGLUT3 est également détecté dans le noyau basal de Meynert se projetant sur l'amygdale basolatérale (Nickerson Poulin, Guerci et al. 2006).

In vitro, les neurones cholinergiques septaux sont capables de libérer du glutamate grâce à la présence de VGLUT1 et de VGLUT2 (Huh, Danik et al. 2008). Les données issues d'expériences électrophysiologiques et optogéniques étayent l'hypothèse d'une co-transmission cholinergiques et glutamatergique dans ces neurones septaux-hippocampiques, avec, comme dans le cas des neurones sérotoninergiques du raphé, une réponse courte glutamatergiques et une réponse longue cholinergique (Ren, Qin et al. 2011; (El Mestikawy, Wallen-Mackenzie et al. 2011). La co-transmission

cholinergique et glutamatergique n'a par contre pas encore été prouvée dans les neurones cholinergiques striataux, mais là encore la notion de synergie vésiculaire y a été mise en évidence (cf. paragraphe 3.3.2).

3.3.1.4 NEURONES GABAERGIQUES ET VGLUTs

Enfin, certains interneurones GABAergiques expriment les VGLUTs. C'est le cas par exemple des cellules bipolaires de la rétine pour VGLUT1 (Kao, Lassova et al. 2004), ou encorne des neurones GABAergiques de l'aire tegmentale ventrale (Yamaguchi, Sheen et al. 2007) ou des noyaux périventriculaires antéroventraux hypothalamiques pour VGLUT2 (Ottem, Godwin et al. 2004). VGLUT3 est pour sa part le seul VGLUT exprimé transitoirement au cours du développement par des neurones GABAergiques : les cellules de Purkinje (Gras, Vinatier et al. 2005), les neurones du noyau du corps trapézoïde et leurs synapses immatures, ainsi que l'olive supérieure latérale (Gillespie, Kim et al. 2005). À l'âge adulte VGLUT3 est détecté dans les cellules GABAergiques en panier du cortex cérébral et de l'hippocampe (Herzog, Gilchrist et al. 2004; Somogyi, Baude et al. 2004). On retrouve également du VGLUT3 dans les interneurones GABAergiques du néocortex (Hioki, Fujiyama et al. 2004).

Dans l'hippocampe, l'augmentation de l'expression de VGLUT3 est corrélée à une baisse de l'expression du GABA et une augmentation des récepteurs NMDA. Le glutamate semble être libéré avec le GABA dans la fente synaptique des cellules en panier, pour agir sur les récepteurs NMDA, jouant potentiellement un rôle dans la genèse des rythmes thêta (Stensrud, Sogn et al. 2015). Enfin plus récemment des auteurs ont transfecté VGLUT3 dans des neurones GABAergiques striataux (Zimmermann, Herman et al. 2015). Dans ces conditions, VGLUT3 et VIAAT sont colocalisés et les vésicules striatales libèrent simultanément le glutamate et le GABA (Zimmermann, Herman et al. 2015). Mais il faut noter qu'il s'agit là d'un système totalement artificiel qui n'a pas été décrit *in vivo*.

3.3.2. CO-PHÉNOTYPE GLUTAMATERGIQUE ET SYNERGIE VÉSICULAIRE

La présence de neurones non glutamatergiques exprimant des VGLUTs pose la question du rôle de ces co-expressions de transporteurs vésiculaires. Il est à présent établi que dans certains cas il s'agit d'une co-transmission de glutamate et d'un autre neurotransmetteur, afin de moduler la réponse à un stimulus donné. C'est le cas par exemple du co-phénotype dopaminergique dans la voie mésostriée (Berube-Carriere, Riad et al. 2009), ou encore dans certains neurones sérotoninergiques (Varga, Losonczy et al. 2009) ou les interneurones cholinergiques striataux (Higley, Gittis et al. 2011) ou encore les neurones cholinergique de la voie habenulo-interpédonculaire (Ren, Qin et al. 2011). Cette co-transmission concerne les trois VGLUTs.

Dans les neurones cholinergiques striataux, puis dans les neurones sérotoninergiques du raphé, une autre fonction de VGLUT3 a été mise en évidence : la synergie vésiculaire. Prenons le cas de l'acétylcholine. Cette monoamine est un cation. Son transport vésiculaire dépendra donc essentiellement du gradient de pH (Δ pH). Le transport vésiculaire du glutamate dépend pour sa part essentiellement du gradient électrique ($\Delta \psi$) (Edwards 2007). Le transport du cation acétylcholine se fait en échange de la sortie de deux ions H⁺ de la vésicule. L'accumulation d'ACh dissipe donc rapidement le gradient de pH. En revanche, l'entrée de glutamate cationique dans les vésicules cholinergiques permet une plus grande accumulation de proton. Cette acidification de la vésicule facilite le remplissage vésiculaire en acétylcholine de façon importante (+200%) (Gras, Amilhon et al. 2008). L'existence de cette synergie vésiculaire a par la suite également été démontrée pour les neurones sérotoninergiques du raphé (Amilhon, Lepicard et al. 2010).

Les VGLUTs joueraient également un rôle dans le recyclage et la biogenèse des vésicules synaptiques (Herzog, Nadrigny et al. 2011). Les travaux de Takamori et al . ont mis en évidence la présence de multiple copies de VGLUTs pour une vésicule synaptique (Takamori, Holt et al. 2006). Entre 9 et 14 copies de VGLUTs décorerait chaque vésicule synaptique. Selon certains auteurs, le nombre de VGLUTs présents sur la vésicule présynaptique conditionnerait l'intensité de la réponse post-synaptique en modulant la

quantité de neurotransmetteur libéré (Ishikawa, Sahara et al. 2002; Wojcik, Rhee et al. 2004; Wilson, Kang et al. 2005). Cependant d'autres auteurs avancent qu'une seule molécule de VGLUT serait suffisante pour assurer un remplissage vésiculaire suffisant et la synergie vésiculaire (Wojcik, Rhee et al. 2004; Daniels, Collins et al. 2006; Schenck, Wojcik et al. 2009).

3.3.3. IMPLICATION DES VGLUTS DANS LE SYSTÈME NERVEUX CENTRAL

Les VGLUTs ont été impliqués dans de multiples processus physiologiques et pathologiques du système nerveux central dont nous proposons ici un aperçu non exhaustif.

Au niveau neurologique, la baisse d'expression de VGLUT2 améliore par exemple la survie des motoneurones dans des modèles murin de Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) (Wootz, Enjin et al. 2010). Elle est également à l'origine de douleurs neurogènes dans des modèles animaux, notamment via la réduction de la réponse post-synaptique des neurones thalamiques (Moechars, Weston et al. 2006).

VGLUT1 et VGLUT2 sont par ailleurs surexprimés dans le putamen de patients atteints de la maladie de Parkinson (Kashani, Betancur et al. 2007). Chez des rats hémiparkinsoniens, une modulation biphasique de l'expression de VGLUT1 et VGLUT2 a été décrite (Massie, Schallier et al. 2010). VGLUT3 semble par ailleurs jouer un rôle dans la réponse aux agonistes dopaminergiques et la genèse des dyskinésies induites par ces traitements antiparkinsoniens (Gangarossa, Guzman et al. 2016).

L'expression de VGLUT1 et VGLUT2 est également considérablement diminuée dans le cortex préfrontal de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, et la baisse d'expression de VGLUT1 semble être corrélée au degré de l'atteinte cognitive (Kashani, Lepicard et al. 2008). Les souris SAMP8 présentent également une altération précoce de l'expression des VGLUTs (Cheng, Yang et al. 2011).

Dans les troubles psychiatriques, il existe, dans des études post-mortem, une baisse de l'expression de l'ARNm codant pour VGLUT1 et/ou VGLUT2 dans certaines régions

cérébrales de patients atteints de schizophrénie, de dépression unipolaire et de troubles bipolaires (Uezato, Meador-Woodruff et al. 2009). Des variants rares du gène codant pour VGLUT2 ont également été mis en évidence dans la schizophrénie (Shen, Liao et al. 2010). Dans des modèles murins, la baisse d'expression de VGLUT1 dans le cortex préfrontal entraîne par ailleurs un phénotype évocateur de cette maladie (Granseth, Andersson et al. 2015).

VGLUT3 a également été impliqué dans l'anxiété. Chez la souris, l'inactivation complète de VGLUT3 entraîne un profil comportemental anxieux à l'âge adulte comme chez le souriceaux, profil corrélé à la synergie vésiculaire des terminaisons sérotoninergiques limbiques issues du raphé (Amilhon, Lepicard et al. 2010). Chez ces souris VGLUT3^{-/-}, la perte du tonus sérotoninergique hippocampique portant sur l'anxiété est sans effet sur la dépression ou l'agressivité. L'ablation de VGLUT3 entraîne également un impact positif sur l'activité locomotrice (Gras, Amilhon et al. 2008). Enfin VGLUT3 a été impliqué dans la vulnérabilité à la cocaïne via son effet sur la transmission cholinergique striatale (Sakae, Marti et al. 2015).

3.3.4. IMPLICATION DES VGLUTS DANS L'OREILLE INTERNE

3.3.4.1 CELLULE CILIÉE INTERNE ET VGLUTS

Les CCI sont organisées en une seule rangée située sur le bord interne de l'organe de Corti. Elles assurent la transduction de la vibration sonore mécanique en signal électrique, et la transmission de l'information sonore par la libération de glutamate sur les fibres du nerf auditif (Moser and Beutner 2000). Les neurones ganglionnaires de type I assurent l'innervation afférente des CCI. Ils émettent un seul bouton dendritique connecté à une seule CCI, tandis qu'une seule CCI peut recevoir jusqu'à 30 terminaisons dendritiques (Liberman 1982; Liberman, Dodds et al. 1990). Il existe également une innervation efférente des neurones de type I, via le système olivo-cochléaire efférent latéral, issu du tronc cérébral. Les fibres du système efférent latéral contactent les dendrites des neurones de type I sous le bouton synaptique connecté aux CCI, et semblent participer à la protection de l'excitotoxicité via divers neurotransmetteurs (Acétylcholine, GABA, Dopamine et neuromodulateurs) (Eybalin 1993; Puel 1995; (Ruel, Nouvian et al. 2001; Ruel, Wang et al. 2006).

En regard du bouton dendritique issu des neurones de type I, on trouve dans les CCI une synapse à la morphologie très particulière appelée ruban synaptique (Nouvian, Beutner et al. 2006) (Figure 10). Ce ruban synaptique est entouré de vésicules synaptiques contenant du glutamate, neurotransmetteur unique des CCI.



Figure 10 : Représentation schématique d'une cellule ciliée interne et de sa synapse à ruban située à son pôle basal. L'onde sonore entraîne une déflection des stéréocils situés à son pôle apical. Ceci produit l'ouverture des canaux sensibles à l'étirement et l'entrée massive de potassium dans le cytoplasme des CCI, favorisant l'exocytose des vésicules présynaptiques situées au pôle basal de la CCI. Le glutamate ainsi libéré dans la fente synaptique se lie aux récepteurs AMPA (AMPA-R) post-synaptiques de l'axone du neurone auditif primaire. Les différentes protéines structurelle du ruban synaptique ou interagissant avec ce dernier sont ici indiquées. *Avec l'aimable autorisation de R. Nouvian.*

Les rubans synaptiques concentrent les vésicules présynaptiques à proximité de canaux calciques de type Ca_v1.3, permettant une libération rapide et coordonnée du glutamate (Grant, Yi et al. 2010). Contrairement aux synapses conventionnelles du système

nerveux central, les rubans synaptiques n'expriment pas les protéines de régulation de la machinerie synaptique ou de l'exocytose telles que la synaptophysine ou encore les protéines SNARE (Gil-Loyzaga and Pujol 1988; Nouvian, Neef et al. 2011). On trouve par contre au sein des rubans synaptiques RIBEYE, une protéine issue de l'épissage alternatif du transcrit du gène *CTBP2 (co-repressor C-terminal protein binding protein 2)* (Schmitz, Konigstorfer et al. 2000). RIBEYE semble participer à la formation de l'unité structurale des rubans synaptiques et à l'adressage des canaux calciques Ca_v1.3 à leur proximité (Sheets, Trapani et al. 2011). D'autres protéines telles que Bassoon, Piccolo, l'otoferline ou encore l'harmonine sont localisées dans le ruban synaptique et participent à son architecture, sa stabilité et son fonctionnement (Khimich, Nouvian et al. 2005; Nemzou, Bulankina et al. 2006; Pangrsic, Lasarow et al. 2010; Gregory, Bryan et al. 2011).

Les vésicules synaptiques glutamatergiques concentrées autour du ruban synaptique expriment exclusivement VGLUT3. L'expression de VGLUT3 dans les CCI semble augmenter au cours de la maturation cochléaire, puis diminuer chez les rats âgés (Peng, Wang et al. 2013). Une mutation de ce transporteur vésiculaire du glutamate a été décrite chez des patients souffrant d'une surdité autosomique dominante non syndromique, la surdité DFNA25 (Ruel, Emery et al. 2008). Les souris knock-out pour le gène codant pour VGLUT3 présentent par ailleurs une surdité dès la naissance, en raison d'un défaut de remplissage vésiculaire et de libération du glutamate. La délétion complète de VGLUT3 n'affecte pas la mécano-transduction des CCE. Dans les CCI, elle réduit par contre le nombre de ruban synaptique sans altération morphologique ni fonctionnelle, l'exocytose liée aux canaux $Ca_v 1.3$ restant effective et les neurones de type I étant préservés (Ruel, Emery et al. 2008).

3.3.4.2 NEURONE AUDITIF PRIMAIRE DE TYPE I ET VGLUTS

Le glutamate libéré par les CCI agit sur des récepteurs de type AMPA, exprimés sur les terminaisons dendritiques des neurones auditifs primaires de type I et organisés en anneau face au ruban synaptique (Meyer, Frank et al. 2009). Ils sont impliqués dans l'excitotoxicité provoquées par des traumatismes acoustiques ou des processus

ischémiques à l'origine de surdités transitoires (Puel, Pujol et al. 1994; Ruel, Bobbin et al. 2000). D'autres types de récepteurs post-synaptiques glutamatergiques ont été décrits. On trouve ainsi les sous-unités NR1 et NR2A/B des récepteurs NMDA (Ruel, Emery et al. 2008), ou encore des récepteurs glutamatergiques métabotropiques dont la présence reste controversée (Safieddine and Eybalin 1995; Peng, Li et al. 2004).

Les neurones auditifs primaires de type I sont exclusivement glutamatergiques et expriment VGLUT1 et VGLUT2. L'expression du VGLUT3 dans les neurones du ganglion spiral reste controversée. Certaines études montrent un maintien de son expression dans les neurones auditifs primaires de type I au cours de l'avancée en âge, associé à des marquages ponctiformes spécifiquement dans les neurones auditifs primaires et absents dans les CCI, suggérant une autre fonction encore inconnue de VGLUT3 en sus du transport vésiculaire glutamatergique dans ces neurones (Peng, Li et al. 2004). Par ailleurs l'étude de souris présentant une dégénérescence précoce de l'organe de Corti et modèle de la surdité DFNB6 a mis en évidence une perte des CCI suivie d'une hyperexpression de VGLUT3 dans les neurones auditifs primaires. Cette observation pose la question du rôle de VGLUT3 dans la réponse à la dégénérescence cochléaire pathologique (Lee, Kim et al. 2015).

Points clef Fonctions des VGLUTs

> Il existe une co-expression de :

- la dopamine, le GABA et VGLUT2 dans la voie mésostriée

- la sérotonine et VGLUT3 dans le raphé

- l'acétylcholine et VGLUT1&2 dans la moelle épinière, VGLUT3 dans le striatum

- le GABA et VGLUT1 dans la rétine, VGLUT2 dans l'hypothalamus et l'aire tegmentale ventrale, VGLUT3 dans le cortex, l'hippocampe et le striatum.

> Il existe une co-transmission glutamatergique et :

- dopaminergique dans la voie mésostriée

- sérotoninergique dans le raphé

- GABAergique dans l'hippocampe et le striatum

Cela permet une réponse rapide régulée par des récepteurs métabotropiques, et une réponse lente contrôlée par des récepteurs ionotropiques.

> Il existe une synergie vésiculaire pour améliorer le remplissage vésiculaire :

- sérotoninergique dans le raphé
- cholinergique dans le striatum

De faibles quantités de VGLUT3 suffisent pour assurer un transport vésiculaire.

> Les VGLUTs sont impliqués dans diverses pathologies :

- au niveau du SNC : la SLA, les douleurs neurogènes, la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, la dépression, les troubles bipolaires, la schizophrénie, l'anxiété et l'addiction.

- au niveau périphérique : la surdité DFNA25 du fait de l'expression de VGUT3 dans la cellule ciliée interne.

HYPOTHÈSES DE TRAVAIL

Comme évoqué dans notre introduction, la question de l'adaptabilité est essentielle au cours du développement néonatal et lors de l'avancée en âge. Physiologiquement l'adaptabilité est importante lors du développement néonatal, et se réduit lors du vieillissement. Nous avons également vu que le glutamate jouait un rôle essentiel dans le développement et le processus de vieillissement du système nerveux central, ainsi que dans la physiologie de l'oreille interne. La sérotonine est également un neurotransmetteur clef au cours de la maturation du système respiratoire néonatal. Les VGLUTs sont des entités du système nerveux central jouant un rôle central dans la transmission glutamatergique. Mais VGLUT3 est également capable de fortement moduler la transmission cholinergique ou sérotoninergique. Enfin, VGLUT3 est également exprimé dans les CCI et une mutation a été mise en évidence dans une surdité cliniquement proche de la presbyacousie, la surdité DFNA25 (Ruel, Emery et al. 2008).

Nous nous sommes donc posés la question du rôle de VGLUT3 dans l'adaptabilité.

Il a déjà été établi que VGLUT3 était impliqué dans l'adaptation au stress psychologique chez des souriceaux VGLUT3-/- (Amilhon, Lepicard et al. 2010). Dans cette étude, il est mis en évidence une augmentation des vocalisations ultrasoniques chez des souriceaux VGLUT3-/- âgés de 8 jours en situation de déprivation maternelle. À l'âge adulte ces souris présentent également un phénotype anxieux, confirmant le rôle de VGLUT3 dans la régulation de l'anxiété. Cet effet anxiolytique de VGLUT3 est très probablement à relier à sa présence dans les terminaisons mixtes sérotoninergiques et glutamatergiques du raphé.

Si VGLUT3 est impliqué dans la réponse au stress psychologique, qu'en est-il de la réponse au stress physiologique, qu'il soit néonatal ou lié au vieillissement sensoriel et central ? Afin de répondre à cette question j'ai abordé 4 questions majeures au cours de ma thèse.

1) Pour évaluer le rôle de VGLUT3 dans l'adaptation respiratoire néonatale, nous avons étudié la réponse au stress hypoxique néonatal, à l'hypothermie et à l'hypercapnie de souriceaux VGLUT3^{-/-}.

2) Concernant le processus de vieillissement, nous avons étudié le phénotype auditif de souris exprimant la mutation de VGLUT3 (p.A211V) à l'origine de la surdité DFNA25.

Cette étude permettra de comprendre les mécanismes physiopathologiques à l'origine de la surdité DFNA25 et de mieux comprendre le rôle de VGLUT3 dans l'adaptation au vieillissement auditif.

3) Dans une perspective thérapeutique, nous avons également évalué les effets d'un inhibiteur des VGLUTs sur l'audition en conditions normales.

4) Enfin nous nous sommes penchés sur l'impact de l'environnement enrichi, connu pour améliorer la plasticité synaptique, sur le phénotype émotionnel et mnésique de souris SAMP8, modèles de fragilité gériatrique. Le but à terme de cette dernière étude préliminaire est de corréler les profils comportementaux aux données neuroanatomiques d'expression des VGLUTs afin d'évaluer le rôle de ces derniers dans la plasticité neuronale et donc l'adaptation au vieillissement central.

Nous présentons tout d'abord les résultats concernant l'adaptation respiratoire néonatale, publiés en 2012 dans le *Journal of Physiology*.

Ensuite les résultats accumulés pendant l'étude de l'impact de la mutation VGLUT3p.A221V (responsable de la surdité DFNA25) seront décrits sous forme d'un article en cours de préparation.

Les données de pharmacologie sont pour leur part présentée isolément. Ces données intégreront à terme un article sur la pharmacologie des VGLUTs en cours de préparation.

Enfin des résultats préliminaires d'une étude en cours sur l'impact de l'environnement enrichi sur des souris SAMP8 avançant en âge sont présentés en annexe. Ce travail étant à ce jour en cours de finalisation.

ARTICLE #1

RÔLE DE VGLUT3 DANS L'ADAPTATION AU STRESS HYPOXIQUE NÉONATAL

Introduction

Nous avons détaillé dans notre introduction générale l'importance de la sérotonine dans le développement respiratoire néonatal, ainsi que la fonction de VGLUT3 dans la transmission sérotoninergique et le comportement anxieux (Amilhon, Lepicard et al. 2010). Outre la réponse à un stress psychologique, la sérotonine prend également part à la réponse à un stress physique intense : la réponse à l'hypoxie néonatale. En condition d'hypoxie, le nouveau-né présente d'abord une hyperventilation, suivie d'une décroissance ventilatoire appelée déclin ventilatoire hypoxique (HVD, *Hypoxic Ventilatory Declive*) et d'une baisse de la consommation d'oxygène via une inhibition centrale de la production de chaleur, appelée hypométabolisme hypoxique (Bollen, Bouslama et al. 2009). Le stress hypoxique néonatal met donc en jeu des régulations ventilatoires et thermogéniques. Or la sérotonine joue un rôle central dans le couplage de ces réponses ventilatoires et thermogéniques à l'hypoxie (Alenina, Kikic et al. 2009 ; Hodges, Best et al. 2011; Osaka 2011). Le générateur du rythme respiratoire (RRG) (Thoby-Brisson, Karlen et al. 2009) constitue une clef de voûte dans la réponse à l'hypoxie néonatale. Il est composé de deux réseaux : le complexe pre-Bötzinger (pBt) (Smith, Ellenberger et al. 1991) et l'entité noyau rétrotrapezoïde/groupe parafacial respiratoire (RTN/pFRG) (Onimaru and Homma 2003). Le fonctionnement du RRG est encore peu clair. De façon simplifiée, le pBt est essentiel dans la genèse du rythme respiratoire et dans l'adaptation aux variations du taux d'oxygène, tandis que le RTN/pFRG constitue un centre de modulation des informations issues des chémorécepteurs. Ces deux réseaux contiennent tous deux des neurones glutamatergiques et sont modulés par des afférences sérotoninergiques issues du raphé. Par ailleurs, VGLUT3 est exprimé dans les neurones sérotoninergiques du raphé se projetant sur le RTN/pFRG (Rosin, Chang et al. 2006) et innervant les organes thermogéniques néonataux tels que la graisse brune (Schafer, Varoqui et al. 2002; Nakamura, Hioki et al. 2005; Morrison, Nakamura et al. 2008).

L'ensemble de ces données nous a donc amené à nous poser la question d'un éventuel rôle de VGLUT3 dans la réponse au stress hypoxique néonatal. Pour évaluer le rôle de VGLUT3 dans l'adaptation respiratoire néonatale nous avons utilisé la lignée de souris VGLUT3^{-/-} en combinant des approches anatomiques, biochimiques, électrophysiologiques et physiologiques.

The vesicular glutamate transporter VGLUT3 contributes to protection against neonatal hypoxic stress

Stéphanie Miot^{1,2,3,4}, Nicolas Voituron^{7,8}, Adélaïde Sterlin^{1,2,3,4,5}, Erika Vigneault⁶, Lydie Morel^{1,2,3}, Boris Matrot^{4,5}, Nelina Ramanantsoa^{4,5}, Bénédicte Amilhon^{1,2,3,4}, Odile Poirel^{1,2,3}, Ève Lepicard^{1,2,3}, Salah El Mestikawy^{1,2,3,6}, Gérard Hilaire⁷ and Jorge Gallego^{4,5}

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U952, 75005 Paris, France

²*Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR 7224, 75005 Paris, France*

³Université Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France

⁴INSERM, U676, Hôpital Robert Debré, 75019 Paris, France

⁵ Université Denis Diderot, 75005 Paris, France

⁶Douglas Hospital Research Center, Department of Psychiatry, McGill University, QC, Canada

⁷ Team mp3-respiration, CNRS, Université de la Méditerranée, Université Paul Cézanne, CRN2M UMR 6231, 13397 Marseille, France

⁸Laboratoire Réponses cellulaires et fonctionnelles à l'hypoxie, UFR Santé-Médecine, Université Paris 13, 93017 Bobigny, France

Key points

- Hypoxic stress is an important cause of morbidity and mortality in neonates.
- We examined the role of VGLUT3, an atypical transporter of glutamate present in serotonergic neurons involved in breathing and heat production, in the response to hypoxia.
- The respiratory responses to chemical stimuli and the turnover of serotonin in the brainstem were impaired in newborn mice lacking VGLUT3.
- Under cold conditions, metabolic rate, body temperature, baseline breathing and the ventilatory response to hypoxia were disrupted.
- Thus, VGLUT3 expression is required for optimal response to hypoxic stress in neonates.

Abstract Neonates respond to hypoxia initially by increasing ventilation, and then by markedly decreasing both ventilation (hypoxic ventilatory decline) and oxygen consumption (hypoxic hypometabolism). This latter process, which vanishes with age, reflects a tight coupling between ventilatory and thermogenic responses to hypoxia. The neurological substrate of hypoxic hypometabolism is unclear, but it is known to be centrally mediated, with a strong involvement of the 5-hydroxytryptamine (5-HT, serotonin) system. To clarify this issue, we investigated the possible role of VGLUT3, the third subtype of vesicular glutamate transporter. VGLUT3 contributes to glutamate signalling by 5-HT neurons, facilitates 5-HT transmission and is expressed in strategic regions for respiratory and thermogenic control. We therefore assumed that VGLUT3 might significantly contribute to the response to hypoxia. To test this possibility, we analysed this response in newborn mice lacking VGLUT3 using anatomical, biochemical, electrophysiological and integrative physiology approaches. We found that the lack of VGLUT3 did not affect the histological organization of brainstem respiratory networks or respiratory activity under basal conditions. However, it impaired respiratory responses to 5-HT and anoxia, showing a marked alteration of central respiratory control. These impairments were associated with altered 5-HT turnover at the brainstem level. Furthermore, under cold conditions, the lack of VGLUT3 disrupted the metabolic rate, body temperature, baseline breathing and the ventilatory response

S. Miot and N. Voituron contributed equally to this work. S. El Mestikawy, G. Hilaire and J. Gallego contributed equally to this work.

to hypoxia. We conclude that VGLUT3 expression is dispensable under basal conditions but is required for optimal response to hypoxic stress in neonates.

(Received 17 February 2012; accepted after revision 6 August 2012; first published online 13 August 2012) **Corresponding author** J. Gallego: INSERM, U676, Hôpital Robert Debré, 75019 Paris, France. Email: jorge.gallego@inserm.fr

Abbreviations AI, apnoea index; AU, arbitrary unit; pFRG, parafacial respiratory group; 5-HIAA, 5-hydroxyindoleacetic acid; HVD, hypoxic ventilatory decline; IS, irregularity score; L-Trp, L-tryptophan; MAOA, monoamine oxidase A; PB, phrenic burst; RMg, raphe magnus; ROb, raphe obscurus; RPa, raphe pallidus; RPn, raphe pontis; RRG, respiratory rhythm generator; RTN, retrotrapezoid nucleus; VGLUT3, vesicular glutamate transporter type 3.

Introduction

Maintaining oxygen homeostasis through independent breathing is a critical ability throughout extrauterine life. Hypoxic stress, whether due to increased oxygen demands as in the cold, or to reduced oxygen delivery to tissues as in asphyxia, is a common cause of morbidity and mortality in neonates (Perrone et al. 2002). Neonates respond to hypoxia initially by increasing ventilation, and then by markedly decreasing ventilation (hypoxic ventilatory decline, HVD) and oxygen consumption (hypoxic hypometabolism), mainly through a centrally mediated inhibition of heat production (Saiki et al. 1994; Merazzi & Mortola, 1999; Bollen et al. 2009). This centrally mediated process is prominent in neonates but gradually vanishes with age (Massaro et al. 1995; Gautier, 1996; Mortola, 2004; Kamae et al. 2011). The neuronal substrate of hypoxic hypometabolism is unclear, but recent results support a strong involvement of the serotonin (5-hydroxytryptamine or 5-HT) system in the coupling of ventilatory and thermogenic responses to hypoxia (Alenina et al. 2009; Hodges et al. 2011; Osaka, 2011).

In this study, we examined the possible role of VGLUT3, the third subtype of vesicular glutamate transporter, in the ventilatory and thermoregulatory responses to neonatal hypoxic stress. Our interest in VGLUT3 originated in the intriguing observation that, contrary to VGLUT1 and VGLUT2, which are expressed by genuine glutamatergic neurons (Fremeau et al. 2004), VGLUT3 is present mostly in modulatory neurons (El Mestikawy et al. 2011). This is the case of cholinergic interneurons from the striatum, some GABAergic neurons from the cortex and the hippocampus, and most importantly with regards to oxygen homeostasis, in 5-HT neurons (El Mestikawy et al. 2011). In serotonergic neurons, VGLUT3 stimulates 5-HT transmission and provides the means to signal with glutamate (Amilhon et al. 2010; Varga et al. 2009). We anticipated that VGLUT3 may be important for the newborn's ability to generate the appropriate respiratory responses to hypoxic stress for two reasons. First, the two networks that compose the respiratory rhythm generator (RRG, Thoby-Brisson et al. 2009), the pre-Bötzinger complex (Smith et al. 1991) and the retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory group (RTN/pFRG Onimaru & Homma, 2003), contain glutamatergic neurons and are both strongly modulated by 5-HT afferents. The RTN/pFRG, which is pivotal to central chemoreception (Guyenet *et al.* 2008), is densely innervated by VGLUT3 terminals from the raphe nuclei (Rosin *et al.* 2006). Second, thermoregulatory circuits contain VGLUT3 expressing cells (Morrison *et al.* 2008; Nakamura *et al.* 2005*a*; Schafer *et al.* 2002). In particular, VGLUT3 expressing cells in the raphe innervate the main neonatal thermogenic organ, the interscapular brown adipose tissue (Schafer *et al.* 2002; Nakamura *et al.* 2005*a*; Morrison *et al.* 2008).

To address the role of VGLUT3 in the response to hypoxic stress in neonates, we analysed mice lacking VGLUT3 $(Vglut3^{-/-})$ using anatomical, biochemical, electrophysiological and integrative physiology approaches. Previous studies in $Vglut3^{-/-}$ mice showed that VGLUT3 is a resistance factor against psychological stress as early as infancy, but its possible role against physiological stress has never been investigated (Amilhon et al. 2010). We found that while the lack of VGLUT3 did not affect the histological organization of brainstem respiratory networks or respiratory activity in normal conditions, it disrupted respiratory and thermogenic responses to cold and hypoxia, and in particular, HVD and hypoxic hypometabolism. These results indicate that VGLUT3 expression is required for optimal response to hypoxic stress in neonates.

Methods

Ethical approval

Experimental protocols were approved by local committees, in accordance with the European Communities Council Directive of September 22, 2010 (2010/63/EU) for animal care, and were conducted in accordance with Canadian and French laws for animal care. The experiments also complied with the policies and regulations outlined by *The Journal of Physiology* (Drummond, 2009). All efforts were made

to minimize animal suffering, especially by using fully non-invasive functional tests. Newborn mice used in *in vivo* experiments were killed by decapitation upon completion of physiological tests.

Animals

All experiments were performed in newborn (n = 474) wild-type, heterozygous and homozygous littermates obtained from crossing heterozygous $Vglut3^{+/-}$ mice (129/Sv × C57/BL6). $Vglut3^{+/-}$ parents (Gras *et al.* 2008) were housed at 24°C with a 12 h light–dark cycle and fed *ad libitum*.

Immunofluorescence

Six-day-old mice were anaesthetized deeply by an intraperitoneal injection of 1% sodium pentobarbital (60 mg $(kg body weight)^{-1})$, and perfused transcardially with 150 ml warm 0.9% saline followed by 500 ml ice-cold 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). The brains were dissected, conserving the pons, post-fixed by immersion in the same fixative, cryoprotected in phosphate-buffered saline (PBS) containing 10% sucrose and frozen in isopentane at -30° C. Ten-micrometre coronal sections were made with a cryostat at -20° C and thaw-mounted onto glass slides. Sections were hydrated with PBS and immersed in EDTA (10 mM). They were then washed with PBS containing gelatin $(2 g l^{-1})$ and 0.25% Triton X-100 (buffer B) and incubated with buffer B supplemented with VGLUT3 guinea pig polyclonal antiserum (1/10000; Gras et al. 2008), PHOX2B rat monoclonal antiserum (1/800; kindly provided by Dr Christo Goridis, Ecole Normale Supérieure, Paris), 5-HT mouse monoclonal antiserum (1/50; Chemicon), VMAT2 rabbit monoclonal antiserum (1/5000; Chemicon) and NK1R rabbit monoclonal antiserum (1/5000; Sigma-Aldrich). VGLUT3, PHOX2B and 5-HT primary antibodies were detected with anti-guinea pig, anti-rat or anti-mouse IgG coupled to Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 544 and Alexa Fluor 544 (1/2000; Molecular Probes, USA), respectively. VMAT2 and NK1R primary antibodies were detected using anti-rabbit IgG coupled to Alexa Fluor 544 (1/2000; Molecular Probes, USA). Sections were observed under a conventional fluorescence microscope (Zeiss, Germany) at $10 \times$ and $40 \times$ magnification. The Vglut3^{-/-} mice is a constitutive knockout obtained by targeting exon 2 of the *Vglut3* gene. This strategy results in a loss of this coding exon and a one base frame shift. Consequently, there is a complete loss of both mRNA and protein (Gras *et al.* 2008).

Electrophysiology

Two- to three-day-old mice were chilled over crushed ice for several minutes until they were immobile and

failed to respond to a tail pinch (Phifer & Terry, 1986). The brainstem and the first segment of cervical spinal cord were isolated and placed ventral side upward in a recording chamber (volume: 2 ml) as described (Suzue, 1984; Voituron et al. 2010). This en bloc preparation is devoid of peripheral chemoreceptors including the carotid bodies, O₂ sensitive cells in the hypothalamus and peripheral thermoreceptors. Under basal conditions, the preparation was superfused at a rate of 4 ml min⁻¹ at 27°C with artificial cerebrospinal fluid (aCSF; in mM: 129.0 NaCl, 3.35 KCl, 1.26 CaCl₂, 1.15 MgCl₂, 21.0 NaHCO₃, 0.58 NaH₂PO₄ and 30.00 glucose) saturated with O₂ and adjusted to pH 7.4 by bubbling with carbogen (95% O₂ and 5% CO₂). Recordings were performed as described (Voituron et al. 2010). Briefly, the electrical activity of a C4 ventral root was recorded using a suction electrode, filtered (100–3000 Hz), amplified (×5000), integrated (time constant 100 ms) and digitized through a Spike2 data analysis system (CED, Cambridge, UK; 5 kHz sampling frequency). Phrenic burst (PB) frequency (expressed in Hz) was defined as the frequency of spontaneous rhythmic C4 bursts. Integrated C4 activities were used to measure the duration of PBs (expressed in seconds) and the irregularity score (IS) of the PB cycle period. The IS was used to assess the variability of the respiratory cycle and was obtained by applying the formula: $100 \times ABS$ $(P_n - P_{n-1})/P_{n-1}$, with P being the period of the nth respiratory cycle (Viemari et al. 2005). After dissection, the preparations were superfused for at least 30 min with normal aCSF. The phrenic responses to 5-HT, acidosis and anoxia were examined on different preparations. To examine the PB response to 5-HT, normal aCSF was replaced with aCSF containing 5-HT (25 μ M) for 5 min. The PB response to acidosis was examined by replacing normal aCSF (pH 7.4) with modified aCSF containing a reduced level of NaHCO₃ (10.0 mM instead of 21 mM, pH 7.1; acidosis) (Voituron et al. 2010). The PB response to anoxia was examined by replacing normal aCSF by aCSF bubbled with 95% $N_{\rm 2}$ and 5% $CO_{\rm 2}$ for 5 min (anoxia). When subjecting preparations to modified aCSF, test-induced changes in PB frequency in a given preparation were expressed as a percentage of baseline levels determined during the 5 min period preceding the test.

Plethysmography

Breathing variables were measured noninvasively using a battery of four whole-body flow barometric plethysmographs, allowing the simultaneous measurement of breathing variables as previously described (Bollen *et al.* 2009). Each plethysmograph was composed of two 50 ml Plexiglas chambers, immersed in a thermoregulated water bath to maintain their temperature at given levels (26° C or 33° C). A 200 ml min⁻¹ flow of dry air (Brooks airflow stabilizer, Urlo, Holland) was divided into two 100 ml min⁻¹ flows through the chambers. The differential pressure between the chambers (GE Sensing transducer, Asnières, France, range: ± 0.1 mbar) was converted into a digital signal at a sampling rate of 100 Hz, and processed (Labview, National Instruments, Austin, TX, USA).

The apparatus was calibrated before each session using a built-in pump incorporating a micro-syringe (Ito corporation, Fuji, Japan), which injected a sinusoidal airflow with a maximal amplitude of $2 \mu l$ and a frequency of 6 Hz into the animal chamber (Ramanantsoa et al. 2006). We measured respiratory frequency ($R_{\rm f}$, Hz), tidal volume $(V_{\rm T}, \mu l g^{-1})$, minute ventilation $(\dot{V}_{\rm E}, \mu l s^{-1} g^{-1})$, and the number of apnoeas, defined as respiratory pauses longer than twice the preceding breath (Simakajornboon et al. 2004). The limitations of the plethysmographic method in newborn mice have been discussed elsewhere (Lofaso et al. 2007; Mortola & Frappell, 1998). Briefly, the absolute values of $V_{\rm T}$ and $\dot{V}_{\rm E}$ derived from the Drorbaugh and Fenn equation (Drorbaugh & Fenn, 1955; Epstein & Epstein, 1978) are purely indicative, whereas $R_{\rm f}$ and apnoea duration, as well as the relative change from baseline of $V_{\rm T}$, $R_{\rm f}$ and $\dot{V}_{\rm E}$, are reliable measurements. O₂ consumption (\dot{V}_{O_2}) was measured in six-day-old pups in cold condition as previously described (Bollen et al. 2009). Baseline levels of breathing variables were calculated over the 3 min of air breathing prior to exposure to hypoxia $(10\% O_2).$

Biochemical analysis of the brainstem serotonergic system

The medulla was quickly removed after decapitation on postnatal day 2 and kept at -80° C until analysis (Viemari *et al.* 2005). The medullary content of 5-HT, its precursor L-tryptophan (L-Trp) and its main metabolite from the monoamine oxidase A (MAOA) degradation pathway, 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), were measured with high pressure liquid chromatography (HPLC) and electrochemical detection (Waters System: pump P510, electrochemical detector EC2465; Atlantis column DC18; mobile phase: citric acid, 50 mM; orthophosphoric acid, 50 mM; sodium octane sulfonic acid, 0.112 mM; EDTA, 0.06 mM; methanol, 5%; NaCl, 2 mM; pH 2.95). Contents were expressed in nanograms per gram of medulla.

Statistics

Lack of VGLUT3 was expected to impair 5-HT metabolism, respiratory control *in vitro* and physiological responses to hypoxic stress *in vivo*. We used Student's unpaired two-tailed *t* test for genotype group comparisons (mutant *versus* controls). Respiratory variables and \dot{V}_{O_2}

were firstly analysed in baseline conditions and in response to chemical stimuli using analyses of variance and Student's unpaired two-tailed t test. Litter had no significant effect, either as a main between factor or in interaction with genotype, and will not be mentioned further. All quantification was performed by investigators blind to the genotype, which was determined after all tests were completed. Statistical analyses were conducted using Statview 5 (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA).

Results

As data from *Vglut3*^{+/+} and *Vglut3*^{+/-} newborn mice were indistinguishable regardless of the variable considered, these two groups were pooled and thereafter designated as control pups.

Lack of VGLUT3 does not alter the histological organization and function of respiratory areas under basal conditions

We first compared coronal sections of the medulla of $Vglut3^{-/-}$ and control pups. No differences were seen in the organization of the characteristic NK1R signal of the pre-Bötzinger complex (Fig. 1*A* and *B*), or the medial bundle of NK1R-expressing fibres or the raphe pallidus (RPa), raphe magnus (RMg) and raphe obscurus (ROb) areas (Fig. 1*A* and *B*). Finally, we observed very ventral PHOX2B-expressing neurons in the RTN/pFRG area of control and $Vglut3^{-/-}$ pups, without any noticeable difference between these groups (Fig. 1*A* and *B*).

We next examined whether the lack of VGLUT3 affected neonatal RRG function. We compared the activity produced by isolated RRGs from $Vglut3^{-/-}$ and control pups. Under basal conditions, phrenic bursts (PBs) had similar shapes, amplitudes, frequencies and irregularity scores in $Vglut3^{-/-}$ and control preparations (Fig. 1*C* and *D*, and Table 1 for statistical analyses).

As these *in vitro* results were obtained using completely deafferented medullary RRGs, we decided to examine breathing variables in intact, unrestrained pups using plethysmography under thermoneutral conditions $(33^{\circ}C, Fig. 1F)$. Statistical comparisons between $Vglut3^{-/-}$ and control pups are summarized in Table 2. $Vglut3^{-/-}$ and control pups had similar weights (Fig. 1G), temperatures (Fig. 1H) and breathing patterns under normoxia, regardless of the breathing variable considered (Fig. 1*I*–*L*).

Lack of VGLUT3 affects the 5-HT modulation of respiratory activity and 5-HT metabolism

VGLUT3 is expressed in 5-HT neurons from the dorsal and medial raphe (Amilhon *et al.* 2010). Because raphe



Figure 1. Lack of *Vglut3* does not alter the histological organization and function of respiration-related areas under basal conditions

See Supplemental Fig. 1 for schematic representation of the brainstem sections. A and B, immunolabelling showing that NK1R (red) in the pre-Bötzinger complex (Aa and Ba) and at the midline raphe level (Ab and Bb) and Phox2B (red) at the RTN/pFRG level (Ac and Bc) have similar expression patterns in control and $Vglut3^{-/-}$ pups. Anatomical limits of the facial nucleus have been superimposed on Ac and Bc section (dotted line, Lazarenko et al. 2009). C, examples of phrenic bursts (PBs) recorded from the C4 root of *in vitro* brainstem preparations from control (a) and $Vglut3^{-/-}$ (b) pups. Int C4: integrated C4 activity. D and E, neither phrenic burst frequency (PBf) (D) nor the irregularity score (E) was significantly affected by the Vglut3 mutation under basal conditions (control (a) and $vglut3^{-/-}$ n = 22). F, examples of recordings of respiratory variables using plethysmography in one control (a) and one $Vglut3^{-/-}$ (b) newborn mouse. G and H, $Vglut3^{-/-}$ pups (n = 53) had normal weights (G) and body

Table 1. RRG responses to chemical stimuli

	Control	Vglut3 ^{-/-}
Baseline	<i>n</i> = 64	n = 22
PB frequency (cycles min ⁻¹)	11.6 ± 0.6	10.7 ± 1.0
PB duration (s)	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1
PB irregularity score (AU)	41.1 ± 6.8	49.2 ± 9.3
Response to 5-HT	<i>n</i> = 14	<i>n</i> = 11
PB frequency (%) at 1 min	130.9 \pm 9.3 ^{††}	$118.5\pm8.0^{\dagger,*}$
Response to acidosis	<i>n</i> = 12	n = 4
PB frequency (%) at 5 min	132 \pm 4 ^{†††}	$153\pm13^{\dagger\dagger},*$
Response to anoxia	<i>n</i> = 18	n = 8
PB frequency (%)		
at 1 min	$87.2\pm6.3^{\dagger\dagger\dagger}$	$94.7~\pm~5.7$
at 5 min	$57.8\pm5.5^{\dagger\dagger\dagger\dagger}$	$97.4~\pm~14.5^{***}$

PB: Phrenic burst; %: percentage of pre-stimulus value; AU: arbitrary units. *,**,***: significant difference between $Vglut3^{-/-}$ and control groups (P < 0.05, P < 0.01 and P < 0.001, respectively, Student's unpaired t test.). †,††,††††: significant difference between post-stimulus and pre-stimulus levels (P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001 and P < 0.0001, respectively, Student's paired t test). Values are means \pm SEM.

neurons have a profound influence on respiratory activity (Hilaire et al. 2010; Hodges & Richerson, 2010a), we examined the distribution of VGLUT3 in the rostral raphe nuclei, especially those involved in the control of breathing. We performed double immunolabelling for VGLUT3 and vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2, Fig. 2A) on the one hand and for VGLUT3 and 5-HT on the other (Fig. 2B and C). As shown previously in adult mice (Amilhon et al. 2010), VGLUT3 colocalized poorly with VMAT2-positive somata and terminals in the dorsal raphe (DR), raphe pontis (RPn), RMg and RPa (Fig. 2A). Double-labelling for VGLUT3 and 5-HT confirmed the presence of VGLUT3-expressing neurons within the ROb and RMg (Fig. 2C). The colocalization of VGLUT3 and 5-HT signals in the somata of cells was observed in the ROb (Fig. 2B) and the RMg (Fig. 2C). No VGLUT3-expressing neurons were observed either in the pre-Bötzinger complex or in the RTN/pFRG areas of control pups, identified using anatomical landmarks and NK1R and PHOX2b expression (Rosin et al. 2006).

VGLUT3 and glutamate have been found to modify 5-HT vesicular filling by a mechanism named vesicular synergy (Amilhon et al. 2010). Thus, the lack of VGLUT3 may alter tissue concentrations of 5-HT and its metabolites in the brainstem. To address this issue, we measured endogenous levels of 5-HT, its precursor L-tryptophan (L-Trp) and its main metabolite 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) using HPLC separation and electrochemical detection (Fig. 2D). The inverse (although non-significant) differences in 5-HT and 5-HIAA content between Vglut3-/- and control brainstems led to a significantly higher 5-HT/5-HIAA ratio in Vglut3^{-/-} than in control brainstems (\sim 19%, see Fig. 2D for statistical analyses). This difference revealed an alteration in 5-HT turnover in *Vglut3^{-/-}* pups, as previously reported in the hippocampus of adult Vglut3^{-/-} mice (Amilhon et al. 2010).

Since alterations in 5-HT metabolism during development modify the formation of brain circuits (Deneris & Wyler, 2012), including the respiratory networks (Hilaire et al. 2010), we next examined whether the abnormal 5-HT/5-HIAA ratio in the brainstem of Vglut3^{-/-} mice was associated with abnormal 5-HT modulation of respiratory activity. To this end, we applied exogenous 5-HT to the artificial cerebrospinal fluid (aCSF) of $Vglut3^{-/-}$ and control preparations for 5 min. Biphasic responses were observed in both preparations, but with quantitative differences (Fig. 2E, and Table 1 for statistical analyses). The initial component of this response corresponds to the medullary response and the late component to a spinal response with a tonic discharge of phrenic motoneurons (Bou-Flores et al. 2000). Although response latencies were not significantly different between groups, the response was shorter lived and of smaller amplitude in $Vglut3^{-/-}$ than in control preparations (see Fig. 2F for statistical analyses).

Lack of VGLUT3 disrupts respiratory control

We tested whether the lack of VGLUT3 affected the RRG responses to acidosis and anoxia, both of which are strongly modulated by 5-HT (Caubit *et al.* 2010). We measured the PB frequency response to central acidosis by replacing normal aCSF with acidified aCSF for 5 min (Fig 3*A*). This stimulus markedly stimulates PB frequency in normal preparations (Voituron *et al.* 2010). Acidosis increased PB frequency in both *Vglut3^{-/-}* and control preparations (Fig. 3*A*). However, PB frequency reached

temperatures (*H*) compared to control pups (n = 164). *I–L*, breathing patterns were not affected by the *Vglut3* mutation under thermoneutral conditions, whatever the breathing variable considered: mean respiratory frequency (R_f) (*I*), tidal volume (V_T) (*J*), ventilation (\dot{V}_E) (*K*), or number of apnoeas per 30 s period (*L*). ns: non significant (P > 0.05); Student's unpaired *t* test. Values shown are means ± SEM. See Tables 1 and 2 for full statistical analyses.

	Thermoneutrality (33°C)		Cold (26°C)	
	Control	Vglut3 ^{-/-}	Control	Vglut3 ^{-/-}
	<i>n</i> = 164	n = 53	<i>n</i> = 200	n = 63
Weight (g)	$4.6~\pm~0.9$	4.5 ± 0.9	3.6 ± 0.8	3.4 ± 0.8
T (°C)	34.8 ± 0.1	34.4 ± 0.2	$34.3~\pm~1.1$	34.1 ± 0.1
∆ <i>T</i> (°C)	$0.5\ \pm\ 0.1$	0.8 ± 0.2	$-4.5~\pm~0.1$	$-5.2~\pm~0.1^{***}$
$\dot{V}_{\sf E}$ (μ l g $^{-1}$ s $^{-1}$)	$16.0\ \pm\ 0.2$	16.3 ± 0.4	18.1 ± 0.6	$11.5 \pm 0.6^{***}$
R _f (Hz)	$3.23\ \pm\ 0.54$	3.22 ± 0.57	2.83 ± 0.93	$2.19\pm0.61^{***}$
V _Τ (μl g ⁻¹)	$5.52~\pm~1.14$	5.55 ± 1.11	$\textbf{6.27}\pm\textbf{2.02}$	5.18 \pm 1.92***
Al (apnoea min ⁻¹)	$0.42~\pm~1.2$	$0.42~\pm~1.14$	$1.22~\pm~2.84$	$3.68\pm3.78^{***}$
			n = 29	<i>n</i> = 7
\dot{V}_{O_2} (ml min ⁻¹ g ⁻¹)	—	—	0.084 ± 0.02	$0.069\pm0.02^{***}$

Table 2. Baseline breathing variables under thermoneutral (33°C) and cold conditions (26°C) in normoxia

T (°C): body temperature before plethysmographic recordings (and before cold exposure in cold experiments); ΔT (°C): variation in body temperature after plethysmographic recordings (duration: 30 min). \dot{V}_{E} : ventilation; R_{f} : breathing frequency; V_{T} : tidal volume. Al: apnoea index, number of apnoeas per minute; $\dot{V}_{O_{2}}$: oxygen consumption. **.***: significant difference between $Vglut3^{-/-}$ and control pups (P < 0.01 and P < 0.001 respectively, Student's unpaired *t* test). Values are means \pm SEM.

higher values in $Vglut3^{-/-}$ than in control preparations (Fig. 3*A*, and Table 1 for statistical analyses).

We then measured the RRG response to central anoxia by replacing normal aCSF with anoxic aCSF for 5 min (Fig. 3B). As expected (Hilaire et al. 2010), in control preparations, PB frequency was depressed throughout the 5 min of exposure to anoxia, and recovered slowly over 10-15 min after the resumption of normal aCSF (Fig. 3Bb). In contrast, in $Vglut3^{-/-}$ preparations, the anoxia-induced decrease in PB frequency was short lived, and PB frequency returned to control levels after 2-3 min despite the maintenance of central anoxia (Fig. 3Bc, and Table 1 for statistical analyses). However, resumption of normal aCSF produced an immediate decrease in frequency, which was greatly similar to that of control preparations. Taken together, these results suggest that the mechanisms controlling the depression of PB frequencies during anoxia and post-anoxia may be different, as previously proposed for HVD and post-HVD in vivo (Renolleau et al. 2001), and that only the depression of PB frequency during anoxia was affected by the lack of VGLUT3.

Next, we examined the breathing pattern of 6-day-old pups in air or hypoxia, in cold condition (Fig. 3*C*). Cold condition increases thermogenesis and oxygen demand, which, combined with hypoxia, result in strong hypoxic stress. Under normoxia, the ventilation (\dot{V}_E) of *Vglut3^{-/-}* pups was significantly lower (about 37%) than in controls, mostly due to their decreased respiratory frequency, R_f (Fig. 3*D*, and Table 2 for statistical analyses). Hypoxia elicited a biphasic ventilatory response in both groups with an initial \dot{V}_E increase reflecting the RRG response to carotid body chemoreceptor activation by peripheral hypoxia, and a subsequent HVD reflecting the RRG response to central hypoxia (Fig. 3D). The increase in $\dot{V}_{\rm E}$ during the augmentation phase of the hypoxic response resulted from a combination of the rise in $V_{\rm T}$ and in $R_{\rm f}$, as commonly reported (Bissonnette, 2000), although an R_f-based increase under similar conditions has also been reported (Bollen et al. 2009). Because of the delay in the wash-out of the hypoxic mixture (about 90 s), maximal ventilatory depression was reached after the switch to normoxia (Fig. 3Da-c). The depressive phase of $\dot{V}_{\rm E}$ resulted from a decrease in $V_{\rm T}$ and $R_{\rm f}$, as previously reported (Bissonnette, 2000; Bollen et al. 2009). When expressed as the percentage change relative to average pre-hypoxic baseline values, the initial $\dot{V}_{\rm E}$ increase in response to hypoxia was not significantly different between groups, although the $R_{\rm f}$ increase in response to hypoxia was significantly higher in $Vglut3^{-/-}$ than in control pups (Fig. 3E). However, HVD, expressed as the percentage decrease from pre-hypoxic levels, was significantly attenuated in Vglut3^{-/-} pups as compared to controls (Fig. 3E). Thus, both in vivo and in vitro data consistently showed that the lack of VGLUT3 altered the inhibitory effect of hypoxia on respiratory activity.

Lack of VGLUT3 disrupts the thermogenic response to cold

The cold induced a greater decrease in body temperature in $Vglut3^{-/-}$ than in control pups (see statistics in Table 2). We assessed thermogenesis by measuring O₂ consumption



 ${\ensuremath{\mathbb C}}$ 2012 The Authors. The Journal of Physiology ${\ensuremath{\mathbb C}}$ 2012 The Physiological Society

 (\dot{V}_{O_2}) as a function of body weight during cold exposure. Both groups increased their \dot{V}_{O_2} in an attempt to generate heat and maintain body temperature until a plateau was reached (Fig. 3Dd). However, $Vglut3^{-/-}$ pups exhibited a much slower rate of increase during the first 12-13 min of normoxia (Fig. 3Dd). Furthermore, the plateau level of \dot{V}_{O_2} (steady state) was significantly lower in $Vglut3^{-/-}$ pups as compared to controls (Fig. 3Dd; see statistics in Table 2), revealing a weaker thermogenic response to cold. The difference in \dot{V}_{O_2} between groups was small compared to the difference in $\dot{V}_{\rm E}$ (18% vs. 36%, respectively), indicating that blunted thermogenesis in Vglut3-/- pups did not fully account for their lower $\dot{V}_{\rm E}$ levels. Thus, the lack of VGLUT3 altered both the time constant and the steady state of the thermogenic response to cold, suggesting that the activation of brown adipose tissue was diminished in $Vglut3^{-/-}$ compared to control pups.

In both groups, hypoxia sharply depressed \dot{V}_{O_2} (hypometabolic response to hypoxia, Fig. 3*Dd*), a centrally mediated defensive response to hypoxia in newborns (Mortola, 2004) that reflects the inhibition of thermogenesis (Mortola & Gautier, 1995). The \dot{V}_{O_2} decrease relative to pre-hypoxic levels was smaller in *Vglut3^{-/-}* than in control pups (see statistics in Fig. 3*Ed*), indicating a blunted hypometabolic response to hypoxia. Furthermore, unlike controls, *Vglut3^{-/-}* pups failed to restore \dot{V}_{O_2} to pre-hypoxic levels upon the return to normoxia (Fig. 3*Dd*). Thus, *Vglut3^{-/-}* pups displayed a decreased ability to increase \dot{V}_{O_2} and produce heat in response to cold, as well as a decreased ability to depress \dot{V}_{O_2} in response to hypoxia.

Discussion

Whereas the lack of VGLUT3 did not significantly alter respiratory activity under basal conditions, it did so in response to chemical stimuli *in vitro*, revealing a dysfunction of the metabolic control of breathing. Furthermore, *in vivo*, the lack of VGLUT3 impaired respiratory and thermogenic responses to cold and hypoxia, and in particular, two main components of the defensive strategy to hypoxic stress: HVD and hypometabolism.

The histological analysis of brainstem respiration-related areas did not reveal any significant differences between $Vglut3^{-/-}$ and control mice, in line with functional results *in vitro* and *in vivo* under basal conditions. However, we cannot disregard the possibility that the lack of VGLUT3 led to subtle differences in the structure or the number of neurons in some populations under scrutiny.

Brainstem-spinal cord preparations produce periodic activity that corresponds to the respiratory rhythm generated in the brainstem of intact animals, although at a much lower rate (Suzue, 1984). This preparation is commonly regarded as a valuable tool for the analysis of central mechanisms of respiratory control (Johnson et al. 2012). However, these preparations present specific characteristics that may hamper extrapolation to in vivo conditions. In particular, under normal conditions, superficial medullary tissue layers, where respiratory rhythm is generated, are hyperoxic (Brockhaus et al. 1993; Okada et al. 1993a), whereas deep medullary layers are hypoxic (Okada et al. 1993a,b). Bath application of an anoxic mixture, as in the present study, may produce large and unpredictable gradients of oxygen levels in the preparation. However, we may preclude the possibility that anoxia caused notable damage to respiratory networks because the changes induced in PB frequency are reversible, as previously reported (Okada et al. 1998, 2007; Voituron et al. 2006, 2010, 2011).

As in most studies using brainstem-spinal cord preparations, we found that bath acidification led to an increase in the respiratory frequency rather than to an

Figure 2. Lack of Vglut3 impairs 5-HT metabolism in the brainstem, and the RRG response to 5-HT

See Supplemental Fig. 1 for schematic representation of the brainstem sections, A. immunolabelling showing that Vglut3 (green) colocalizes poorly with VMAT2 (red) in control mice at the level of the dorsal raphe (DR) (a), raphe pontis (RPn) (b), raphe magnus (RMg) (c) and raphe pallidus nuclei (Rpa) (d). B and C, immunodetection of 5-HT (red) and VGLUT3 (green) expression in coronal sections of control mice at the level of the raphe obscurus nucleus (ROb). Arrows in the upper right corner of panels B and C point toward the ventral medullary surface (B) and RMg (C). VGLUT3 was found in soma of cells at the ROb (Bb) and RMg (Cc) levels, and is co-expressed with 5-HT in cells of ROb and at RMg level (stars, yellow cells in Bc and Cc, respectively). D, 5-HT turnover in $Vqlut3^{-/-}$ pups (n = 12) differs from that in controls (n = 6). Endogenous levels of 5-HT (a), its main metabolite 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) (b) and its precursor L-tryptophan (L-Trp) (c) in the brainstem of $Vqlut3^{-/-}$ and control pups, measured by HPLC. The 5-HT/5-HIAA ratio was significantly higher in $Vglut3^{-/-}$ than in control pups (d). E and F, the spinal response to exogenous 5-HT is impaired in $Vglut3^{-/-}$ pups. E, examples of phrenic bursts recorded from the C4 root of in vitro brainstem preparations from control (a) and Vglut3^{-/-} (b) pups, superfused with normal aCSF and aCSF containing 5-HT (25 μ M, 5 min). Int C4: integrated C4 activity. F, tonic discharges in response to 5-HT appeared with the same latency in $Vq/ut3^{-/-}$ (n = 11) and control (n = 14) preparations (a) but were shorter (b) and of smaller amplitude (c) in $Vglut3^{-/-}$ preparations compared to control preparations (*P < 0.05; Student's unpaired t test, ns: non significant). a.u.: arbitrary units. Values given are means \pm SEM. See Table 1 for full statistical analyses.



Figure 3. Lack of Vglut3 disrupts respiratory control and thermogenesis in the cold Aa and b, examples of changes in central respiratory drive induced by acidosis in Control (a) and $Vglut3^{-/-}$ pups (b) in vitro. Int C4: integrated C4 activity (C4). Ac, the effect of acidosis (shaded) on mean phrenic burst frequency increase in the amplitude of phrenic nerve bursting (Ballanyi *et al.* 1999). This is in contrast with previous data in newborn mice showing that hypercapnia primarily causes an increase in $V_{\rm T}$, with a less prominent increase in respiratory frequency (Ramanantsoa *et al.* 2011). It is generally agreed that the attenuated *in vitro* effects of acidification on the amplitude of phrenic nerve bursting might be related to the removal of afferent sensory inputs in brainstem–spinal cord preparations (Ballanyi *et al.* 1999). Thus, while brainstem–spinal cord preparations are suitable for the analysis of the effects of acidification on the central respiratory network, direct extrapolation to *in vivo* conditions must be done cautiously. In fact, *in vivo* and *in vitro* approaches are complementary in this respect.

The increase in the 5-HT/5-HIAA ratio in the brainstem of $Vglut3^{-/-}$ pups is in line with previous observations in the hippocampus of adult *Vglut3^{-/-}* mice (Amilhon *et al.* 2010). This increase may reflect decreased turnover of 5-HT in Vglut3^{-/-} pups (El Mestikawy et al. 2011). The link between respiratory control and 5-HT metabolism in mice has been previously established by comparing two strains of inbred mice (C57BL/6J vs. FVB/N) that display differences in 5-HT metabolism in the medulla and in respiratory control (Menuet et al. 2011). In newborn mice, large differences in L-Trp and 5-HIAA content were observed between the two strains, leading to a 3-fold higher 5-HT/5-HIAA ratio in FVB/N mice. These differences in 5-HT metabolism were associated with greater respiratory irregularity in C57BL/6J mice, both in vitro and in vivo (Menuet et al. 2011). In the present study, L-Trp and 5-HIAA content was not significantly different between Vglut3^{-/-} and control brainstems, and the 5-HT/5-HIAA ratio was 19% higher in Vglut3^{-/-} mice when compared to controls. This relatively small difference in 5-HT metabolism was not associated with differences in respiratory activity under basal conditions, but might have been sufficient to impair this activity under highly demanding hypoxic conditions.

Both the initial (medullary) and the late (spinal) responses to 5-HT were reduced in $Vglut3^{-/-}$ pre-

parations. The reduced response to 5-HT in $Vglut3^{-/-}$ preparations is consistent with its role in potentiating 5-HT vesicular accumulation and the exocytotic secretion of 5-HT. However, the present results do not indicate whether these abnormal responses reflect changes in 5-HT storage and release, or developmental changes in 5-HT receptor expression, although previous results do not indicate any major modification of 5-HT receptors (Amilhon et al. 2010). Previous studies have shown that 5-HT acts at the medullary level and that its effects are due to its specificity for the rostro-ventral respiratory column and not due to a diffuse action on all medullary respiratory centres (see Hilaire et al. (2010) and Hodges & Richerson (2010b) for recent reviews on the respiratory effects of 5-HT). Therefore, the putative impairment of 5-HT signalling due to Vglut3 inactivation may account for the abnormal response to 5-HT. However, we cannot fully discount the influence of 5-HT induced depolarization of larger cell populations in the brainstem (e.g. the A5 area of the caudal pons; Di Pasquale et al. 1992) and spinal cord, and the subsequent release of a large variety of inhibitory and excitatory neurotransmitters, on a part of the response of *Vglut3^{-/-}* preparations in the present study. With these limitations in mind, considering that 5-HT is pivotal to respiratory function (Hilaire et al. 2010) and thermoregulation (Morrison et al. 2008), the present results support the view that the abnormal respiratory and thermogenic responses to cold in Vglut3^{-/-} pups may be caused by abnormal 5-HT metabolism. Abnormal 5-HT signalling may also account for the abnormal RRG response to acidosis, which is closely dependent on 5-HT (Voituron et al. 2010) and mediated by pH-sensitive RTN/pFRG neurons (Guyenet et al. 2008), which receive dense 5-HT inputs from VGLUT3-positive terminals (Nakamura et al. 2005b; Stornetta et al. 2005; Rosin et al. 2006).

The fact that the lack of VGLUT3 increased the response of isolated RRG to acidosis is intriguing. It suggests that glutamate release by 5-HT neurons might inhibit breathing through its action on specific populations of

(PBf) was significantly increased in $Vglut3^{-/-}$ pups (n = 4) when compared to control pups (n = 12, P < 0.05;Student's unpaired *t* test). *Ba* and *b*, examples of changes in central respiratory drive induced by anoxia in control (*a*) and $Vglut3^{-/-}$ pups (*b*) *in vitro*. *Bc*, the effect of anoxia (shaded) was significantly increased in $Vglut3^{-/-}$ pups (n = 8) when compared to controls (n = 18, P < 0.001). *C*, examples of plethysmographic recordings in 6-day-old $Vglut3^{-/-}$ and control pups during normoxia (*a*), hypoxia (10% O₂) (*b*) and post-hypoxia (*Cc*). *Da*–*c*, breathing variables: ventilation (\dot{V}_E), tidal volume (V_T) and breathing frequency (R_f). $Vglut3^{-/-}$ pups (n = 63) displayed decreased ventilation during both normoxia and hypoxia, compared to control pups (n = 200). Both groups displayed a biphasic response to hypoxia (shaded), with the initial increase in \dot{V}_E being followed by a marked decrease (under the control of V_T and R_f). *Ea–c*, percentage change in breathing variables in response to hypoxia (shaded), with the initial increase in \dot{V}_E being follower in $Vglut3^{-/-}$ pups. *Dd*, oxygen consumption (\dot{V}_{O_2}) at 26°C under normoxia and in response to hypoxia (shaded) in 6-day-old $Vglut3^{-/-}$ (n = 7) and control pups (n = 29). The smaller \dot{V}_{O_2} in $Vglut3^{-/-}$ pups (P < 0.001) reflected their impaired thermogenesis. *Ed*, percentage change in \dot{V}_{O_2} relative to pre-hypoxic levels was smaller in $Vglut3^{-/-}$ pups. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.01, Student's unpaired *t* test. Values shown are group means \pm SEM. See Tables 1 and 2 for full statistical analyses. respiratory neurons (Monnier *et al.* 2003). Furthermore, we cannot disregard the possibility that this effect is caused by non-5HT neurons with a potential impact on respiratory activity, as detailed below, or by compensatory mechanisms occurring during perinatal development.

Both our in vitro and in vivo results argue for the involvement of Vglut3 in HVD. In vitro, the decrease in PB frequency in response to anoxia in control preparations confirmed the results of previous studies using similar preparations (Ballanyi et al. 1999), as well as transverse slice preparations (Ramirez et al. 1997). In vivo, hypoxia depressed ventilation, as consistently observed in newborn mammals (Teppema & Dahan, 2010). Thus, both in vitro and in vivo experiments confirmed that hypoxia decreased respiratory frequency, and showed that the lack of VGLUT3 disrupted this response. Since the RRG in *in vitro* preparations is isolated and lacks excitatory input from peripheral carotid body chemoreceptors, the abnormal RRG response of $Vglut3^{-/-}$ pups to anoxia can be ascribed to the inhibitory drive from hypoxia-sensing neurons of the ventral medulla (Voituron et al. 2006). In keeping with our in vitro data, HVD in vivo was blunted in $Vglut3^{-/-}$ pups, leading to greater \dot{V}_E and R_f . Previous studies have shown that blocking 5-HT2 receptors in adult mice suppresses HVD (Kanamaru & Homma, 2009). Taken together, these results suggest that the lack of VGLUT3 disrupts a common mechanism accounting for both in vitro and in vivo findings. However, the decrease in PB frequency *in vitro* (frequently referred to as 'short-term depression' under these experimental conditions; Dick & Coles, 2000; Powell et al. 1998) and the decrease in ventilation in vivo had markedly different time courses, which may at least partially reflect different mechanisms. Therefore, caution must be used in attempting to integrate both results within a unifying framework, as previously noted (Bissonnette, 2000).

The weaker thermogenic response of $Vglut3^{-/-}$ pups to cold indicates that the range of phenotypic defects extends beyond respiratory control disorders. This defect is probably related to the fact that a brainstem network that includes raphe neurons that express VGLUT3 through postganglionic sympathetic neurons controls brown adipose cells (Schafer et al. 2002; Nakamura et al. 2005a; Morrison et al. 2008). Furthermore, the hypometabolic response to hypoxia (i.e. the decrease in thermogenesis and \dot{V}_{O_2} consistently observed in newborn mammals during hypoxia; Mortola, 2004) was blunted in $Vglut3^{-/-}$ pups. The mechanisms underlying hypoxic hypometabolism are complex and, to date, elusive, but they may involve a decrease in central thermosensitivity at the level of the hypothalamic medial preoptic area (Tattersall & Milsom, 2009), a target for VGLUT3-expressing non-5-HT neurons of the midbrain raphe nuclei (Hioki et al. 2010). The drop in arterial P_{CO_2} that normally accompanies hypoxic hypometabolism during and after hypoxia may not have been present in $Vglut3^{-/-}$, thus counteracting HVD and accounting for the present ventilatory data.

The implication of 5-HT signalling defects in the $Vglut3^{-/-}$ phenotype is supported by the similarities between Vglut3^{-/-} pups and those lacking central 5-HT neurons ($Lmx1b^{f/f/p}$ pups), which display decreased ventilation and body temperatures when exposed to cold (Hodges et al. 2009). Furthermore, newborn mice lacking 60–70% of their 5-HT neurons (*Pet-1^{-/-}*) display reduced thermogenic and ventilatory responses to cold (Cummings et al. 2011b) and reduced ability to survive episodic severe hypoxia (Cummings et al. 2011a). The critical role of 5-HT neurons in respiratory and thermoregulatory functions was recently confirmed in conscious mice using the inducible and reversible suppression of neuronal excitability, which attenuated the ventilatory response to CO₂ and the thermogenic response to cold (Ray et al. 2011).

While the role of VGLUT3 in 5-HT neuronal activity may account for the present results, further studies are necessary to substantiate this interpretation, and other mechanisms may also be involved. Firstly, in addition to 5-HT neurons, the raphe contains a population of VGLUT3-positive cells that are not serotonergic (Commons, 2009; Jackson et al. 2009). Both subclasses of VGLUT3-positive neurons from the raphe could exert modulatory effects on 5-HT transmission and contribute to the response to hypoxic stress in $Vglut3^{-/-}$ mice. Also, VGLUT3 expression is prominent in nitroxidergic neurons and glial processes of the dorsolateral, medial and commissural subnuclei of the nucleus tractus solitarii (NTS; Lin, 2009), all regions that receive afferents from carotid body chemoreceptors (Finley & Katz, 1992). The lack of VGLUT3 may also affect the response to hypoxic stress through its effects on these structures. Furthermore, as previously noted, VGLUT3 is expressed in various neuronal populations including cholinergic interneurons of the dorsal and ventral striatum, and subpopulations of cortical and hippocampal basket cells (Fremeau et al. 2002). VGLUT3 expression has also been reported in non-neuronal cells such as insulin secreting β -cells of the pancreas (Gammelsaeter et al. 2011), chromaffin cells of the adrenal medulla (Olivan et al. 2011), and in the liver (Gras et al. 2002). Some of these populations might be indirectly implicated in some aspects of breathing control and metabolism. Previous analyses have shown that adult mice lacking VGLUT3 have a number of diverse disorders such as pain, deafness and non-convulsive seizures (Ruel et al. 2008; Seal et al. 2008, 2009), suggesting that Vglut3 may interfere with a large variety of neuromodulatory and behavioural phenotypes beyond the 5-HT system (El Mestikawy et al. 2011).

In conclusion, the present results identify VGLUT3 as a protective factor against hypoxic stress in newborns, thus extending its known role in the defence against psychological stress to autonomic functions. The use of temporal and spatial conditional mutants in future studies should improve our understanding of the molecular mechanisms underlying these defensive functions.

References

Alenina N, Kikic D, Todiras M, Mosienko V, Qadri F, Plehm R, Boye P, Vilianovitch L, Sohr R, Tenner K, Hortnagl H & Bader M (2009). Growth retardation and altered autonomic control in mice lacking brain serotonin. *Proc Natl Acad Sci U* S A 106, 10332–10337.

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.

Ballanyi K, Onimaru H & Homma I (1999). Respiratory network function in the isolated brainstem-spinal cord of newborn rats. *Prog Neurobiol* **59**, 583–634.

Bissonnette JM (2000). Mechanisms regulating hypoxic respiratory depression during fetal and postnatal life. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **278**, R1391–1400.

Bollen B, Bouslama M, Matrot B, Rotrou Y, Vardon G, Lofaso F, Van den Bergh O, D'Hooge R & Gallego J (2009). Cold stimulates the behavioral response to hypoxia in newborn mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296, R1503–1511.

Bou-Flores C, Lajard AM, Monteau R, De Maeyer E, Seif I, Lanoir J & Hilaire G (2000). Abnormal phrenic motoneuron activity and morphology in neonatal monoamine oxidase A-deficient transgenic mice: possible role of a serotonin excess. *J Neurosci* **20**, 4646–4656.

Brockhaus J, Ballanyi K, Smith JC & Richter DW (1993). Microenvironment of respiratory neurons in the *in vitro* brainstem–spinal cord of neonatal rats. *J Physiol* 462, 421–445.

Caubit X, Thoby-Brisson M, Voituron N, Filippi P, Bevengut M, Faralli H, Zanella S, Fortin G, Hilaire G & Fasano L (2010). Teashirt 3 regulates development of neurons involved in both respiratory rhythm and airflow control. *J Neurosci* 30, 9465–9476.

Commons KG (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.

Cummings KJ, Hewitt JC, Li A, Daubenspeck JA & Nattie EE (2011*a*). Postnatal loss of brainstem serotonin neurones compromises the ability of neonatal rats to survive episodic severe hypoxia. *J Physiol* **589**, 5247–5256.

Cummings KJ, Li A & Nattie EE (2011*b*). Brainstem serotonin deficiency in the neonatal period: autonomic dysregulation during mild cold stress. *J Physiol* **589**, 2055–2064.

Deneris ES & Wyler SC (2012). Serotonergic transcriptional networks and potential importance to mental health. *Nat Neurosci* **15**, 519–527.

Di Pasquale E, Morin D, Monteau R & Hilaire G (1992). Serotonergic modulation of the respiratory rhythm generator at birth: an in vitro study in the rat. *Neurosci Lett* **143**, 91–95.

Dick TE & Coles SK (2000). Ventrolateral pons mediates short-term depression of respiratory frequency after brief hypoxia. *Respir Physiol* **121**, 87–100.

Drorbaugh JE & Fenn WO (1955). A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. *Pediatrics* **16**, 81–87.

Drummond GB (2009). Reporting ethical matters in *The Journal of Physiology*: standards and advice. *J Physiol* **587**, 713–719.

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.

Epstein MA & Epstein RA (1978). A theoretical analysis of the barometric method for measurement of tidal volume. *Respir Physiol* **32**, 105–120.

Finley JC & Katz DM (1992). The central organization of carotid body afferent projections to the brainstem of the rat. *Brain Res* **572**, 108–116.

Fremeau RT Jr, 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 signalling by glutamate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14488–14493.

Fremeau RT Jr, Voglmaier S, Seal RP & Edwards RH (2004). VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. *Trends Neurosci* 27, 98–103.

Gammelsaeter R, Coppola T, Marcaggi P, Storm-Mathisen J, Chaudhry FA, Attwell D, Regazzi R & Gundersen V (2011). A role for glutamate transporters in the regulation of insulin secretion. *PloS One* **6**, e22960.

Gautier H (1996). Interactions among metabolic rate, hypoxia, and control of breathing. *J Appl Physiol* **81**, 521–527.

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.

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 serotoninergic neurons. *J Neurosci* **22**, 5442–5451.

Guyenet PG, Stornetta RL & Bayliss DA (2008). Retrotrapezoid nucleus and central chemoreception. *J Physiol* **586**, 2043–2048.

Hagberg H, Peebles D & Mallard C (2002). Models of white matter injury: comparison of infectious, hypoxic-ischemic, and excitotoxic insults. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* **8**, 30–38.

Hilaire G, Voituron N, Menuet C, Ichiyama RM, Subramanian HH & Dutschmann M (2010). The role of serotonin in respiratory function and dysfunction. *Respir Physiol Neurobiol* **174**, 76–88. Hioki H, Nakamura H, Ma YF, Konno M, Hayakawa T, Nakamura KC, 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.

Hodges MR, Best S & Richerson GB (2011). Altered ventilatory and thermoregulatory control in male and female adult Pet-1 null mice. *Respir Physiol Neurobiol* **177**, 133–140.

Hodges MR & Richerson GB (2010*a*). Medullary serotonin neurons and their roles in central respiratory chemoreception. *Respir Physiol Neurobiol* **173**, 256–263.

Hodges MR & Richerson GB (2010*b*). The role of medullary serotonin (5-HT) neurons in respiratory control: contributions to eupneic ventilation, CO₂ chemoreception, and thermoregulation. *J Appl Physiol* **108**, 1425–1432.

Hodges MR, Wehner M, Aungst J, Smith JC & Richerson GB (2009). Transgenic mice lacking serotonin neurons have severe apnea and high mortality during development. *J Neurosci* **29**, 10341–10349.

Jackson J, Bland BH & Antle MC (2009). Nonserotonergic projection neurons in the midbrain raphe nuclei contain the vesicular glutamate transporter VGLUT3. *Synapse* **63**, 31–41.

Johnson SM, Turner SM, Huxtable AG & Ben-Mabrouk F (2012). Isolated in vitro brainstem-spinal cord preparations remain important tools in respiratory neurobiology. *Respir Physiol Neurobiol* **180**, 1–7.

Kamae T, Kiyomizu K, Nakazawa T, Tadokoro S, Kashiwagi H, Honda S, Kanakura Y & Tomiyama Y (2011). Bleeding tendency and impaired platelet function in a patient carrying a heterozygous mutation in the thromboxane A2 receptor. *J Thromb Haemost* **9**, 1040–1048.

Kanamaru M & Homma I (2009). Dorsomedial medullary 5-HT2 receptors mediate immediate onset of initial hyperventilation, airway dilation, and ventilatory decline during hypoxia in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **297**, R34–41.

Lazarenko RM, Milner TA, Depuy SD, Stornetta RL, West GH, Kievits JA, Bayliss DA & Guyenet PG (2009). Acid sensitivity and ultrastructure of the retrotrapezoid nucleus in Phox2b-EGFP transgenic mice. *J Comp Neurol* **517**, 69–86.

Lin LH (2009). Glutamatergic neurons say NO in the nucleus tractus solitarii. *J Chem Neuroanat* **38**, 154–165.

Lofaso F, Dauger S, Matrot B, Vardon G, Gaultier C & Gallego J (2007). Inhibitory effects of repeated hyperoxia on breathing in newborn mice. *Eur Respir J* **29**, 18–24.

Massaro GD, Mortola JP & Massaro D (1995). Sexual dimorphism in the architecture of the lung's gas-exchange region. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 1105–1107.

Menuet C, Kourdougli N, Hilaire G & Voituron N (2011). Differences in serotoninergic metabolism possibly contribute to differences in breathing phenotype of FVB/N and C57BL/6J mice. *J Appl Physiol* **110**, 1572–1581.

Merazzi D & Mortola JP (1999). Effects of changes in ambient temperature on the Hering-Breuer reflex of the conscious newborn rat. *Pediatr Res* **45**, 370–376.

Miller SS, Lee HC & Gould JB (2011). Hypothermia in very low birth weight infants: distribution, risk factors and outcomes. *J Perinatol* **31**(Suppl 1), S49–56.

Monnier A, Alheid GF & McCrimmon DR (2003). Defining ventral medullary respiratory compartments with a glutamate receptor agonist in the rat. *J Physiol* **548**, 859–874.

Morrison SF, Nakamura K & Madden CJ (2008). Central control of thermogenesis in mammals. *Exp Physiol* **93**, 773–797.

Mortola J & Gautier H. (1995). Interaction between metabolism and ventilation: effects of respiratory gases and temperature. In *Regulation of Breathing*, ed. Dempsey JA & Pack AI, pp. 1011–1064. Marcel Dekker, New York.

Mortola JP (2004). Implications of hypoxic hypometabolism during mammalian ontogenesis. *Respir Physiol Neurobiol* **141**, 345–356.

Mortola JP & Frappell PB (1998). On the barometric method for measurements of ventilation, and its use in small animals. *Can J Physiol Pharmacol* **76**, 937–944.

Nakamura K, Matsumura K, Kobayashi S & Kaneko T (2005*a*). Sympathetic premotor neurons mediating thermoregulatory functions. *Neurosci Res* **51**, 1–8.

Nakamura Y, Nakamura K, Matsumura K, Kobayashi S, Kaneko T & Morrison SF (2005*b*). Direct pyrogenic input from prostaglandin EP3 receptor-expressing preoptic neurons to the dorsomedial hypothalamus. *Eur J Neurosci* **22**, 3137–3146.

Okada Y, Kawai A, Muckenhoff K & Scheid P (1998). Role of the pons in hypoxic respiratory depression in the neonatal rat. *Respir Physiol* 111, 55–63.

Okada Y, Masumiya H, Tamura Y & Oku Y (2007). Respiratory and metabolic acidosis differentially affect the respiratory neuronal network in the ventral medulla of neonatal rats. *Eur J Neurosci* **26**, 2834–2843.

Okada Y, Muckenhoff K, Holtermann G, Acker H & Scheid P (1993a). Depth profiles of pH and PO₂ in the isolated brain stem-spinal cord of the neonatal rat. *Respir Physiol* **93**, 315–326.

Okada Y, Muckenhoff K & Scheid P (1993b). Hypercapnia and medullary neurons in the isolated brain stem-spinal cord of the rat. *Respir Physiol* **93**, 327–336.

Olivan AM, Perez-Rodriguez R, Roncero C, Arce C, Gonzalez MP & Oset-Gasque MJ (2011). Plasma membrane and vesicular glutamate transporter expression in chromaffin cells of bovine adrenal medulla. *J Neurosci Res* **89**, 44–57.

Onimaru H & Homma I (2003). A novel functional neuron group for respiratory rhythm generation in the ventral medulla. *J Neurosci* 23, 1478–1486.

Osaka T (2011). Hypoxia-induced hypothermia mediated by noradrenaline and nitric oxide in the rostromedial preoptic area. *Neuroscience* **179**, 170–178.

Perrone S, Bracci R & Buonocore G (2002). New biomarkers of fetal-neonatal hypoxic stress. *Acta Paediatr* **91**, 135–138.

Phifer CB & Terry LM (1986). Use of hypothermia for general anaesthesia in preweanling rodents. *Physiol Behav* **38**, 887–890.

Powell FL, Milsom WK & Mitchell GS (1998). Time domains of the hypoxic ventilatory response. *Respir Physiol* **112**, 123–134. Ramanantsoa N, Hirsch MR, Thoby-Brisson M, Dubreuil V, Bouvier J, Ruffault PL, Matrot B, Fortin G, Brunet JF, Gallego J & Goridis C (2011). Breathing without CO₂ chemosensitivity in conditional Phox2b mutants. *J Neurosci* **31**, 12880–12888.

Ramanantsoa N, Vaubourg V, Dauger S, Matrot B, Vardon G, Chettouh Z, Gaultier C, Goridis C & Gallego J (2006). Ventilatory response to hyperoxia in newborn mice heterozygous for the transcription factor Phox2b. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **290**, R1691–1696.

Ramirez JM, Quellmalz UJ & Wilken B (1997). Developmental changes in the hypoxic response of the hypoglossus respiratory motor output in vitro. *J Neurophysiol* **78**, 383–392.

Ray RS, Corcoran AE, Brust RD, Kim JC, Richerson GB, Nattie E & Dymecki SM (2011). Impaired respiratory and body temperature control upon acute serotonergic neuron inhibition. *Science* **333**, 637–642.

Renolleau S, Dauger S, Autret F, Vardon G, Gaultier C & Gallego J (2001). Maturation of baseline breathing and of hypercapnic and hypoxic ventilatory responses in newborn mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **281**, R1746–1753.

Rosin DL, Chang DA & Guyenet PG (2006). Afferent and efferent connections of the rat retrotrapezoid nucleus. *J Comp Neurol* **499**, 64–89.

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.

Saiki C, Matsuoka T & Mortola JP (1994). Metabolic-ventilatory interaction in conscious rats: effect of hypoxia and ambient temperature. *J Appl Physiol* **76**, 1594–1599.

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.

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.

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.

Simakajornboon N, Vlasic V, Li H & Sawnani H (2004). Effect of prenatal nicotine exposure on biphasic hypoxic ventilatory response and protein kinase C expression in caudal brain stem of developing rats. *J Appl Physiol* **96**, 2213–2219.

Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, Richter DW & Feldman JL (1991). Pre-Botzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* **254**, 726–729.

Stornetta RL, Rosin DL, Simmons JR, McQuiston TJ, Vujovic N, Weston MC & Guyenet PG (2005). Coexpression of vesicular glutamate transporter-3 and γ -aminobutyric acidergic markers in rat rostral medullary raphe and intermediolateral cell column. *J Comp Neurol* **492**, 477–494.

Suzue T (1984). Respiratory rhythm generation in the in vitro brain stem–spinal cord preparation of the neonatal rat. *J Physiol* **354**, 173–183.

Tattersall GJ & Milsom WK (2009). Hypoxia reduces the hypothalamic thermogenic threshold and thermosensitivity. *J Physiol* **587**, 5259–5274.

Teppema LJ & Dahan A (2010). The ventilatory response to hypoxia in mammals: mechanisms, measurement, and analysis. *Physiol Rev* **90**, 675–754.

Thoby-Brisson M, Karlen M, Wu N, Charnay P, Champagnat J & Fortin G (2009). Genetic identification of an embryonic parafacial oscillator coupling to the preBotzinger complex. *Nat Neurosci* **12**, 1028–1035.

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.

Viemari JC, Roux JC, Tryba AK, Saywell V, Burnet H, Pena F, Zanella S, Bevengut M, Barthelemy-Requin M, Herzing LB, Moncla A, Mancini J, Ramirez JM, Villard L & Hilaire G (2005). Mecp2 deficiency disrupts norepinephrine and respiratory systems in mice. *J Neurosci* **25**, 11521–11530.

Voituron N, Frugiere A, Champagnat J & Bodineau L (2006). Hypoxia-sensing properties of the newborn rat ventral medullary surface *in vitro*. *J Physiol* **577**, 55–68.

Voituron N, Frugiere A, Mc Kay LC, Romero-Granados R, Dominguez-Del-Toro E, Saadani-Makki F, Champagnat J & Bodineau L (2011). The kreisler mutation leads to the loss of intrinsically hypoxia-activated spots in the region of the retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory group. *Neuroscience* **194**, 95–111.

Voituron N, Shvarev Y, Menuet C, Bevengut M, Fasano C, Vigneault E, El Mestikawy S & Hilaire G (2010). Fluoxetine treatment abolishes the in vitro respiratory response to acidosis in neonatal mice. *PLoS One* **5**, e13644.

Author contributions

S.E.M., G.H. and J.G. designed the experiments; S.M., N.V., A.S., E.V., L.M., N.R., B.A., O.P., E.L., B.M., S.M., N.V., A.S., S.E.M., G.H. and J.G. collected and analysed data; S.M., N.V., S.E.M., G.H. and J.G. analysed data and wrote the manuscript. All authors approved the final version for publication.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Agence Nationale pour la Recherche (ANR). B.A. was supported by a fellowship from Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), and E.L. by Fédération pour la Recherche sur le Cerveau (FRC) and France Alzheimer. We are indebted to Dr Christo Goridis (Ecole Normale Supérieure, Paris) for providing PHOX2B rat monoclonal antiserum.

Translational perspective

Hypoxia–ischaemia is a major cause of acute brain injury in neonates. Hypoxic stress may be aggravated by cold, especially in preterm infants (Miller *et al.* 2011). While keeping in mind the limitations of extrapolating data from mice to humans, the present results in 6-day-old mice might shed some light on the response to hypoxic stress in preterm human infants of 32–35 weeks of gestational age (Hagberg *et al.* 2002). These results suggest that the lack of VGLUT3 compromises the ability of preterms to produce two components of the defence response to hypoxic hypometabolism and hypoxic ventilatory decline. The present results consolidate the concept that major components of the response to hypoxic stress (ventilatory, thermoregulatory, behavioural) in newborns are tightly coupled at the central level, and that the newborn's inability to produce this integrated response may originate in its central organization rather that in its components. The involvement of Vglut3 in the response to hypoxic stress in newborns suggests that Vglut3 could be a potential genetic marker of vulnerability to hypoxic damage. However, further investigations are required to better understand the role of Vglut3 in this process and to identify it as a potential pharmacological target against hypoxic stress in neonates.

Conclusion - Perspectives

Ce travail montre que VGLUT3 constitue un facteur de résistance aussi bien au stress psychologique qu'au stress physique tel que l'hypoxie néonatale. Chez les souris VGLUT3-/-, la perte de VGLUT3 n'affecte pas l'organisation histologique des noyaux respiratoires du tronc cérébral ni leur activité dans des conditions normales, mais elle altère la réponse respiratoire et thermogénique au froid et à l'hypoxie, en perturbant notamment l'hypométabolisme hypoxique et l'HVD.

Notons que notre lignée VGLUT3^{-/-} est sur un fond génétique C57BL/6J. Il a récemment été montré une plus grande vulnérabilité respiratoire néonatale des souris présentant ce fond génétique, en raison d'une fragilité plus marquée de son phénotype sérotoninergique (Menuet, Kourdougli et al. 2011). On peut donc se demander si l'implication de VGLUT3 dans la réponse au stress hypoxique néonatal n'est pas amplifiée ici en raison du fond génétique des souris VGLUT3^{-/-}.

Néanmoins notre travail établi pour la première fois que VGLUT3 est nécessaire pour obtenir une réponse optimale au cours du stress hypoxique néonatal, en faisant un marqueur d'adaptabilité néonatale.
ARTICLE #2

RÔLE DE VGLUT3 DANS LA SURDITÉ DFNA25 : IMPLICATION DANS LE VIEILLISSEMENT PRÉMATURÉ DE LA CELLULE CILIÉE INTERNE ET LE PROCESSUS DE MORT AUTOPHAGIQUE

Introduction

Afin d'évaluer le rôle de VGLUT3 dans l'adaptabilité au cours du vieillissement sensoriel, nous nous sommes penchés sur le rôle de VGLUT3 dans une surdité associée à l'avancée en âge.

Au sein de la cochlée, la CCI est capable de transformer l'onde sonore en influx nerveux. La synapse en ruban des CCI constitue le premier relais de la transmission du message nerveux auditif. Cette synapse est exclusivement glutamatergique et le remplissage en glutamate des vésicules synaptiques est effectué par VGLUT3 (Seal, Akil et al. 2008; Ruel, Emery et al. 2008). Au même titre que d'autres relais du système auditif, la CCI et sa synapse en ruban jouent donc un rôle clef dans certaines surdités.

La presbyacousie touche plus de 60% de la population âgée de plus de 60 ans et se caractérise par une perte auditive progressive touchant préférentiellement les hautes fréquences. De nombreux mécanismes physiopathologiques ont été évoqués dans cette pathologie (Uchida, Sugiura et al. 2014). L'étude des formes génétiques de surdités liées à l'âge constitue une piste pour mieux comprendre la presbyacousie. Par exemple, GRHC2, acteur de la différenciation et du maintien des cellules épithéliales, est impliqué dans la surdité DFNA28 (Peters, Anderson et al. 2002); KCNQ4, canal potassique situé sur les CCI, est impliqué dans la surdité DFNA2 (Coucke, Van Hauwe et al. 1999); la surdité DFNA5 semble être liée pour sa part à des processus apoptotiques (Op de Beeck, Schacht et al. 2011) ; ou encore MYO6, une forme d'actine, est mutée dans la surdité DFNA22 (Melchionda, Ahituv et al. 2001). Toutes ces surdités sont d'apparition de l'avancée progressive au cours en âge. L'analyse des mécanismes physiopathologiques sous-jacents peut donc nous éclairer sur d'éventuels traitements de la presbyacousie (Uchida, Sugiura et al. 2014).

La surdité DFNA25, surdité non syndromique d'apparition progressive touchant les hautes fréquences, a récemment été associée à une mutation du gène SLC17A8 codant pour VGLUT3 (Seal, Akil et al. 2008 ; Ruel, Emery et al. 2008). Cette mutation ponctuelle remplace l'alanine en position 211 par une valine (p.A221V), au sein d'un motif KWAPPLER très conservé entre les espèces et au sein des trois VGLUT3. L'alanine 211 humaine correspond chez la souris à l'alanine 224 (A224) de VGLUT3.

Afin de confirmer l'imputabilité de cette mutation p.A211V dans la surdité DFNA25 et de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués, nous avons étudié le phénotype auditif de souris exprimant la mutation p.A224V (souris VGLUT3^{A224V/A224V}). Ces souris présentent une surdité progressive avec l'avancée en âge, en raison d'une atteinte de leurs CCI. Outre la preuve du rôle de cette mutation dans la surdité DFNA25, nous avons mis en évidence une baisse importante de l'expression de VGLUT3 (environ 43%) dans les cochlées de ces souris, mais également une atteinte des stéréocils des CCI qui pourrait être liée à une activation de la mort par autophagie.

Functional characterization of mice expressing the mutated VGLUT3 isoform that underlies Nonsyndromic Deafness DFNA25 in human.

Stéphanie Miot^{1, 2*}, Marie Guillet^{2*}, Jing Wang², Gaston Sendin² Lauriane Ramet¹, Benjamain chaix², , Michel Eybalin², Stéphanie Daumas¹, Salah El Mestikawy^{1, 3, *}, Régis Nouvian^{2, *}, Jean-Luc Puel^{2, *}

¹ Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR 8246, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMR-S 1130, Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie (UPMC) Paris 06, Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS), UM119 Neuroscience Paris Seine, F-75005, Paris, France.

² Inserm, Unité Mixte de Recherche 1051, Institute for Neurosciences of Montpellier, 34295
Montpellier Cedex 5, France, and Université Montpellier, 34090 Montpellier, France
³ Douglas Hospital Research Center, Department of Psychiatry, McGill University, 6875
boulevard Lasalle Verdun, QC, Canada.

†These authors contributed equally to this work.

*Correspondence to: SEM (salah.el_mestikawy@upmc.fr), RN (<u>regis.nouvian@inserm.fr</u>) and JLP (jean-luc.puel@inserm.fr).

Abbreviated title: VGLUT3-p.A211V and audition

Keywords: Cochlea, presbycusis, DFNA25, inner hair cells, VGLUT3, VGLUT3-p.A211V

Author contributions:

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

Number of pages: 47

Number of:	Figures: 11 (supplementary 3)
	Tables: 0 (supplementary 1)
	3D models: 0
Number of words for:	Abstract:
	Introduction:
	Discussion:

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

Acknowledgements

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

SM received a PhD fellowship from the Ecole de l'INSERM-Liliane Bettencourt.

Abstract

At ribbon synapses of inner hair cells (IHCs) glutamate is uploaded in synaptic vesicles by the atypical type 3 vesicular glutamate transporter (VGLUT3). A missense mutation of SLC17A8 (the gene encoding VGLUT3) is responsible from the progressive deafness DFNA25 in humans. This point mutation changes alanine in position 211 for a valine. Alanine 211 is part of KWAPLER motive highly conserved among VGLUTs from all species. In humans Alanine 211 corresponds to Alanine in position 224 from the mouse VGLUT3 (A224). A mouse line expressing the p.A224V mutation was generated to investigate the molecular and cellular mechanisms underlying DFNA25.

The p.A224V mutation induces a strong inhibition (-70%) of VGLUT3 expression in mice cochlea. A progressive deafness was observed in VGLUT3^{A224V/A224V} mice. Auditory Brainstem Responses (ABR) and Compound Action Potential (CAP) were impaired in VGLUT3^{A224V/A224V} mice. Ribbon synapses appeared and presynaptic properties of IHC appeared to be intact in mutant mice. In contrast, IHCs stereocilia were profoundly affected in VGLUT3^{A224V/A224V} 6 months old mice independently of any γ-actin anatomical damages. Moreover, Beclin-1 dependent autophagy was activated in the cochlea of VGLUT3^{A224V/A224V} mice. Using yeast 2 hybrid screening we identified that the KWAPLER motive interacted with the cullin3 pathway which could influence the Beclin1 dependent autophagy in VGLUT3^{A224V/A224V} mice cochlea.

Taken together, ours results confirmed that the VGLUT3-p.A221V mutation leads to a progressive auditory in the VGLUT3^{A224V/A224V} mice model. Furthermore, we establish that DFNA25 is caused by IHCs autophagic death. Therefore, the VGLUT3-p.A211V mutation is at the origin of DFNA25 and our mice model open the way to a deeper understanding of this presbyacusis.

INTRODUCTION

Similarly to the other 2 subtypes of vesicular glutamate transporters (VGLUT1 and VGLUT2), the atypical type 3 vesicular glutamate transporter (VGLUT3) catalyze a proton-dependent accumulation of glutamate inside presynaptic vesicles (Gras, Herzog et al. 2002, Schafer, Varoqui et al. 2002, Takamori, Malherbe et al. 2002). Whereas VGLUT1 and VGLUT2 are predominantly expressed by glutamatergic cortical and subcortical neurons (respectively), in contrast, VGLUT3 is present in subpopulation of neurons using other transmitter than glutamate (for review see (EI Mestikawy, Wallen-Mackenzie et al. 2011)). However, VGLUT3 is also observed in subpopulation of glutamatergic neurons in raphe nuclei or in the cochlea (Commons 2009); (Qi, Zhang et al. 2014); Ruel, 2008 #9; Seal, 2008 #8}... In addition, VGLUT3 is expressed in the inner hair cells, the sensory cells of the cochlea, the organ of hearing. IHCs translate incoming sound stimulation into glutamate release onto the afferent auditory fibers. Genetic deletion of exon 2 of SLC17A8 (the gene coding for VGLUT3) results in mice that no longer express the transporter and that are profoundly deaf (Gras, Herzog et al. 2002, Ruel, Emery et al. 2008, Seal, Akil et al. 2008).

Deafness and hearing impairment affect over 250 millions of human beings worldwide. More than 60% of humans over 60 years old suffer from a hearing loss known as presbycusis. More than half of these cases of sensorineural hearing loss have a genetic etiology (Fraser 1964). DFNA25 is a delayed-onset and progressive human autosomal-dominant non syndromic hereditary hearing impairment that predominantly affects high frequencies. DFNA25 was mapped at the 12q21-q24 locus of a United States family with Czech descent (Greene, McMillan et al. 2001). Interestingly SLC17A8 is mapped near 12q23.1. In 2008, Ruel et al. identified in two independent families a heterozygous missense mutation (c.632C/T) of SLC17A8 that segregated with DFNA25 deafness (Ruel, Emery et al. 2008). This point mutation changes alanine in position 211 for a valine. The mutated A211 is part of a motif KWAPPLER highly conserved in all human VGLUT subtypes (VGLUT1-3) and across species. In humans Alanine 211 corresponds to Alanine in position 224 in the mouse VGLUT3 (A224).

A mouse line expressing the p.A211V mutation was generated by the *Institut Clinique de la souris* (Illkirch, France, http://www.ics-mci.fr/) and was named VGLUT3^{A224V/A224V} {Ramet, Submitted #12}. The central nervous system (CNS) of VGLUT3^{A224V/A224V} is under current investigation and will be published independently {Ramet, Submitted #12}. In the present report, the effects of the p.A224V mutation on the cochlea were investigated at different ages in this mouse model. The expression of VGLUT3 was severely reduced (about 43%) in

cochlea of VGLUT3^{A224V/A224V} mice at all ages inspected. As with human subjects, we observed in VGLUT3^{A224V/A224V} mice a progressive deafness, due to morphological and functional IHC impairment. At 6 months the morphology of IHC stereocilia was profoundly altered. We observed an IHC loss related to a possible autophagic death activation. In summary the VGLUT3^{A224V/A224V} mouse line will represent a valuable model to understand molecular and cellular events underlying DFNA25 and this will open the way to the identification of potential treatments.

MATERIAL AND METHODS

<u>Animals</u>

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* (authorization # XXXXX from ethics committee Darwin #Y). All efforts were made to minimize the number of animals used in the course of the study and to ensure their well-being. The animals were housed in a temperature-controlled room (21 \pm 2°C) with free access to water and food under a light/dark cycle of 12 h (light 7:30 - 19:30).

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

A mouse line expressing the p.A224V mutation was generated by the *Institut Clinique de la souris* (Illkirch, France, http://www.ics-mci.fr/) as previoulsy described {Ramet, Submitted #12}. Mice were genotyped by PCR analysis of tail DNA with the following PCR primers: 5'-CGGAGGGGAAGC-CAGGAAAGGG-3' and 5'-GACAGCTCAGTGAGCTGTAGACCCAG-3' for the WT and the mutated allele, yielding bands of 219 and 306 bp, respectively {Ramet, Submitted #12}.

Mutant mice (from 14 days to 12 months old) were obtained by crossing heterozygous VGLUT3^{+/A224V} (C57BL/6N genetic background) or VGLUT3^{+/-} (Sakae, Marti et al. 2015) mice with VGLUT3^{+/A224V} mice. Breeding provided mice expressing either: i) 2 copies of the VGLUT3 wild type allele (VGLUT3^{+/+}), ii) one copy of mutated and one copy of VGLUT3 wild type allele (VGLUT3^{+/+}), iii) 2 copies of mutated alleles (VGLUT3^{A224V/A224V}) or iv) only one copy of mutated allele (VGLUT3^{A224V/-}) {Ramet, Submitted #12}.

Female or male littermates were used for the physiological, electrophysiological, anatomical and biochemical experiments. Animals were randomly and blindly for the invetigator allocated experimental groups.

In vivo recordings.

Mice were anesthetized by an intraperitoneal injection of a mixture of Zoletil 50 (40mg/kg) and Rompun 2% (3mg/kg). The rectal temperature was measured with a thermistor probe, and maintained at $37.1^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$, using a heated underblanket. (Homeothermic Blanket Systems – Harvard Apparatus). Heart rate was monitored via EKG electrodes.

Auditory brainstem response and distortion product otoacoustic emission recordings :

For auditory brainstem responses (ABRs), the acoustical stimuli consisted of 9-ms tone bursts, with a plateau and a 1-ms rise/fall time, delivered at a rate of 11/s with alternate

polarity by a JBL 2426H loudspeaker in a calibrated free field. Stimuli were presented to the left ear by varying intensities from 100 dB SPL to 0 dB SPL, in 5 dB step. Stimuli were generated and data acquired using MATLAB (MathWorks) and LabView (National Instruments) software. The difference potential between vertex and mastoid intradermal needles was amplified (2500 times, VIP-20 amplifier), sampled (at a rate of 50 kHz), filtered (bandwidth of 0.3-3 kHz) and averaged (100 to 700 times). Data were displayed using LabView software (National Instruments) and stored on a computer (Dell T7400). ABR thresholds were defined as the lowest sound intensity, which elicits a clearly distinguishable response. For distortion product otoacoustic emission recordings (DPOAEs), an ER-10C S/N 2528 probe (Etymotic Research), consisting of two emitters and one microphone, was inserted in the left external auditory canal. Stimuli were two equilevel (65 dB SPL) primary tones f1 and f2 with a constant f2/f1 ratio of 1.2. The distortion 2f1-f2 was extracted from the ear canal sound pressure and processed by HearID auditory diagnostic system (Mimosa Acoustic) on a computer (Hewlett Packard). The probe was self-calibrated for the two stimulating tones before each recording. f1 and f2 were presented simultaneously, sweeping f2 from 20 kHz to 2 kHz by guarter octave steps. For each frequency, the distortion product 2f1-f2 and the neighboring noise amplitude levels were measured and expressed as a function of f2.

Electrocochleography :

A retroauricular incision of the skin was performed on anesthetized mice and the left tympanic bulla was opened. Cochlear potentials were recorded with a silver positive electrode placed on the round window membrane. The acoustical stimuli were identical to those used to elicit ABRs except for the alternate polarity. Gross cochlear potentials were amplified (2500 times, VIP-20 amplifier), sampled (at a rate of 50 kHz), filtered (bandwidth of 0.001-20 kHz), averaged (50 to 300 times), displayed with LabView software (National Instruments) and stored on a computer (Dell T7400). The signal was then digitally filtered using MATLAB software (MathWorks) with a low-pass filter (cut-off frequency 3.5 kHz) to measure the compound action potential (CAP) and the summating potential (SP), and with a band-pass filter centered on the frequency of stimulation with a 4 kHz span to measure the cochlear microphonic (CM).

Patch-clamp recordings of K^+ currents, Ca^{2+} currents and membrane capacitance.

After cervical dislocation of mice (postnatal day 13 [P13] to 19 [P19]), IHCs of the apical coil of freshly dissected organs of Corti were patch-clamped at their basolateral face at room temperature in tight whole-cell or perforated-patch configurations. The dissection solution contained the following in mM: 5.36 KCl, 141.7 NaCl, 1 MgCl₂-6H₂O, 0.5 MgSO₄-7H₂O, 10

HEPES and 10 D-glucose. For recording of K⁺ currents, the extracellular solution contained the following in mM: 5.8 KCl, 144 NaCl, 0.9 MgCl₂-6H₂O, 1.3 CaCl₂, 10 HEPES, 10 D-Glucose. The pipette solution for recording of K⁺ currents contained the following in mM: 135 KCl, 1 MgCl₂-6H₂O, 10 HEPES, 2 Mg-ATP, 0.3 Na-GTP, 5 EGTA. For Ca²⁺ currents and capacitance measurements, the extracellular solution contained the following in mM: 2.8 KCl, 105 NaCl, 1 MgCl₂-6H₂O, 2 CaCl₂, 10 HEPES, 35 TEA-Cl, 1 CsCl, 10 D-Glucose. The pipette solution for whole-cell recordings of Ca²⁺ currents contained the following in mM: 135 Cs-glutamic acid, TEA-Cl, 10 4-AP, 1 MgCl₂-6H₂O, 10 HEPES, 2 Mg-ATP, 0.3 Na-GTP. The pipette solution for perforated patch recordings contained the following in mM: 135 KCl, 10 HEPES, 1 MgCl₂ and 400 µg/ml amphotericin B. Solutions were adjusted to pH 7.3 and had osmolarities between 290 and 310 mOsm/kg H₂O. All chemicals were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA) with the exception of amphotericin B (Calbiochem, La Jolla, USA). Patch pipettes were pulled from borosilicate glass capillaries (Kwik Fil, WPI) with a two-step vertical puller PIP 6 (HEKA) and coated with silicone elastomer (Sylgard).

K^{+} currents recordings and resting membrane potentials.

Currents were low-pass filtered at 5 kHz and sampled at 50 kHz. Series resistance (Rs) was compensated on-line (80%; t = 10 μ s), and all voltages were corrected for the voltage drop across the uncompensated series resistance (7.25 ± 0.31 MOhm for WT mice, 9.12 ± 0.99 MOhm for Tg mice) and for liquid junction potentials (-4 mV) measured between intra- and extracellular solutions. Except for the deactivated current recordings (KCNQ conductances), all currents were leak-corrected using P/n protocol (10 leak pulses with amplitudes of 20% of the original pulse from a holding potential of -104 mV).

Ca²⁺ currents recordings.

Currents were low-pass filtered at 5 kHz and sampled at 10 kHz for exocytic cell membrane capacitance change (DCm) and at 40 kHz for Ca^{2+} current recordings. Ca^{2+} current was isolated using P/n protocols (10 leak pulses with amplitudes of 20% of the original pulse from a holding potential of -117 mV). Ca^{2+} current integrals were calculated from the total depolarization-evoked inward current, including Ca^{2+} tail currents after P/n leak subtraction (i.e. from the start of the depolarization step to 1.5 ms after the end of the depolarization step). Cells that displayed a membrane current exceeding -50 pA at -87mV were discarded from the analysis. No Rs compensation was applied, but recordings with Rs > 30 MOhm and Rs > 15 MOhm for perforated and whole-cell patch-clamp experiments, respectively, were discarded from the analysis. All voltages were corrected for liquid junction potentials calculated between pipette and bath (-17 mV).

Capacitance measurements recordings.

Cell membrane capacitance (Cm) was measured using the Lindau–Neher technique (Lindau & Neher, 1988), implemented in the software-lockin module of Patchmaster (HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany) combined with compensation of pipette and resting cell capacitances by the EPC-10 (HEKA Elektronik) compensation circuitries. A 1 kHz, a 70 mV peak-to-peak sinusoid was applied about the holding potential of -87 mV. DCm was estimated as the difference of the mean Cm over 400 ms after the end of the depolarization (the initial 250 ms was skipped) and the mean prepulse capacitance (400 ms). Mean DCm estimates present grand averages calculated from the mean estimates of individual IHCs.

Immunohistochemistry

Mice cochleae were perfused in 4% paraformaldehyde at room temperature for 45 minutes, washed two times in PBS solution, decalcified in EDTA solution and transferred into a sucrose (20% weigh/vol) in PBS overnight at 4°C. Cochleae were transferred in OCT diluted in 20 sucrose solution at 4°C for 6 hours. They were the embedded in Tissue Tek (Sakura, Netherlands) and frozen at -80°C. Frozen 10–20 µm sections were prepared using a 2800 Frigocut cryostat (Reichert-Jung, Cambridge Instruments, Germany). Cryostat sections were rehydrated in successive PBS 1X solutions. After pre-incubation in blocking buffer (donkey serum 30%, Triton 0,3%, PBS 1X) at room temperature for 45 minutes, sections were then incubated overnight at 4°C with primary antiserums and then with secondary antibody conjugated to alexa 488, 555 or 647 (1: 1000 Invitrogen). Section were mounted on microscope slides (Vector, Burlingame, CA, USA) and imaged using a confocal microscopy (Leica TCS SP8-UV).

Synapses quantification:

Apical turns were performed as described previously (Sendin, Bulankina et al. 2007) and immunohistochemistry was performed with mouse IgG anti C-terminal binding protein 2 (CtBP2) (1:1000, BD Biosciences) and rabbit polyclonal IgG anti GluR2/3 (1:50, Millipore). *Neurons quantification:*

To identify spiral ganglion cells, cochlea cryostat sections were stained with rabbit polyclonal anti-neurofilament 200 and mouse polyclonal anti-peripherin antibodies (respectively 1: 400, Sigma Aldrich and 1:800, Sigma).

IHCs auditory hairs :

To analyze IHCs auditory hairs damage cochlea cryostat sections were labeled with a mouse monoclonal γ -actin antibody (1:500, Sigma).

Apoptosis:

Apoptosis process was detected on cochlea cryostat sections with an anti-Bax antibody (1:100, Santa Cruz).

Autophagy:

_Autophagic process was detected on cochlea cryostat sections with a rabbit anti-LC3B-I and LC3B-II (1:500, Sigma). On apical turns, Beclin1 was detected with a mouse polyclonal anti-Beclin1 antibody (1:200, Santa Cruz).

Cullin3 was detected on apical turns with an rabbit polyclonal anti-Cullin3 antibody (1:200, Abcam).

Rhodamine-conjugated phalloidin (1:500, Sigma) was used to label actin. DNA was labeled by Hoescht dye.

Ultrastructural analysis

Decalcified cochlea samples were perfused with 2.5% glutaraldehyde with 0.1 M phosphate buffer and were used for morphological description by Transmission Electron Microscopy (TEM). Samples were postfixed for 1 hour with buffered 2% osmium tetroxide, dehydrated with increasing concentrations of ethanol, and embedded in EPON with an automatic microwave tissue processor (Leica AM AMW) for electron microscopy. Semithin sections were examined under a light microscope and ultrathin sections under the Hitachi H-7100 TEM (at CRIC, Montpellier, France).

For Scanning Electronic Microscopy (SEM), the decalcification of the periotic bone was stopped when the vestibular *scalae* and the *stria vascularis* of the cochlea were uncovered. Cochleas were then dissected, dehydrated with ethanol, critical point dried with CO2, and then coated with gold–palladium. Samples were observed by SEM for morphological description. Imaging was done on a Hitachi S-4000 (at CRIC, Montpellier, France).

Beclin1 co-immunoprecipitation

Mice cochlea were prepared in a lysis buffer (EDTA 1mM, NaCl 150mM, Tris 25mM, antiprotease (Sigma) 1X, antiphosphatase (Roche, PhosphoStop) 1X, Glycerol 5%, NP-40 1%, PMSF 2mM, NEM 10mM). Incubation with a mouse polyclonal anti-Beclin1 antibody (2µg) took place over-night at 4°C in incubation buffer (BSA20%, PMSF 200mM, DWBa – NaCl 100mM, Tris 20mM, EDTA 1mM, Triton 1%). On the following day co-immunoprocipitation was performed with the GE Healthcare Immunoprecipitation starter pack.

Western blot

Western blot experiments were conducted as previously described (Gras, Amilhon et al. 2008, Vigneault, Poirel et al. 2015). In brief, cochlea homogenates were performed in a lysis buffer (NaCl 1mM, Triton 0,25%, PMSF1mM, anti-protease 1X, EDTA 5mM, Tris 20mM). XXµg of protein (per well) were separated on PAGE-SDS TGX- Stain free gels (Biorad) and

transferred (Trans-Blot Turbo Transfer system, Biorad) onto nitrocellulose membranes (0.4 μ m pore size, Invitrogen). Nitrocellulose membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibody: VGLUT3 rabbit polyclonal antiserum (1:2000, Synaptic Systems), rabbit polyclonal antibody against the N-Terminal end of Bax protein (1:1000, Upstate Biotechnology), rabbit cleaved Caspase3 antibody (1:1000, Cell Signaling), rabbit polyclonal anti-LC3-I and LC3-II protein antibody (1:500, Sigma-Aldrich), mouse or rabbit polyclonal anti-Beclin1 antibody (1:200, Santa Cruz), rabbit polyclonal anti-Bcl2 antibody (1:500, Santa Cruz), Beclin1 phosphorylated on its 119 threonine was detected with a rabbit polyclonal anti-PhosphoThr119Becn1 antibody (1:200, Millipore), rabbit polyclonal anti-Culline3 antibody (1:1000, Abcam), rabbit monoclonal anti-DAPK1 antibody (1:1000, Abcam). Mouse monoclonal anti-GAPDH antibody (1:8000, Sigma-Aldrich) or mouse monoclonal anti-β-actin antibody (1:50000, Sigma-Aldrich) were used as loading controls. Western blot were revealed with IRDye 800 or -700 conjugated secondary antibodies (1:5000, Invitrogen). The membranes were scanned using an Odyssey infrared imaging system (LI-COR). Integrated intensity was measured for each band and averaged for 4-5 samples.

For co-immunoprecipitation of Beclin1 western blot was performed with a rabbit polyclonal anti-PhosphoThr119Becn1 antibody (1:200, Cell Signaling) detected by Enhance Chemolluminescence (ECL) with a goat peroxydase-conjugated anti-mouse or rabbit IgG light chain specific secondary antibody (1:10000, Jackson ImmunoResearch) and the XX ECL kit as recommended by the manufacturer. Positive controls for Caspase 3 and LC3-I/LC3-II were performed with 6-months-old SAMP8 mice cochlea, known to present an apoptosis activation (Menardo, Tang et al. 2012).

Yeast two Hydride screening

Yeast two-hybrid (Y2H) screening was performed on a mouse brain cDNA library using the mouse amino acid sequence of VGLUT3 between the position 190 and 240 as a bait. The assay was performed by Hybrigenics (Paris, France, <u>http://www.hybrigenics.com/</u>). Briefly, polymerase chain reaction (PCR) was performed to generate a N-LexA-bait-C fusion construct in the pB27 vector and a N-GAL4-bait-C fusion construct in the pB66 vector with the amino-acids 190-240 VGLUT3 wild type sequence as a bait.

Predicted Biological Score (PBS) is computed to assess the interaction reliability. This score represents the probability of an interaction to be specific: it is an e-value, primarily based on the comparison between the number of independent prey fragments found for an interaction and the chance of finding them at random (background noise). Rank A is the highest confidence rank.

Selected Interaction Domain (SID) is the amino-acid sequence shared by all prey fragments matching the same reference protein.

For additional experiments in yeast, the bait and the prey plasmids were generated by subcloning PCR fragments of the WT or mutant (A224V) VGLUT3 sequences (aa 190-240) and cullin 3 sequences, respectively, in the pB66 (bait) and pP6 (prey) vectors. The bait and prey constructs were transformed into the yeast strains CG1945 and YHGX13, respectively, using the lithium acetate method. These strains were cultured at 30°C for 3-5 days on yeast extract, peptone, dextrose plates lacking tryptophan (bait) or leucine (prey). Yeast mating was performed via overnight incubation of both yeast strains in 0.5 ml of extract/peptone/dextrose medium with shaking. The resulting mixture was then spotted on plates containing leucine and trypthophan deficient medium and was cultured for 3-5 days at 30°C. Specific interactions between the bait and prey constructs were verified by the growth of yeast colonies in leucine-, trypthophane-, and histidine-free medium after 3-5 days at 30°C or by a β -galactosidase assay.

Mutagenesis and construction of the VGLUT3-p.A224V mutant

For VGLUT3 point mutation, we used the QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, Agilent Technologies) and two complementary primers (sense 5'-GTGGAGTA-AGTGGGTGCCTCCCCTGGAG-3' and anti-sense 5'-CTCCAGGGGAGGCACCC-ACTTACTCCAC-3') by replacing the alanine 224 to valine. All clones were sequenced in both directions before use. The plasmids were purified using a Plasmid Midi Kit (Qiagen).

Statistical analysis

Data analysis was performed using Igor Pro software (Wave-Metrics). Values are expressed as Mean ± SEM and were compared by unpaired-s Student t test or ANOVA test using Statview 5 (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA).

RESULTS

VGLUT3-p.A224V mutation induces VGLUT3 under-expression in mice cochlea

In our western blot conditions, in the striatum of wild type (VGLUT3^{+/+}) VGLUT3 was detected as a single diffuse band migrating around 60kDA (**Fig 1**). This band almost totally disappeared in the striatum of VGLUT3 knock out mice (Gras, Amilhon et al. 2008). A band with similar characteristic was observed in the cochlea of WT and mutant mice.

We then compared expression levels of VGLUT3 by western blot analysis in the cochlea of VGLUT3^{+/+}, VGLUT3^{+/A224V}, VGLUT3^{A224V/A224V} and VGLUT3^{A2224V/-} littermates. As shown on Figure 1, aging induced a significant VGLUT3 expression -25% decrease between 2 and 6 months old VGLUT3^{+/+} mice cochlea (p value<0.0001, Student's unpaired t test). A significant VGLUT3 expression -43% and -48% decrease were observed in VGLUT3^{A224V/A224V} mice cochlea of respectively 2 and 6 months old compared to 2 months old VGLUT3^{+/+} mice cochlea (p value<0.0001, Student's unpaired t test). VGLUT3^{A224V/A224V} mice cochlea (p value<0.0001, Student's unpaired t test). VGLUT3^{A224V/A224V} mice presented a significant more severe VGLUT3 expression decrease in their cochlea (-57% at 2 months old and -76% at 6 months old) (p value<0.0001, Student's unpaired t test). Interestingly, heterozygous VGLUT3^{+/A224V} mice demonstrated a -18% decrease of VGLUT3 at 2 months whereas at 6 months a -35% reduction was observed. Therefore the reduction of VGLUT3 expression was relatively stable with age in the cochlea of homozygous p.A224V mice whereas it seemed an age-dependent decrease was observed in mice expressing only one mutated allele.

Nevertheless VGLUT3 expression decrease in mice cochlea is significantly influenced by aging and VGLUT3-p.A224V mutation (p value=0.0001, ANOVA test).

Vglut3^{A224V/A224V} mice show a progressive deafness, reminiscent of auditory neuropathy DFNA25, while normal ABR thresholds are restored in *Vglut3*^{A224V/-} mice We then assessed whether the VGLUT3-p.A224V mutation alters hearing in mice . Auditory function was first probed using auditory brainstem response up to 12-months-old mice (1, 2, 6 months (**Fig 2**, and 12 months **suppl Fig 1**). Heterozygous and homozygous mice harboring the p.A22AV mutation showed a drastic reduction in the ABR amplitude^{+/+} together with a progressive threshold shift (**Fig 2B-G**). In contrast, the distortion products of the oto-acoustic emissions (DPOAEs) were still comparable between the genotypes, indicating that intact outer hair cells (**Fig 3A**). Consistent with robust DPOAEs in the VGLUT3^{A224V/ A224V/ A224V} mice, both wild-type and mutant lines showed comparable cochlear microphonic responses, consistent with preservation of overall OHC activity (**Fig 3B-D**). These results suggest that the A224V mutation leads to a progressive auditory neuropathy, similar to DFNA25. Surprisingly, the mice carrying only one copy of the mutated VGLUT3 (VGLUT3^{A224V/-}) mice did not show any hearing impairment.

IHCs activity is altered in Vglut3^{A224V/A224V} mice

In order to determine whether the IHCs were affected in VGLUT3^{A224V/A224V} mice, we probed the hair cells receptor potential using electrocohleography. Compound action potential, reflecting the synchronous activity of the auditory nerve fibers, was strongly reduced, according to the ABR reduction (**Fig 4A-D**). In addition, a drastic reduction in the summating potential amplitude, indicating the IHC activity, was observed (**Fig 4H, J**). Furthermore, we observed the same number of neurons in the spiral ganglion of VGLUT3^{+/+} and VGLUT3^{A224V/A224V} mice (**Fig 4K**). Moreover, OHC activity is intact (**Fig 3**).

These results indicate a selective alteration of IHC function in the VGLUT3^{A224V/ A224V} mice.

Normal synaptic recycling in Vglut3^{A224V/A224V} mice

Next, we probed calcium-triggered exocytosis using patch-clamp recordings. No difference was observed in the amplitude or in the voltage activation of the calcium current between VGLUT3^{+/+} and VGLUT3^{A224V/A224V} mice (**Fig 5A-C**). In addition, membrane capacitance jumps evoked by calcium influx of different durations were comparable between the genotypes (**Figure 5C**). Furthermore, the number and the morphology of the ribbon synapses were not altered in one and two month-old VGLUT3^{A224V/A224V} mice (**Fig 5D-G**). 6 months old VGLUT3^{A224V/A224V} mice showed a decrease in apical synapses compared to wild type mice probably due to IHC loss (**suppl Fig 2A**). This decrease become significant at 12 months old (p value=0.002, Student's unpaired t test) (**suppl Fig 2B**). We also observed an IHC loss at this age (about 1/8 IHC loss) (**suppl Fig 2B**). Accordingly, we observed the same number of neurons in the spiral ganglion of VGLUT3^{+/+} and VGLUT3^{A224V/A224V} mice (**Fig 4K**). Taken together, these data exclude a primary defect at the IHCs ribbon synapse in the VGLUT3^{A224V/A224V} mice.

Because the IHC summating potential relies on potassium conductances (Corey & Hudspeth, 1983), the different potassium currents in IHCs were measured using patch-clamp. In IHCs, depolarizing steps elicit fast and slow outward potassium currents, carried by BK and delayed-rectifier channels, respectively (Kros & Crawford, 1990; Oliver *et al*, 2006; Marcotti *et al*, 2003). No difference in the amplitude or voltage activation of K⁺ currents was measured between IHCs of VGLUT3^{+/+} and VGLUT3^{A224V/A224V} mice (**Figure 6A-D**). In addition, IHCs from VGLUT3^{A224V/A224V} mice expressed the deactivating potassium current, carried by the

KCNQ4 potassium channel, which sets the resting membrane potential (Oliver *et al*, 2003; Marcotti *et al*, 2003). Consistently, the IHC resting membrane potential was similar between VGLUT3^{+/+} and VGLUT3^{A224V/A224V} mice (**Fig 6D**).

Therefore, a change in potassium conductance cannot account for the defective receptor potential in VGLUT3^{A224V/A224V} mice.

Morphological alteration of IHC in *Vglut3*^{A224V/A224V} mice

A reduction the receptor potential can either result from a defect in the number of hair cells or by a defect in the mechano-transducer apparatus (Corey & Hudspeth, 1983; Farris *et al*, 2006). Therefore, we examined the morphology of the hair cells apical pole using electron microscopy. In contrast to OHCs, the stereocilia bundle of the IHCs were distorted and fused in the VGLUT3^{A224V/A224V} (**Fig 7A**), suggesting that the IHCs are not able to translate the acoustic cues into neural message. Insertion of stereocilia into the cuticular plate of mutant IHC seemed profoundly impaired (**Fig 7B**). However, immunofluorescent labeling showed no γ -actin damage in the Organ of Corti of 6 months old mutant mice (**Fig 7C**).

Therefore, whereas their synapses appeared preserved, the apical pole of IHC in VGLUT3^{A224V/A224V} mice demonstrated major morphological alterations.

IHC demonstrate no apoptosis in Vglut3^{A224V/A224V} mice

In order to understand why IHC are impaired in VGLUT3^{A224V/A224V} mice, we then analyzed the death pathway in IHCs of VGLUT3^{A224V/A224V} mice.

For apoptosis intrinsic pathway, Bax labeling was investigated on transverse cryostat sections of the organ of Corti and its expression level was investigated by western blot quantification from VGLUT3^{+/+}, VGLUT3^{+/A224V} and VGLUT3^{A224V/A224V} mice (2 and 6 months old). The Bax labeling by immunofluorescence (**Fig 8A**) or western blot quantification (**Fig 8B**) were similar in all three genotypes at 2 and 6 months old. Similarly, Caspase 3 was not activated in any genotypes when evaluated by western blot (**Fig 8C**).

Therefore, data collected by immunohistochemistry and western blot did not detect any apoptosis activation at 2 or 6 months old in VGLUT3^{A224V/A224V} mice.

Beclin1-dependent autophagy is detected in Vglut3^{A224V/A224V} mice cochlea

Autophagy has been implicated in SAMP8 presbycusis (Menardo, Tang et al. 2012). We thus analyzed autophagy in the cochlea of VGLUT3^{A224V/A224V} mice.

First, we observed with transmission electron microscopy large double membrane vesicles in the cytoplasm of IHCs of VGLUT3^{A224V/A224V} mice, suggesting an autophagic process (**Fig 9A**). In order to confirm this observation, the expression level of autophagic proteins was investigated. LC3 labeling was estimated by immunofluorescence on transverse cryostat sections of the Organ of Corti as well by western blot on cochlear extracts. No differences were found between VGLUT3^{+/+}, VGLUT3^{+/A224V} and VGLUT3^{A224V/A224V} mice (**Fig 9B-C**) suggesting that LC3 protein was not activated in mice expressing the mutated allele of VGLUT3.

We then examined the expression of Beclin 1 on Organ of Corti transverse cryostat sections and freshly dissected apical cochlear turns labeled by immunofluorescence. Surprisingly, in 2 months old VGLUT3^{A224V/A224V} mice, Beclin1 was overexpressed in IHCs apical region near stereocilia (**Fig 9D**). Beclin 1 expression was quantified by western blot on cochlear extracts. As shown on **Figure 9E**, Beclin1 was significantly more abundant in the cochlea of 1 and 2 months old VGLUT3^{A224/A224V} mice compared to VGLUT3^{+/+} mice (respectively p value=0.03 and 0.01, Student's unpaired t test). This difference was no more detected at 6 months old (p value=0.25, Student's unpaired t test).

When Beclin1 is dissociated from Bcl2, autophagy is activated. To determine whether Beclin1 dependent autophagy pathway was activated in the cochlea of mutant mice cochlea, we analyzed Beclin1 interaction with Bcl2 by co-immunoprecipitation (for co-immunoprecipitation controls, see **suppl Fig 3**). As can be seen on **Figure 9F**, the interaction between Bcl2 and Beclin1 was significantly decreased in the cochlea of VGLUT3^{A224V/A224V} mice compared to VGLUT3^{+/+} mice at 2 and 6 months old (respectively p value=0.04 and 0.03, Student's unpaired t test). This significant Beclin1 and Bcl2 dissociation was not detected at 1 month old (p value=0.63, Student's unpaired t test).

These results indicated that Beclin1 dependent autophagy is early activated in IHCs of VGLUT3^{A224V/A224V} mice.

VGLUT3 could influence Beclin1 dependent autophagy via the cullin3 pathway

In order to establish a link between VGLUT3 and Beclin1 dependent autophagy, we searched VGLUT3 putative interactants by Y2H screening. This analysis revealed five putative interactants (Actg1, Bicd2, Cul3, Dnahc11 and Rbbp9) (see **suppl Table 1** for details). Our short bait is between the 190 and 240 amino acids of the VGLUT3 protein sequence, while KWAPPLER motif is between the 222 and 229 amino acids of the VGLUT3 protein sequence. It is interesting to note that our short bait containing the VGLUT3 KWAPPLER motif was sufficient to identify these interactants

Among them Cullin3 (Cul3) had a PBS A for 7 clones (**suppl Table 1**). SIDs analysis revealed a putative interaction between VGLUT3 and the N-terminal part of Cullin3, between the 50 and 217 amino acids of the Cullin3 protein sequence (**Fig 10A**). This Cullin3 region has 12 Helix Pi, 2 hydrogen-bonded turn and one beta strand and is composed of Cullin Repeat domains which anchor the cognate adaptator proteins. This putative interaction was confirmed with yeast constructs for both 139-cullin3 and 175-cullin3 clones, and wild type and p.A224V mutated VGLUT3 (**Fig 10B**).

We investigated by immunohistochemistry the expression of Cullin3 in IHCs and confirmed its presence in their cytoplasm. Cullin3 was found in IHCs of all 3 genotypes (**Fig 11A**). We then analyzed the cullin3 pathway : Beclin1 and Bcl2 dissociation is facilitated by Beclin1 phosphorylation on its Threonine 119 by DAPK1. DAPK1 is ubiquitinated by Cullin3, loading to its degradation (pathway described in **fig 11B**). Cullin3, DAPK1 and Phosphorylated-Thr119-Beclin1 were quantified by western blot in mice cochlea. We observed a constant trend of increased amounts of Cullin3 or DAPK1 in VGLUT3^{A224V/A224V} mice relatively to VGLUT3^{+/+} mice. However none of them reached significantly (**Fig. 11C-D**). The quantification of Beclin1 phosphorylated on its threonine 119 by western blot on native cochlea or Beclin1 immunoprecipitation product showed a significative phosphorylation increase in VGLUT3^{A224V/A224V} mice from 6 months for native cochlea (p value<0.001, Student's unpaired t test) and from 2 months old for Beclin1 immunoprecipitation product (p value=0.02 and 0.002 for respectively 2 months old and 6 months old, Student's unpaired t test) (**Fig. 11E-F**).

DISCUSSION

VGLUT3, the atypical type 3 vesicular glutamate transporter is as a key component of the IHC synapse since its genetic ablation results in profound deafness because of the lack of glutamate release (Ruel, Emery et al. 2008, Seal, Akil et al. 2008). Ruel et al then provided the first evidence that a mutation of SLC17A8 could be directly responsible for human sensorineural deafness, DFNA25 (Ruel, Emery et al. 2008). The fact that VGLUT3^{A224V/A224V} mice present a progressive deafness strongly establishes for the first time that the VGLUT3-p.A211V mutation is at the origin of DFNA25.

Although VGLUT3^{-/-} mice exhibit no response to sound, electrical stimulation applied to the round-window membrane elicits clear auditory brainstem responses. In addition, IHC presynaptic function and morphology are intact up to the stage of transmitter release after vesicle fusion in VGLUT3^{-/-} mice (Ruel, Emery et al. 2008). Similarly, VGLUT3^{A224V/A224V} mice present neither an OHCs nor a spiral ganglion neurons impairment: only IHCs are affected by the mutation. However, in IHCs of VGLUT3^{A224V/A224V} mice calcium currents, synaptic recycling, and potassium currents are normal. Therefore, IHCs synapses are not affected by the VGLUT3-p.A211V mutation. However, scanning electron microscopy shows drastic IHCs stereocilia impairment in VGLUT3^{A224V/A224V} mice followed by IHCs death.

IHC stereocilia are found emerging from the apical surface of IHC (Hudspeth 1982). Actin is the principal component of cuticular plate inside which stereocilia are vertically inserted. Cuticular plate components seem to be important for mechanical adaptation after stereocilia deflection, but also vesicular transport (Kachar, Battaglia et al. 1997). IHCs hairs bundle impairments are described in some non syndromic autosomal dominant hearing loss. For example, DFNA20/26 is due to γ -actin mutations (ACTG1) (van Wijk, Krieger et al. 2003); (Zhu, Yang et al. 2003), leading to IHC cytoskeleton impairment (Morin, Bryan et al. 2009).

In VGLUT3^{A224V/A224V} mice we observed abnormal insertion of stereocilia into the cuticular plate and no obvious γ -actin impairment. However the γ -actin dynamic function was not explored in VGLUT3^{A224V/A224V} mice. The elucidation of a link between VGLUT3-p.A211V mutation and cuticular plate remains at present unclear and will require future investigations.

Neither Bax nor caspase 3 were overexpressed or activated in the cochlea of VGLUT3^{A224V/A224V} mice. Therefore, intrinsic or extrinsic apoptotic pathways are not activated. Hence that auditory loss and morphological modification observed in the cochlea of VGLUT3^{A224V/A224V} mice are not related to apoptotic pathways activation.

There is a complex synergy between apoptosis and a cellular survey pathway, namely autophagy. Autophagy primary function is to permit various cellular substrates degradation

128

(Chen and Yu 2013). Autophagy decreases during aging and even stimulates longevity. Among the three subtypes of autophagy, macro-autophagy is characterized by double membrane vacuoles forming named autophagosome (Wirawan, Vanden Berghe et al. 2012). LC3 and Beclin1 are two proteins playing a major role in autophagy. Beclin1 possess a BH3-domain that can bind to Bcl-2. The binding of Bcl-2 to Beclin1 inhibits autophagy (Chang, Nguyen et al. 2010). In contrast, cellular stress induces Bcl-2 and Beclin1 disconnexion and allows autophagy continuation (Marquez and Xu 2012). Bcl-2/Beclin1 complex activates DAPK1. This latter phosphorylates Beclin1 on its Threonin 119, favoring autophagic nucleation (Feng, Huang et al. 2007); (Oberstein, Jeffrey et al. 2007); (Zalckvar, Berissi et al. 2009).

We herein showed that Beclin1 is expressed in mice IHCs from the apical area and pillar. In VGLUT3^{A224V/A224V} mice cochlea Beclin1 expression is increased, whereas LC3 is neither overexpressed nor activated.

The association between Beclin1 and Bcl-2 seems to be diminished in the cochlea of VGLUT3^{A224V/A224V} mice. In addition, the phosphorylation of Beclin1 Threonine 119 is increased. Those two results support the notion that Beclin1 autophagy is over-activated in VGLUT3^{A224V/A224V} mice cochlea.

Shen and Codogno developed a model to evaluate whether a cell dies by autophagic process (Shen and Codogno 2011). Three conditions have to be met: (i) cell death occurs without the involvement of apoptosis; (ii) there is an increase of autophagic flux in the dying cells; and (iii) suppression of autophagy via both pharmacological inhibitors and genetic approaches is able to rescue or prevent cell death. We confirmed the first criterion: IHCs do not die from apoptosis. Second Beclin1 is over-expressed and over-activated. Thirdly VGLUT3 expression is decrease by the p.A211V mutation in mice cochlea. VGLUT3^{A224V/-} mice expressing only one copy of the mutated allele have a lowest VGLUT3 protein expression level compared to VGLUT3^{A224V/A224V} mice. This genotype appears to operate like a rescue, suggesting that decreasing VGLUT3-p.A224V expression protects from auditory impairment and probably cell death. The three criteria proposed by Shen and Codogno are completed. Moreover we only observed a Beclin1 increase, without any LC3 over-expression or activation. Yet to our knowledge LC3 is not involved in autophagic death, contrary to Beclin1. So the Beclin1 activation is in favour of an IHCs autophagic death. All these results support the hypothesis that DFNA25 and the VGLUT3 p.A211V mutation lead to progressive auditory loss by inducing autophagic death of IHCs.

The link between Beclin1 and VGLUT3 remains to be established. To understand the direct or indirect function of VGLUT3 in autophagic cell death, we explored putative VGLUT3 interactants by Y2H screen. A strong interaction between VGLUT3 and cullin3 was detected into a regulation domain of cullin3. Immunofluorescence labelling confirmed cullin3 expression in IHCs.

Subsequently, we analysed the cullin3 pathway in *VGLUT3*^{A224V/A224V} mice cochlea. Cullin3 takes place into the KLHL20-Cul3-ROC1 E3 ligase complex, which mediates DAPK1 ubiquitination, thereby inducing the proteasomal degradation of DAPK1 (Lee, Yuan et al. 2010). As above-described DAPK1 phosphorylates Beclin1 Threonine 119, resulting in autophagy activation. Cullin3 expression is comparable in the cochlea of VGLUT^{+/+}, VGLUT3^{+/A224V} and VGLUT3^{A224V/A224V} mice. DAPK1 is overexpressed in VGLUT3^{A224V/A224V} mice cochlea and seems to be activated. In fact, in the mutant mice, Beclin1 is over phosphorylated on its Threonine 119 and hence activated. These results could underpin the hypothesis of a Cullin3 pathway implication in physiopathology of p.A211V mutation. More investigations will be necessary to establish this point, in particular the in vivo interaction between VGLUT3 and Cullin3, and the ubiquitination level of DAPK1 by Cullin3 in VGLUT3^{A224V/A224V} mice cochlea.

Cullin3 is a novel target in diverse pathologies, including cancer and neurodegenerative diseases (Anderica-Romero, Gonzalez-Herrera et al. 2013). Cullin3 activator (as Nedd8) are available and could be tested to restore audition in aging *VGLUT3*^{A224V/A224V} mice (Boh, Ng et al. 2011), in order to confirm the third argument for autophagic death.

What is the function of VGLUT3 that is impaired by the p.A224V mutation that leads to IHCs autophagic death? We have detected that this mutation induces an early decrease of VGLUT3 expression both in the brain and in the cochlea {Ramet, Submitted #12}. As described herein and in the brain, presynaptic functions of VGLUT3-p.A224V as a glutamate vesicular carrier are unaltered by the mutation {Ramet, Submitted #12}.

In addition to glutamate vesicular packaging, additional roles for the VGLUTs have recently been suggested. For example, 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 (Herman, Ackermann et al. 2014); (Herzog, Nadrigny et al. 2011); (Siksou, Silm et al. 2013); (Weston, Nehring et al. 2011).

Nevertheless, p.A211V mutation did not affect exocytosis in IHCs for short or long duration of stimulation in patch clamp. This suggests that the mutation does not affect the fast and sustained glutamate release. The mobility of synaptic vesicles in the IHCs seems to be intact, since otherwise the mobilization the reserve pool would be impaired in VGLUT3^{A224V/A224V} mice IHCs.

Taken together, our results indicate that the p.A211V mutation could impact on another -not identified functions of VGLUTs. These results also suggest that VGLUT3 play an indirect role

in autophagy activation and that this process could be at the origin of the VGLUT3^{A224V/A224V} mice deafness. Interestingly the KWAPPLER motif that is altered by the p.A211V mutation is also present in VGLUT1 and VGLUT2; therefore suggestion these 2 subtypes could have similar properties.

VGLUT3 is under expressed in VGLUT3^{A224V/A224V} mice cochlea. This under expression could be decisive in the pathophysiological mechanism. Moreover, we can propose two hypothesis for this "pro and mortiferous autophagic" function:

- i) the p.A211V mutation confers a new function to VGLUT3, so that it becomes able to activate an IHCs autophagic death ;

- ii) VGLUT3 has another function in addition to its vesicular transporter function. This function is linked to indirect autophagic pathway and is over activated by the p.A211V mutation.

In order to know if this "autophagic function" of VGLUT3 is due to new properties induced by the A211V mutation or if it is native, we analyzed ABR recordings in VGLUT3^{A224V/-} mice. These mice possess only one mutated allelic copy of VGLUT3, and nothing else. So they have less VGLUT3 than *Vglut3*^{A224V/A224V} mice. Surprisingly, we did not observed any deafness at 2 and 6 months during ABR recordings. ABR thresholds and wave I ABR amplitude are similar in wild type and *Vglut3*^{-/A224V} mice. This supports the hypothesis of a wild indirect autophagic function of VGLUT3, which have beneficial effect for IHCs when it is not exceed a given threshold, explaining that

i) wild type mice present intact auditory phenotype, like VGLUT3^{A224V/-} mice ;

ii) heterozygous mice (VGLUT3^{+/A224V}) mice show an intermediate altered phenotype ;

iii) homozygous mutated mice (VGLUT3^{A224V/A224V}) mice present the more severe auditory phenotype impairment. Thus, an over activity of this autophagic function could be induced by the p.A211V mutation. It would be useful to study autophagy pattern in IHCs of *Vglut3^{-/A224V}* mice in order to confirm this hypothesis, and to test autophagy inhibitors in cochlea of *Vglut3^{A224V/A224V}* mice.

It should be noted that wave 1 ABR latencies are increased in VGLUT3^{A224V/-} mice due to glutamate release decrease, as described in brain {Ramet, Submitted #12}, whereas the connection between VGLUT3 and autophagy has not been observed in the brain of VGLUT3^{A224V/A224V} mice. Therefore suggesting that this pathway depends specifically a partner of VGLUT3 that is expressed in IHCs but not in the neurons from the brain. Or autophagy over activation is offset in central nervous system but nor in IHC which have to response to constant stimuli and are in fact more vulnerable.

Our study provides the first molecular and cellular explanation for DFNA25. It opens the way for a deeper understanding of other type of DFNA as well as to innovative treatment of the presbycusis.

CONCLUSION

Here we report a new putative function of VGLUT3. Furthermore, to our knowledge, this is the first time that an autophagic death process is involved in a human disease.

If VGLUT3 does not seem to play a key role in autophagy under normal conditions, aging associated to VGLUT3 KWAPPLER domain mutation could induce homeostasis impairment and autophagic death only in IHCs. The p.A211V mutation affects the KWAPPLER domain, which is strongly conserved in VGLUT3 across species and in all human VGLUT subtypes. Autophagy is also a strongly conserved cellular process during evolution (Chen and Yu 2013); (Ohsumi 2014). So we could have discovered a VGLUT3 "fossil function", who attracts attention with it only under extreme conditions and in specific cellular subtype.

REFERENCES

Anderica-Romero, A. C., I. G. Gonzalez-Herrera, A. Santamaria and J. Pedraza-Chaverri (2013). "Cullin 3 as a novel target in diverse pathologies." <u>Redox Biol</u> **1**: 366-372.

Boh, B. K., M. Y. Ng, Y. C. Leck, B. Shaw, J. Long, G. W. Sun, Y. H. Gan, M. S. Searle, R. Layfield and T. Hagen (2011). "Inhibition of cullin RING ligases by cycle inhibiting factor: evidence for interference with Nedd8-induced conformational control." <u>J Mol Biol</u> **413**(2): 430-437.

Chang, N. C., M. Nguyen, M. Germain and G. C. Shore (2010). "Antagonism of Beclin 1-dependent autophagy by BCL-2 at the endoplasmic reticulum requires NAF-1." <u>EMBO J</u> **29**(3): 606-618.

Chen, Y. and L. Yu (2013). "Autophagic lysosome reformation." <u>Exp Cell Res</u> **319**(2): 142-146.

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**(4): 273-281.

El Mestikawy, S., A. Wallen-Mackenzie, G. M. Fortin, L. Descarries and L. E. Trudeau (2011). "From glutamate co-release to vesicular synergy: vesicular glutamate transporters." <u>Nat Rev Neurosci</u> **12**(4): 204-216.

Feng, W., S. Huang, H. Wu and M. Zhang (2007). "Molecular basis of Bcl-xL's target recognition versatility revealed by the structure of Bcl-xL in complex with the BH3 domain of Beclin-1." J Mol Biol **372**(1): 223-235.

Fraser, G. R. (1964). "Profound Childhood Deafness." J Med Genet 1(2): 118-151.

Gras, C., B. Amilhon, E. M. Lepicard, O. Poirel, J. Vinatier, M. Herbin, S. Dumas, E. T. Tzavara, M. R. Wade, G. G. Nomikos, N. Hanoun, F. Saurini, M. L. Kemel, B. Gasnier, B. Giros and S. El Mestikawy (2008). "The vesicular glutamate transporter VGLUT3 synergizes striatal acetylcholine tone." Nat Neurosci **11**(3): 292-300.

Gras, C., E. Herzog, G. C. Bellenchi, V. Bernard, P. Ravassard, M. Pohl, B. Gasnier, B. Giros and S. El Mestikawy (2002). "A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotoninergic neurons." <u>J Neurosci</u> **22**(13): 5442-5451.

Greene, C. C., P. M. McMillan, S. E. Barker, P. Kurnool, M. I. Lomax, M. Burmeister and M. M. Lesperance (2001). "DFNA25, a novel locus for dominant nonsyndromic hereditary hearing impairment, maps to 12q21-24." <u>Am J Hum Genet</u> **68**(1): 254-260.

Herman, M. A., F. Ackermann, T. Trimbuch and C. Rosenmund (2014). "Vesicular glutamate transporter expression level affects synaptic vesicle release probability at hippocampal synapses in culture." <u>J Neurosci</u> **34**(35): 11781-11791.

Herzog, E., F. Nadrigny, K. Silm, C. Biesemann, I. Helling, T. Bersot, H. Steffens, R. Schwartzmann, U. V. Nagerl, S. El Mestikawy, J. Rhee, F. Kirchhoff and N. Brose (2011). "In vivo imaging of intersynaptic vesicle exchange using VGLUT1 Venus knock-in mice." J Neurosci **31**(43): 15544-15559. Hudspeth, A. J. (1982). "Extracellular current flow and the site of transduction by vertebrate hair cells." J Neurosci 2(1): 1-10.

Kachar, B., A. Battaglia and J. Fex (1997). "Compartmentalized vesicular traffic around the hair cell cuticular plate." <u>Hear Res</u> **107**(1-2): 102-112.

Lee, Y. R., W. C. Yuan, H. C. Ho, C. H. Chen, H. M. Shih and R. H. Chen (2010). "The Cullin 3 substrate adaptor KLHL20 mediates DAPK ubiquitination to control interferon responses." <u>EMBO J</u> **29**(10): 1748-1761.

Marquez, R. T. and L. Xu (2012). "Bcl-2:Beclin 1 complex: multiple, mechanisms regulating autophagy/apoptosis toggle switch." <u>Am J Cancer Res</u> **2**(2): 214-221.

Menardo, J., Y. Tang, S. Ladrech, M. Lenoir, F. Casas, C. Michel, J. Bourien, J. Ruel, G. Rebillard, T. Maurice, J. L. Puel and J. Wang (2012). "Oxidative stress, inflammation, and autophagic stress as the key mechanisms of premature age-related hearing loss in SAMP8 mouse Cochlea." <u>Antioxid Redox Signal</u> **16**(3): 263-274.

Morin, M., K. E. Bryan, F. Mayo-Merino, R. Goodyear, A. Mencia, S. Modamio-Hoybjor, I. del Castillo, J. M. Cabalka, G. Richardson, F. Moreno, P. A. Rubenstein and M. A. Moreno-Pelayo (2009). "In vivo and in vitro effects of two novel gamma-actin (ACTG1) mutations that cause DFNA20/26 hearing impairment." <u>Hum Mol Genet</u> **18**(16): 3075-3089.

Oberstein, A., P. D. Jeffrey and Y. Shi (2007). "Crystal structure of the Bcl-XL-Beclin 1 peptide complex: Beclin 1 is a novel BH3-only protein." <u>J Biol Chem</u> **282**(17): 13123-13132.

Ohsumi, Y. (2014). "Historical landmarks of autophagy research." Cell Res 24(1): 9-23.

Qi, J., S. Zhang, H. L. Wang, H. Wang, J. de Jesus Aceves Buendia, A. F. Hoffman, C. R. Lupica, R. P. Seal and M. Morales (2014). "A glutamatergic reward input from the dorsal raphe to ventral tegmental area dopamine neurons." <u>Nat Commun</u> **5**: 5390.

Ruel, J., S. Emery, R. Nouvian, T. Bersot, B. Amilhon, J. M. Van Rybroek, G. Rebillard, M. Lenoir, M. Eybalin, B. Delprat, T. A. Sivakumaran, B. Giros, S. El Mestikawy, T. Moser, R. J. Smith, M. M. Lesperance and J. L. Puel (2008). "Impairment of SLC17A8 encoding vesicular glutamate transporter-3, VGLUT3, underlies nonsyndromic deafness DFNA25 and inner hair cell dysfunction in null mice." <u>Am J Hum Genet</u> **83**(2): 278-292.

Sakae, D. Y., F. Marti, S. Lecca, F. Vorspan, E. Martin-Garcia, L. J. Morel, A. Henrion, J. Gutierrez-Cuesta, A. Besnard, N. Heck, E. Herzog, S. Bolte, V. F. Prado, M. A. Prado, F. Bellivier, C. B. Eap, S. Crettol, P. Vanhoutte, J. Caboche, A. Gratton, L. Moquin, B. Giros, R. Maldonado, S. Daumas, M. Mameli, S. Jamain and S. El Mestikawy (2015). "The absence of VGLUT3 predisposes to cocaine abuse by increasing dopamine and glutamate signaling in the nucleus accumbens." <u>Mol Psychiatry</u> **20**(11): 1448-1459.

Schafer, M. K., H. Varoqui, N. Defamie, E. Weihe and J. D. Erickson (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**(52): 50734-50748.

Seal, R. P., O. Akil, E. Yi, C. M. Weber, L. Grant, J. Yoo, A. Clause, K. Kandler, J. L. Noebels, E. Glowatzki, L. R. Lustig and R. H. Edwards (2008). "Sensorineural deafness and seizures in mice lacking vesicular glutamate transporter 3." <u>Neuron</u> **57**(2): 263-275.

Sendin, G., A. V. Bulankina, D. Riedel and T. Moser (2007). "Maturation of ribbon synapses in hair cells is driven by thyroid hormone." <u>J Neurosci</u> **27**(12): 3163-3173.

Shen, H. M. and P. Codogno (2011). "Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species?" Autophagy **7**(5): 457-465.

Siksou, L., K. Silm, C. Biesemann, R. B. Nehring, S. M. Wojcik, A. Triller, S. El Mestikawy, S. Marty and E. Herzog (2013). "A role for vesicular glutamate transporter 1 in synaptic vesicle clustering and mobility." Eur J Neurosci **37**(10): 1631-1642.

Takamori, S., P. Malherbe, C. Broger and R. Jahn (2002). "Molecular cloning and functional characterization of human vesicular glutamate transporter 3." <u>EMBO Rep</u> **3**(8): 798-803.

van Wijk, E., E. Krieger, M. H. Kemperman, E. M. De Leenheer, P. L. Huygen, C. W. Cremers, F. P. Cremers and H. Kremer (2003). "A mutation in the gamma actin 1 (ACTG1) gene causes autosomal dominant hearing loss (DFNA20/26)." <u>J Med Genet</u> **40**(12): 879-884.

Vigneault, E., O. Poirel, M. Riad, J. Prud'homme, S. Dumas, G. Turecki, C. Fasano, N. Mechawar and S. El Mestikawy (2015). "Distribution of vesicular glutamate transporters in the human brain." <u>Front Neuroanat</u> **9**: 23.

Weston, M. C., R. B. Nehring, S. M. Wojcik and C. Rosenmund (2011). "Interplay between VGLUT isoforms and endophilin A1 regulates neurotransmitter release and short-term plasticity." <u>Neuron</u> **69**(6): 1147-1159.

Wirawan, E., T. Vanden Berghe, S. Lippens, P. Agostinis and P. Vandenabeele (2012). "Autophagy: for better or for worse." <u>Cell Res</u> **22**(1): 43-61.

Zalckvar, E., H. Berissi, M. Eisenstein and A. Kimchi (2009). "Phosphorylation of Beclin 1 by DAP-kinase promotes autophagy by weakening its interactions with Bcl-2 and Bcl-XL." Autophagy **5**(5): 720-722.

Zhu, M., T. Yang, S. Wei, A. T. DeWan, R. J. Morell, J. L. Elfenbein, R. A. Fisher, S. M. Leal, R. J. Smith and K. H. Friderici (2003). "Mutations in the gamma-actin gene (ACTG1) are associated with dominant progressive deafness (DFNA20/26)." <u>Am J Hum Genet</u> **73**(5): 1082-1091.

Figure 1



VGLUT3 protein expression in mice cochlea evaluated by western blot.

Positive controls are Vglut3^{+/+} mice striata. Negative controls are Vglut3^{-/-} mice cochlea. VGLUT3 protein expression decrease is significantly influenced by aging and genotypes (Anova test, p value = 0,0001). At 2 or 6 months old, a significant VGLUT3 protein expression level difference is observed between genotypes (Student's unpaired t test, p value<0,0001). Values shown are mean +/- SEM.







ABR recordings.

Example of ABR recordings for 16kHz frequency stimulation at 6 months old, for Vglut3^{+/+} mice (blue), Vglut3^{+/A224V} mice (green), Vglut3^{A224V/A224V} mice (red) and Vglut3^{A224V/-} mice (yellow) (A). Frequency (in kHz, from 2 to 32 kHz) dependence of ABR threshold (in dB SPL) at 1 month old (B), 2 months old (C) and 6 months old (D) for all genotypes (Vglut3^{+/+} (respectively n=11, 8 and 11), Vglut3^{+/A224V} (respectively n= 5, 10 and 11), Vglut3^{A224V/A224V} (respectively n= 8, 8 and 10), and Vglut3^{A224V/-} (respectively n=0, 10 and 10)). Vglut3^{A224V/A224V} mice ABR thresholds are early from 2 months old increased, compared to Vglut3^{+/+} mice (Anova test, p value = 0,001). Stimulation intensity (in dB SPL) dependence of ABR wave 1 amplitude (in μ V) for a 16 kHz frequency stimulation at 1 month old (E), 2 months old (F) and 6 months old decreased, compared to Vglut3^{+/+} mice (Anova test, p value = 0,0001). Stimulation intensity (in dB SPL) dependence (in ms) for a 16 kHz frequency stimulation intensity (in ms) for a 16 kHz frequency stimulation intensity (in ms) for a 16 kHz frequency stimulation intensity (in ms) for a 16 kHz frequency stimulation intensity (in ms) for a 16 kHz frequency stimulation intensity (in ms) for a 16 kHz frequency stimulation intensity (in ms) for a 16 kHz frequency stimulation intensity (in ms) for a 16 kHz frequency stimulation intensity (in dB SPL) dependence of ABR wave 1 lantency (in ms) for a 16 kHz frequency stimulation at 1 month old (H), 2 months old (I) and 6 months old (J). Vglut3^{A224V/A224V} mice wave 1 ABR latency is not significantly increased compared to Vglut3^{+/+} mice (Anova test, p value = 0,001). Vglut3^{A224V/A224V} mice wave 1 ABR latency is significantly early from 2 months old increased compared to all other genotypes (Anova test, p value = 0,001).





OHC function evaluation by DPAOE and CAP recordings.

DPOAE at 6 months old (A) : stimulation f2 frequency (in kHz) dependence of $2f1-f_2$ amplitude level (in dB SPL) for Vglut3^{+/+} (n=11), Vglut3^{+/A224V} (n=11) and Vglut3^{A224V/A224V} (n=10) mice. No difference was observed between genotypes (Anova test, p value = 0,17). MC amplitude (in μ V) measured during CAP recordings for Vglut3^{+/+} (n=8) and Vglut3^{A224V/A224V} (n=9) mice at 1 month old were comparable (Student's unpaired t test, p value = 0,21) (B). MC amplitude (in μ V) for Vglut3^{+/+} (n=9) and Vglut3^{A224V/A224V} (n=8) mice at 2 months old were not significantly different (Student's unpaired t test, p value = 0,16) (C). MC amplitude (in μ V) for Vglut3^{+/+} (n=7) and Vglut3^{A224V/A224V} (n=5) mice at 6 months old were comparable (Student's unpaired t test, p value = 0,17) (D). Values shown are means +/-SEM.





IHCs impairment explored by CAP recordings and spiral ganglion neurons immunollabelling.

Example of CAP recordings average for Vglut3^{+/+} (blue) and Vglut3^{A224V/A244V} (red) mice at 1 month old (A). CAP amplitude (in μ V) is significantly decreased at 1 month old in Vglut3^{A224V/A224V} mice (p value = 0,002) (B) and at 2 months old (p value = 0,0002) (C). This difference is no more significant at 6 months old (p value = 0,13) (D). CAP latency (in ms) is not significantly different between Vglut3^{+/+} and Vglut3^{A224V/A224V} mica at 1 month old (p value = 0,06) (E), 2 months old (p value = 0,13) (F), and 6 months old (p value = 0,48) (G). SP amplitude (in μ V) is significantly decreased in Vglut3^{A224V/A224V} mice at 1 month old (p value = 0,04) (H) and 2 months old (p value = 0,02) (I) compared to Vglut3^{+/+} mice. This difference disappears at 6 months old (p value = 0,11) (J). No differences are observed by immunofluorescence in spiral ganglion neurons between Vglut3^{+/+} and Vglut3^{A224V/A224V} mice (p value = 0,91). Neurofilament is labelled in pink, peripherin in red.

CAP : compound action potential ; SP : summation potential. NF : neurofilament. Values shown are means +/- SEM. Student's unpaired t test.





Synapses function and morphology explored by patch clamp, immunofluorescence and transmission electron microscopy.

We did not observe any difference for calcium currents means (Ica²⁺) and membrane capacity means (Cm) between Vglut3^{+/+} (blue) (n=38) and Vglut3^{A224V/A224V} (red) IHC (n=30). Examples of membrane capacity jump in response to an calcium influx induced by a for 20ms -27mV potential jump from a -87mV holding potential (A). No difference is observed
between Vglut3^{+/+} and Vglut3^{A224V/A224V} IHC for intensity (V in mV) dependence of calcium currents potential (I in pA) curves. Calcium currents are induced by a for 10ms potential jump (between -87 and 43mV) from a -87mV holding potential (B). We did not observed any difference for depolarisation duration (in ms) dependence of membrane capacity jump amplitude (Δ Cm in fF) and calcium currents charge (QCa²⁺ in pC) between Vglut3^{+/+} and Vglut3^{A224V/A224V} IHC. Exocytosis was induced by a -27mV potential jump from a -87mV holding potential (C). Confocal microscopy observation of Vglut3^{+/+} and Vglut3^{A224V/A224V} IHC immunofluorescence : CTBP2 (green) is the presynaptic component, GluR2/3 (red) is the postsynaptic component, nucleus is labelled by Hoescht (blue). The ribbon synapses number is comparable between Vglut3^{+/+} and Vglut3^{A224V/A224V} IHC at 1 month old (respectively n= 43 and 50, p value = 0,5) (D) and at 2 months old (respectively n= 42 and 33, p value = 0,86) (E). Values shown are means +/- SEM. Student's unpaired t test. IHC synapses morphology observed using TEM at 6 months old did not differ between Vglut3^{+/+} (F) and Vglut3^{A224V/A224V} (G) mice.





IHC potassium currents explored by patch clamp.

Example of 1 month old Vglut3^{+/+} (blue, n=7) and Vglut3^{A224V/A224V} (red, n=9) IHC fast potassium currents (I(nA)). Potassium currents are induced by a potential jump (between - 124 and 36mV) from a -74mV holding potential (A). We did not observed any difference for potassium currents potentials (V(mV)) dependence of potassium currents intensity (I(nA)) between 1 month old Vglut3^{+/+} and Vglut3^{A224V/A224V} IHC. Potassium currents recordings 375 microseconds after potential jumps beginning and during 250 microseconds reflect fast potassium currents amplitude (early average). Potassium currents recordings 34 milliseconds after jumps beginning and during 50 milliseconds reflect late and fast potassium currents amplitude (late average) (B). Example of KCNQ4 channel potassium currents deactivation (I(pA)) in response to a from -64mV to -154 mV potential jump. Current decrease in response to hyperpolarizing potential jump reflects the channel close (deactivation) (C). 1 month old IHC membrane potential average (in mV) recorded under voltage clamp (I_{inj}=0pA) does not differ between Vglut3^{+/+} and Vglut3^{A224V/A224V} mice (Student's unpaired t test, p value =). Values shown are means +/- SEM (D).



IHC stereocilia explored by scanning electron microscopy, transmission electron microscopy and immunofluorescence.

IHC stereocilia are merged and impaired in 6 months old Vglut3^{A224V/A224V} mice compared to Vglut3^{+/+} mice, whereas OHC seems to be intact at this age in both genotypes in scanning electron microscopy (A). IHC stereocilia seem to be unanchored in 6 months old Vglut3^{A224V/A224V} mice compared to Vglut3^{+/+} mice in transmission electron microscopy (B). γ-actine immunolabelling on organ of Corti cryostat sections (red) are comparable between 6 months old Vglut3^{+/+} and Vglut3^{A224V/A224V} mice, without any impairement (C).



Apoptosis evaluation by immunofluorescence and western blot. Bax immunolabelling (green) on Vglut3^{A224V/A224V} mice organ of Corti cryostat section does not differ from Vglut3^{+/+} mice. IHC cytoplasm is spotted by VGLUT3 immunolabelling (red). IHC stereocilia are immunolabelled by phalloïdin (pink). IHC nucleus are immunolabelled by Hoescht (blue) (A). Bax expression level measured by Western blot is not significantly different between Vglut3^{+/+}, Vglut3^{+/A224V} and Vglut3^{A224V/A224V} mice cochlea at 2 or 6 months old (Student's unpaired t test, respectively for age p value = 0,82 and 0,91). Values shown are means +/- SEM (B). Caspase 3 is not activated in Vglut3^{A224V/A224V} (3) mice cochlea compared to Vglut3^{+/A224V} (1) and Vglut3^{+/+} (2) mice cochlea. We does not observe in fact any cleaved caspase 3 expression detected by western blot in any genotype and at any age (2 and 6 months old), compared to positive controls (6 months old SAMP8 mice cochlea) (C).



Autophagy activation explored by transmission electron microscopy, immunofluorescence and western blot.

Autophagic vesicles are observed in 6 months old Vglut3^{A224V/A224V} IHC by transmission electron microscopy (A). LC3 (green) immunolabelling on organ of Corti cryostat sections is comparable between 6 months old Vglut3^{+/+} and Vglut3^{A224V/A224V} mice. IHC cytoplasm is spotted by VGLUT3 (red) immunolabelling. IHC stereocilia are immunolabelled by phalloïdin (pink). IHC nucleus are immunolabelled by Hoescht (blue) (B). No LC3-II is detected by Western blot in 2 or 6 months old Vglut3^{+/+} (1), neither Vglut3^{+/A224V} (2), nor Vglut3^{A224V/A224V} (3) mice cochlea. LC3-II is detected on positive control (6 months old SAMP8 mice cochlea) (C). Beclin1 (green) overexpression is detected by immunolabelling on Valut3^{A224V/A224V} organ of Corti cryostat section compared to Vglut3^{+/+} from 2 months old. IHC cytoplasm is spotted by VGLUT3 immunolabelling (pink). IHC stereocilia are immunolabelled by phalloïdin (red). IHC nucleus are immunolabelled by Hoescht (blue) (D). Significant Beclin1 overexpression is confirmed by Western blot from 1 month old in Vglut3^{A224V/A224V} mice cochlea compared to Vglut3^{+/A224V} and Vglut3^{+/+} mice cochlea (Student-s unpaired t test, respectively p value = 0.002 and 0.003). This difference persists at 2 months old and disappears at 6 months old (p value = 0,25). Values shown are means +/- SEM (E). Bcl2 and Beclin1 association is quantified by Bcl2 expression level evaluation by Western blot on Beclin1 coimmunoprecipitation products. This Bcl2 expression level is normalized on the Beclin1 expression level in natives samples. Bcl2 is significantly less associated to Beclin1 in Vglut3^{A224V/A224V} mice cochlea compared to Vglut3^{+/+} at 2 months old (p value = 0,04) and 6 months old (p value = 0,03). This difference is not significant at 1 month old (p value = 0.63). Student-s unpaired t test. Values shown are means +/- SEM (F).



Β.

	pB66	pB66-VGLUT3	pB66-VGLUT3A224V
139-cullin3 clone		1	1
175-cullin3 clone	10		I

Conjugation	β- gal test	HIS medium + 3AT
pB66 empty - pP6_B-139	-	-
pB66 VGLUT3 wt - pP6_B-139	+	+
pB66 VGLUT3 A224V - pP6_B-139	+	+
pB66 empty - pP6_B-175	-	-
pB66 VGLUT3 wt - pP6_B-175	+	+
pB66 VGLUT3 A224V - pP6_B-175	+	+

Cullin 3 and Vglut3 interaction evaluated by double hydride and plasmid constructs in yeast.

Cullin3 structure schematic representation and Vglut3 Selected Interaction Domain (SID, blue). Cullin3 is composed of cullin repeat domains (CR, green) on N-termination (from 31 to 385 amino acids), which anchor the cognate adaptator proteins ; a cullin homology domain (CH, purple, from 385 to 675 amino acids), which is essential to link ring finger proteins ; and a neddylation site (red) on C-termination (from 695 to 761 amino acids). The Vglut3 SID is between 50 and 217 amino acids of cullin3 (A). Example of yeast interaction tests results with 139- and 175-cullin3 clones. The blue color means that there is an interaction between wild type or mutated VGLUT3 and cullin3 clones (B). Table of β -gal interaction tests and HIS medium + 3AT interaction tests results between 139- or 175-cullin3 clones on one hand, and wild type or mutated (A224V) VGLUT3 on the other hand (C).



Cullin3 pathway exploration by immunofluorescence and western blot.

Cullin3 (blue) is detected in IHC cytoplasm on cochlear explants by immunofluorescence and colocalizes with VGLUT3 (red). Synaptic ribbon are spotted by CTBP2 (green) immunolabelling. About 1/6 IHC show a cullin3 immunolabelling of their all cytoplasm, when in the others we detect small puncture immunolabellings. We does not observed any differences between Vglut3^{+/+} and Vglut3^{A224V/A224V} IHC mice (A). schematic representation of the cullin3 pathway. Beclin1 and Bcl2 dissociation is activated by Beclin1 Threonine 119

phosphorylation by DAPK1. When Beclin1 and Bcl2 are dissociated, autophagy is activated. Cullin1 take part in DAPK1 ubiquitination, a process which loads to its degradation (B). there is no difference of Cullin3 expression level evaluated by Western blot between Vglut3^{+/+} and Vglut3^{A224V/A224V} mice cochlea, neither at 2 months old, nor at 6 months old (respectively p value = 0,82 and 0,08) (C). DAPK1 expression level evaluated by Western blot is similar between Vglut3^{+/+} and Vglut3^{A224V/A224V} mice cochlea at 2 months old (p value = 0,24) or 6 months old (p value = 0,22) (D). Beclin1 is significantly more phosphorylated on its Threonine 119 at 6 months old in Vglut3^{A224V/A224V} mice total cochlea compared to Vglut3^{+/+} mice total cochlea (p value<0,001). This difference is not observed at 2 months old (p value = 0,99) (E). Beclin1 Threonine 119 phosphorylated is better detected by western blot on mice cochlea Beclin1 co-immunoprecipitation products. The increased phosphorylation of Beclin1 on its Threonine 119 is detected from 2 months old (p value = 0,002) and persists at 6 months old (p value = 0,002) (F).

Supplementary table 1

			FD3
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	А
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-136	Mus musculus - Cul3	GID: 146134444	А
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-175	Mus musculus - Cul3	GID: 146134444	А
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-132	Mus musculus - Cul3	GID: 146134444	А
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-34	Mus musculus - Cul3	GID: 146134444	А
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-45	Mus musculus - Cul3	GID: 146134444	А
AMB_RP1_hgx1498v3_pB66_B-168	Mus musculus - Cul3	GID: 146134444	А
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	С
AMB_RP1_hgx1498v3_pB27_A-2	Mus musculus - Rbbp9	GID: 86439976	С
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

Putative interactants obtained by double hydride. Summary table of clones obtained by double hybrid technique (Hybrigenics), corresponding Gene name, GenBank (NCBI) code and Predicted Biological Score (PBS). All seven cullin3 clones have a (A) PBS, the highest confidence rank.

Supplementary figure 1



@ 12-months-old

ABR recordings at 12 months old. At 12 months old, Vglut3^{A224V/A224V} mice present more important ABR threshold increase when Vglut3^{+/A224V} and Vglut3^{+/+} mice present comparable ABR threshold increase due to aging (A). ABR wave 1 amplitude decrease in 12 months old Vglut3^{A224V/A224V} mice compared to Vglut3^{+/+} mice. Vglut3^{+/A224V} mice show an intermediate phenotype (B).

Supplementary figure 2





IHC synapses count at 6 and 12 months old.

Confocal microscopy observation of Vglut3^{+/+} and Vglut3^{A224V/A224V} IHC immunofluorescence : CTBP2 (green) is the presynaptic component, GluR2/3 (red) is the postsynaptic component, IHC is labelled by VGLUT3 (blue). The ribbon synapses number is comparable between Vglut3^{+/+} and Vglut3^{A224V/A224V} IHC at 6 months old (respectively n= 36 and 42, p value = 0,12) but we observe a decreasing tendancy (A) This decrease in synapses number become significant at 12 months old (respectively n= 37 and 54, p value = 0,002). We also observe IHC loss at 12 months for only VGLUT3^{A224V/A224V} mice (about 1/8) (B). Values shown are means +/- SEM. Student's unpaired t test.

Supplementary figure 3



Co-immunoprecipitation controls for 1, 2 and 6 months for Vglut3^{+/+}, Vglut3^{+/A224V} and Vglut3^{A224V/A224V} mice total cochlea evaluated by Western blot.

Ig corresponds to antibody alone with agarose beads, that is to say our negative controls. CoIP corresponds to Beclin1 co-immunoprecipitation products. Input corresponds to Vglut3^{+/+}, Vglut3^{+/A224V} and Vglut3^{A224V/A224V} mice total cochlea native extracts, that is to say our positive controls.

Conclusion - Perspectives

Cette étude met en lumière une possible nouvelle fonction de VGLUT3. En effet, le remplissage vésiculaire en glutamate ne semble pas être affecté par la mutation p.A224V ni dans les CCI des souris VGLUT3^{A224V/A224V} ni dans le cerveau (Ramet et al., manuscrit en préparation). Dans les CCI, les synapses en ruban ne paraissent pas dysfonctionner. Par contre le pole apical des CCI est le siège d'anomalies majeures, notamment d'une fusion des stéréocils, sans atteinte anatomique franche de l'actine, constituant principal de la plaque cuticulaire. Les CCI disparaissent chez les souris VGLUT3^{A224V/A224V} âgées, sans que soit détectée une activation de l'apoptose. Il semblerait que nous ayons plutôt ici à faire à une activation de la mort par autophagie.

Chez les souris VGLUT3^{A224V/A224V}, nous avons mis en évidence une activation de l'autophagie. Cette dernière est activée en conditions physiologiques par un stress cellulaire. On peut donc proposer que la forme mutée de VGLUT3-p.A224V induit un stress cellulaire pour une raison que nous ignorons encore, et que ce stress enclenche un processus autophagique. La baisse d'expression de VGLUT3-p.A224V est un argument supplémentaire, sa clairance pouvant ainsi être augmentée via l'autophagie, afin de limiter le stress cellulaire.

En reprenant le modèle proposé par Shen et Codogno (Shen and Codogno 2011), nous possédons des arguments pour évoquer une possible mort autophagique des CCI :

- 1) l'apoptose n'est pas activée dans les CCI des souris VGLUT3^{A224V/A224V};
- 2) il existe une activation du flux autophagique (via Becline 1 notamment) ;

3) Enfin, les souris n'exprimant qu'une copie de l'allèle muté (VGLUT3^{A224V/-}) présentent une très faible expression cochléaire de VGLUT3 sans atteinte auditive lors de l'avancée en âge. Cette dernière donnée est très intéressante puisqu'elle suggère que la mutation opère comme un gain de fonction. L'expression de 2 copies de l'allèle muté entrainant la mort de CCI alors que l'expression d'une seule copie opèrerait comme un sauvetage.

Notons que le fait que l'apoptose ne semble pas être activée dans les cochlées des souris VGLUT3^{A224V/A224V} pourrait par ailleurs être lié à une perte de fonctionnalité de cette

dernière en raison de l'expression de VGLUT3-p.A224V. Les CCI utiliseraient alors l'autophagie pour mourir, n'ayant pas d'autre voie à leur disposition. Cette hypothèse nécessiterait d'être évaluée.

Si la forme mutée VGLUT3-p.A224V induit une mort par autophagie des CCI, quel est le lien entre VGLUT3 et la mort autophagique ? Lors d'un crible double hybride nous avons pu mettre en évidence une interaction entre la boucle portant le motif KWAPPLER et la Culline 3. La Culline 3 pourrait être l'interactant clef reliant VGLUT3 au processus d'activation de la mort autophagique. En effet Culline 3 module la disponibilité de DAPK1 (Lee, Yuan et al. 2010) qui, en phosphorylant Becline 1 sur sa thréonine 119, favorise la dissociation cette dernière de Bcl2 et la rend disponible pour activer l'autophagie (Feng, Huang et al. 2007 ; Oberstein, Jeffrey et al. 2007; Zalckvar, Berissi et al. 2009; Marquez and Xu 2012). Cette voie autophagique particulière était suractivée chez les souris VGLUT3^{A224V/A224V}.

Nous n'avons pas détecté d'activation de LC3 dans les cochlées des souris VGLUT3^{A224V/A224V}, mais une activation de Becline 1. À ce jour, nous n'avons pas trouvé d'implication de LC3 dans la mort autophagique, contrairement à Becline 1. Cette dernière favorise la production des phagophores et la maturation de l'autophagosome, sous la dépendance du Golgi et sans faire intervenir le réticulum endoplasmique, contrairement à LC3. Il serait donc intéressant d'évaluer le fonctionnement de ces deux organelles dans les CCI des souris VGLUT3^{A224V/A224V}.

Par ailleurs, la translocation de Becline 1 au Golgi permettant son activation dépend de la motilité des microtubules. Il a déjà été mis en évidence un rôle de la Culline 3 dans le développement des organes sensoriels externes de la drosophile (Mistry, Wilson et al. 2004), ainsi que dans la motilité du cytosquelette d'actine dans cette même espèce (Chen, Yang et al. 2009 ; Hudson and Cooley 2010). Les marquages de la γ -actine au sein des CCI ne diffèrent pas entre les souris sauvages et les souris VGLUT3^{A224V/A224V}. Il n'est pas exclu que la Culline 3 et l'éventuelle modulation de son activité par son interaction avec VGLUT3-p.A224V ne puissent intervenir dans la cinétique de l'actine et donc la stabilité des stéréocils des CCI ainsi que dans la translocation de Becline 1 au Golgi. Ainsi l'interaction entre VGLUT3 et Culline 3 pourrait avoir de multiples rôles dans la surdité DFNA25; entre autre: l'activation de la mort autophagique mais aussi le maintien fonctionnel des stéréocils des CCI.

Nous avons dores et déjà mis en évidence plusieurs éléments permettant d'étayer l'hypothèse d'une activation indirecte de l'autophagie par la copie de VGLUT3 sauvage, et non pas seulement par la copie mutée. Cette fonction de VGLUT3 dans la mort autophagique paraît être native, au vu des résultats obtenus chez les souris VGLUT3^{A224V/-}. Le niveau d'expression de VGLUT3-p.A224V semble être ici l'élément déterminant dans le basculement vers une perte des CCI. Alors que l'expression de VGLUT3-p.A224V est très réduite (-80%) chez les souris VGLUT3^{A224V/-}, l'audition est préservée lors de l'avancée en âge. En revanche, l'expression soit d'une copie sauvage et d'une copie mutée (VGLUT3^{A224V/+}), soit de deux copie mutées VGLUT3^{A224V/A224V} entraine perte auditive et autophagie. En résumé, si son expression est plus abondante, la suractivité de cette fonction autophagique de VGLUT3 devient délétère (comme chez les souris VGLUT3^{+/A224V} et VGLUT3^{A224V/A224V}). Si l'activation de l'autophagie ne dépendait que de la forme mutée de VGLUT3, les souris VGLUT3^{+/A224V} présenteraient le même phénotype auditif que les souris VGLUT3^{A224V/-}, c'est à dire seraient indemnes. Afin d'étayer cette hypothèse, il nous semble essentiel de réaliser des expériences complémentaires sur les souris VGLUT3^{A224V/-} en évaluant l'expression cochléaire de Becline 1, son activation et la morphologie de leur CCI.

Cette fonction de VGLUT3 dans l'activation de l'autophagie, voire de la mort par autophagie, pourrait éclairer la physiopathologie d'autre surdités génétiques que la surdité DFNA25. Dans la surdité DFNB6 par exemple, il est observé une surexpression de VGLUT3 dans les cochlées (CCI et neurones auditifs primaires) des souris circling âgée de 14 jours, associée à une dégénérescence précoce de l'organe de Corti (Lee, Kim et al. 2015). Cette mort précoce des CCI pourrait être due à une excitotoxicité, la libération de glutamate au niveau de la synapse en ruban étant plus importante. Dans le neurone auditif primaire le remplissage vésiculaire glutamatergique est assuré par VGLUT1 et VGLUT2. Le rôle de VGLUT3 dans ce remplissage vésiculaire est beaucoup plus sujet à controverse, les marquages de VGLUT3 dans le ganglion spiral n'étant pas toujours retrouvé selon les auteurs. Cette surexpression de VGLUT3 dans le neurone auditif primaire est propre aux souris circling P14 et n'est pas décrite chez des souris sauvage aussi jeunes, ne trouvant pas d'explication évidente selon Lee *et al*. Au vu de nos résultats, nous proposons l'hypothèse qu'une surexpression de VGLUT3 dans le neurone auditif primaire des souris circling pourrait être lié à une activation de l'autophagie, en réaction à l'excitotoxicité issue des synapses en ruban des CCI. Un marquage punctiforme de VGLUT3 est également retrouvé dans les neurones auditifs primaires de rats âgés, pouvant là encore trouver sa source dans cette hypothèse cette fois-ci en raison d'un processus avancé de vieillissement (Peng, Wang et al. 2013).

Ainsi les résultats obtenus chez les souris exprimant VGLUT3-p.A224V posent de nombreuses questions qui nécessitent encore des explorations :

i) Il reste à évaluer le rôle, direct ou indirect de VGLUT3, via Culline 3, dans le fonctionnement de la plaque cuticulaire. Notamment pour une modulation dynamique de l'actine.

ii) de même le rôle de VGLUT3 (indirect via Culline 3) reste à démontrer dans
l'activation de l'autophagie pouvant aboutir à une mort autophagique des CCI. Il
conviendrait de l'évaluer, entre autre, par une étude de l'interaction *in vivo* entre Culline
3 et VGLUT3.

iii) Il faudrait également effectuer une description complète de l'anatomie et du fonctionnement des CCI des souris VGLUT3^{A224V/-}.

iv) il serait enfin intéressant de vérifier si par des expériences de pharmacologie, notamment via des inhibiteurs de l'autophagie; si le phénotype auditif pourrait être atténué ou ralenti. Cette partie de notre travail pourrait ouvrir de nouvelles perspectives pour le traitement de la presbyacousie.

Ces diverses pistes pourraient aider à établir des hypothèses physiopathologiques robustes pour expliquer la surdité DFNA25. Il s'agit à notre connaissance de la première pathologie génétique humaine dans laquelle la mort autophagique est impliquée. Accessoirement cette étude mettrait en évidence une nouvelle fonction insoupçonnée de VGLUT3. Note : Dans ce travail, Marie Gillet, Gaston Sendin et Régis Nouvian ont réalisé les études électrophysiologiques, tandis que j'ai réalisé le phénotypage auditif et l'étude anatomique et biochimique des souris mutantes. Jing Wang a réalisé la finalisation de la préparation des échantillons de microscopie électronique à balayage et leur observation, tandis que Michel Eybalin a réalisé la finalisation de la préparation des échantillons de microscopie électronique à transmission et leur observation. Clément Surel a réalisé les marquages de Becline 1 en immunofluorescence sur explants. Enfin Lauriane Ramet a réalisé l'analyse des données issues du double hybride traité par HYBRIGENICS, et réalisé les expériences de validation des interactants sur levures.

ANNEXE #1

EFFET D'UN INHIBITEUR DES VGLUTS SUR L'AUDITION

Introduction

Le niveau d'expression de VGLUT3 semble être un élément clef dans la physiopathologie de la surdité DFNA25. Par conséquent la modulation de l'activité de VGLUT3 pourrait contribuer au traitement de la presbyacousie ou à prévenir les traumatismes acoustiques.

Nous présentons ici des résultats partiels s'intégrant dans un travail plus élaboré de mise au point d'inhibiteurs affins et efficaces des VGLUTs. Dans ce travail, Nicolas Pietrancosta (CR1 CNRS, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité) a mis au point divers inhibiteurs des VGLUTs. Nous avons testé *in vivo* l'un d'eux : le composé LPS5-2157. Nous présentons le phénotype auditif de cochons d'inde après une perfusion intracochléaire de LSP5-2157. L'ensemble de ce travail s'intégrera dans un article intitulé : « Development of LSP5-2157, a new inhibitor of vesicular glutamate transport.» (liste des auteurs : Nicolas Pietrancosta, Melissa Herman, Lauren Mamer, Odile Poirel, <u>Stephanie Miot</u>, Jing Wang, Franck-Cyril Favre-Besse, Marie Arnulf-Kempcke, Myriam Kervern, Brigitte Potier, Stephanie Daumas, Jean-Luc Puel, Bruno Giros, Jacques Epelbaum⁷, Christian Rosenmund, Patrick Dutar, Francine Acher, Salah El Mestikawy.).

Cette partie est rédigée en anglais.

Materials and Methods

Animals

Adult pigmented guinea pigs weighing 250–300 g were purchased from Janvier Laboratories (Le Genest Saint Isle). Guinea pigs were housed in facilities accredited by the French Ministry of Agriculture and Forestry (B-34 172 36 - March 11, 2010). Experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) regarding the care and use of animals for experimental procedures. All efforts were made to minimize the number and suffering of the used animals.

Drug preparation

Artificial perilymph solution (AP) consisted of the following : NaCl (137mM); KCl (5mM); CaCl2 (2mM); MgCl2 (1mM); NaHCO3 (1 mM); glucose (11mM); pH 7.4; osmolarity: 304 \pm 4.3 mOsm/kg. Before each experiment, LSP5-2157, a specific inhibitor of VGLUTs was prepared in AP to a final concentration of: 0, 1, 3, 10, 30, 100, 1000 or 2000 μ M.

Surgery and perilymphatic perfusion technique

The guinea pigs were anaesthetized with an intraperitoneal injection of urethane (1.4 g/kg; Sigma). Supplementary doses of urethane were administered as required to maintain deep anaesthesia. A tracheotomy was performed, the electrocardiogram was monitored and the central temperature regulated at 38 \pm 1 ° C by a thermally regulated heating blanket. The pinna and external meatus were resected to ensure good close-field acoustic stimulation. The method used to monitor the effect of multiple perilymphatic perfusions on sound-evoked potentials has been described extensively elsewhere (Puel et al., 1995). The cochlea was exposed ventrally and holes (0.2 mm in diameter) were gently drilled in the scala vestibuli and scala tympani of the basal turn of the cochlea. Intracochlear perfusions were administered through the hole in the scala vestibuli. All perfusions lasted 10 min. The test solutions were successively applied at 22° C by perfusing the perilymphatic compartment for 10 min, using a glass pipette coupled to a syringe pump (Syringe Pump Model 11; Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA)

Functional assessments

Compound action potential of the auditory nerve

The acoustical stimuli were generated by a NI PXI-4461 signal generator (National Instruments) consisting of 10 ms tone bursts with a 1 ms rise and fall time delivered at a rate of 10/s. Tone bursts were passed through a programmable attenuator and delivered to the

animal by a JBL 075 loudspeaker (James B. Lansing Sound, Los Angeles, CA, USA) in a calibrated free field, positioned at 10 cm from the tested ear. CAP of the auditory nerve were obtained via a silver electrode placed on the RWM and then amplified (32000) by a Grass P511 differential amplifier and digitalized (50 kHz sampling rate, with a 12-bit dynamic range and 1024 samples per burst), averaged 256 times, and stored on a computer (Dell Dimensions, Austin, TX, USA). This signal was then digitally filtered either with a low-pass filter (cutoff frequency 3.5 kHz) to display the compound CAP of the auditory nerve. Amplitude-intensity relationships were obtained by varying tone burst levels from 0 to 100 dB SPL, in 5 dB steps.

The compound action potential of the auditory nerve (CAP: N 1–P 1), N 1 latency, cochlear microphonic (CM) and summating potential (SP) were recorded after cumulative 10-min perfusions of increasing doses of LSP5-2157 (n=7). The CAP, SP and CM thresholds were defined as the level of decibels SPL needed to elicit a measurable response ranged from 2 to 5μ V.

Results

Our results showed that the initial perfusion of artificial perilymph did not induce significant changes in CAP amplitude, N1 latency, CM or SP (data no shown). The drug effects were therefore compared with the cochlear potentials recorded after the artificial perilymph perfusion. Here we show that whatever the intensity of sound stimulation, LSP5-2157 reduced the CAP amplitude and increased its latency measured at the first negative wave N1 in a dose-dependent manner (**Figure 1A and B**).

Discussion

CAP amplitude was increased by LSP5-2157, whereas CM and SP amplitude were not affected. N1 latency was increased by LSP5-2157, which is corresponding with the CAP amplitude impairment. The LSP5-2157 compound seems to induce ganglion spiral neuron dysfunction, probably due to glutamate release decrease from the IHC ribbon synapse.



Effect of LSP5-2157 on cochlear and auditory nerve potentials.

(A-D): CAP amplitude and N1 latency (A and B, respectively), and CM (C) and SP amplitude (D) evoked by 8 kHz tone-bursts. Shown are results obtained after the perfusion of artificial perilymph (gray circles), artificial perilymph containing 1 (green circles), 10 (blue circles), 300

(rose circles), 1000 (red circles) and 2000 (black circles) μ M of LSP5-2157. All points represent mean ± S.E. values calculated from seven animals. Note almost no effect of LSP5-2157 on CM and SP. By contrast, LSP5-2157 caused a drastic reduction in CAP amplitude and an increase in N1 latency. E: Dose–response curves obtained with LSP5-2157. The dose–responses were fitted to a curve using a non-linear least-square logistic equation. The IC50 value (dashed red line) was 0.93 mM.

Conclusion - Perspectives

Le composé LSP5-2157 inhibe le transport vésiculaire du glutamate par VGLUT3 lors d'une injection intra-cochléaire aigue. En cela il pourrait être utile pour prévenir les traumatismes auditifs en protégeant la cochlée de l'excitotoxicité glutamatergique lors d'un stimulus de trop forte intensité (Lin, Furman et al. 2011). Concernant le traitement de la surdité DFNA25, l'activité de transport de glutamate par VGLUT3-p.A211V n'est pas affectée. On peut donc imaginer que même son administration locale à faibles doses au long cours ne permettrait pas a priori de prévention de la mort autophagique des CCI.

ANNEXE #2

INFLUENCE DE L'ENVIRONNEMENT ENRICHI SUR L'EXPRESSION DES VGLUTS AU COURS DU VIEILLISSEMENT CÉRÉBRAL PRÉCOCE (résultats préliminaires)

Introduction

Afin de poursuivre l'exploration du rôle des VGLUTs dans l'adaptation au cours de l'avancée en âge, nous nous sommes penchés sur le vieillissement cérébral pathologique.

Comme évoqué dans l'introduction générale, le vieillissement est le temps de la fragilité. Face à des conditions extrêmes, l'adaptabilité est mise en jeu. Si cette dernière est élevée lors du développement néonatal, elle diminue considérablement au cours du vieillissement. Cela est bien montré par la diminution du coefficient de variation de l'index de fragilité dans le modèle de Mitnitski et Rockwood, faisant ici référence à la théorie de la variété requise (Rockwood and Mitnitski 2007). Cette perte d'adaptabilité favorise l'émergence de certaines pathologies, comme la presbyacousie que nous avons étudiée dans un chapitre précédent. Une autre pathologie, dont la trajectoire évolutive est d'ailleurs influencée en cas de presbyacousie (Campbell, Crews et al. 1999 ; Martini, Mazzoli et al. 2001), est emblématique de cette perte d'adaptation au cours du vieillissement du système nerveux central : les troubles neurocognitifs majeurs, et parmi eux la maladie d'Alzheimer, dont la prévalence est la plus forte parmi les TNC (Cummings 2004).

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer est complexe. Certains modèles animaux nous permettent cependant de mieux appréhender les mécanismes physiopathologiques impliqués dans cette maladie. C'est le cas par exemple des souris SAMP8, modèle de sénescence accélérée, de fragilité au sens gériatrique du terme, et de la maladie d'Alzheimer du fait d'une atteinte mnésique patente (Morley 2002 ; Lopez-Ramos, Jurado-Parras et al. 2012). Outre des lésions neuro-pathologiques typiques de la maladie d'Alzheimer (Canudas, Gutierrez-Cuesta et al. 2005; Tomobe and Nomura 2009; Li, Cheng et al. 2013), ces souris présentent une baisse de la plasticité synaptique via une atteinte de la voie septo-hippocampique et de la LTP (Flood and Morley 1998; Tomobe and Nomura 2009). La physiopathologie impliquée dans le vieillissement cérébral précoce des souris SAMP8 est multiple, impliquant à la fois des processus cellulaires inflammatoires, oxydatifs, ainsi qu'une dysfonction synaptique glutamatergique retentissant sur les autres systèmes de neurotransmetteurs (Butterfield and Poon 2005).

La solidité de la plasticité synaptique se reflète, entre autre, dans le niveau d'expression des VGLUTs dans certaines régions cérébrales (Massie, Schallier et al. 2010). Dans des études post-mortem, l'expression de certains VGLUTs (VGLUT1 et VGLUT2) est diminuée dans le cortex préfrontal de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Kashani, Lepicard et al. 2008). Chez les souris SAMP8, l'expression de VGLUT2 est diminuée dans l'hippocampe, et les niveaux d'expression de VGLUT1 et VGLUT2 dans le système nerveux central sont corrélés à l'atteinte mnésique de ces souris (Cheng, Yang et al. 2011).

La neuroplasticité est par ailleurs influencée par la stimulation sensorielle (LeVay, Stryker et al. 1978) et l'environnement enrichi (Nithianantharajah, Levis et al. 2004). Dans les études sur les rongeurs, l'environnement enrichi (EE) est une exposition à la nouveauté et à la complexité physique et sociale, permettant d'augmenter la stimulation sensorielle, cognitive et physique (Girbovan and Plamondon 2013). L'EE augmente l'expression du glutamate et du GABA dans l'hippocampe de jeunes rats (Mora-Gallegos, Rojas-Carvajal et al. 2015) mais également chez des rats âgés (Segovia, Yague et al. 2006). L'EE réduit également l'expression de la protéine β -amyloïde dans le cerveau de souris âgées (Mainardi, Di Garbo et al. 2014). L'EE peut donc influer sur la plasticité synaptique et l'adaptabilité du système nerveux central, notamment au cours du vieillissement.

Nous nous sommes donc posés la question de l'effet de l'environnement enrichi sur le vieillissement prématuré des souris SAMP8. L'environnement enrichi peut-il influencer voire améliorer le phénotype cognitif et émotionnel des souris SAMP8?

Le glutamate joue un rôle central dans la LTP hippocampique (Riedel and Reymann 1996). L'équilibre entre glutamate et GABA est essentiel dans la synaptogenèse, mais aussi les rythmes thêta et le vieillissement hippocampique (Deng, Yao et al. 2007; Gatto and Broadie 2010). Existe-t-il une corrélation entre phénotype cognitif et/ou émotionnel, et équilibre entre glutamate et GABA chez ces souris SAMP8? Quel est l'impact de l'EE sur l'expression des VGLUTs et de VIAAT dans l'hippocampe et le cortex préfrontal des souris SAMP8?

Matériel et méthodes :

Animaux.

Nous avons réalisé notre étude sur trois groupes de souris : 1) les souris SAMP8-EE, souris SAMP8 placées en environnement enrichi continu à partir de 2 mois ; 2) les souris SAMP8-NE, souris SAMP8 placées en environnement normal et 3) les souris SAMR1, placées elles aussi en environnement normal. Les souris SAMP8 sont issues du laboratoire Harlan (Indianapolis, IN, USA) et ont été élevées en respectant les règles du comité éthique local en accord avec les directives européennes du 22 septembre 2010 pour le respect du bien être animal (2010/63/EU). Les souris étaient hébergées dans une animalerie agréée (24°c, cycles jour/nuit de 12h) et bénéficiaient d'une alimentation et de boissons *ad libitum*. Toutes les expériences ont été réalisées avec des souris femelles âgées de 4, 6 et 9 mois.

Tests comportementaux.

Les souris subissaient une batterie de tests comportementaux pendant une durée totale de 2 semaines. Un test d'apprentissage mnésique dans la piscine de Morris en référentiel égocentrique était d'abord réalisé durant 4 jours (Daumas, Sandin et al. 2008). Ce test était poursuivi par un test d'apprentissage mnésique et de rétention de l'information apprise dans la piscine de Morris en référentiel allocentrique durant 5 jours successifs puis une journée à 48h de la fin des 5 premiers jours (Daumas, Sandin et al. 2008). Afin de mesurer la force de leur 4 pattes, les souris bénéficiaient ensuite d'un « *grip test »* (Chung, Vakil et al. 2016). Dans la phase finale de l'apprentissage l'humeur des souris était évaluée par un test de labyrinthe en croix surélevé (Amilhon, Lepicard et al. 2010) et enfin un test de suspension par la queue (Farley, Dumas et al. 2012).

Résultats préliminaires :

Évaluation de la force physique des souris SAMP8 ou SAMR1 élevées en milieu normal ou enrichi.

Nous avons d'abord évalué la force des souris SAMP8-EE ou NE et SAMR1 afin de ne pas méconnaître une baisse de la force motrice pouvant influencer les capacités motrices des souris dans le test de la piscine de Morris (MWM). Comme le montre la **Figure 1**, il n'existe pas de différence significative entre les différents groupes de souris testées à 4, 6 ou 9 mois dans le *grip test*.

Évaluation du profil mnésique des souris SAMP8 ou SAMR1 élevées en milieu normal ou enrichi.

Dans le MWM en référentiel égocentrique (également appelé *Cue task*), toutes les souris, quelque soit le groupe et l'âge, présentent une latence réduite au cours des jours d'apprentissage successifs (tests ANOVA, valeur de p < 0,0001) (**Fig. 2**).

Dans des condition d'élevage en cage normale, nous n'observons aucune différence significative de latence entre les souris SAMP8 et SAMR1 quelque soit l'âge. Par contre une latence significativement plus faible est observée avec les souris SAMP8 après un élevage en environnement enrichi par rapport aux souris SAMP8 contrôle dès 4 mois lors des deux premiers jours (test de Fisher, respectivement valeur de p =0.005 et 0.004) (**Fig 2A**). À 6 mois la latence est significativement plus courte chez les souris SAMP8-EE par rapport aux souris SAMP8-NE lors des trois derniers jours (test de Fisher, respectivement valeur de p =0.003, 0.02 et 0.02) (**Fig 2B**). Cet effet disparaît à 9 mois (**Fig 2C**).

Les souris SAMP8-EE présentent une latence significativement réduite par rapport aux souris SAMR1 uniquement lors du premier jour d'apprentissage à 4 mois (test de Fisher, valeur de p = 0.002), du second jour à 6 mois (test de Fisher, valeur de p = 0.015) et du dernier jour à 9 mois (test de Fisher, valeur de p = 0.05). L'effet de l'environnement enrichi sur l'apprentissage des souris SAMP8 est significatif à 4 et 6 mois (test ANOVA, respectivement valeur de p = 0.04 et 0.007) mais disparaît à 9 mois. Enfin on observe un profil d'apprentissage significativement différent entre les trois groupes (SAMP8-EE, SAMP8-NE et SAMR1) uniquement à 6 mois (test ANOVA, valeur de p = 0.03).

Le test de la piscine de Morris en référentiel allocentrique (également *Spatial Reference Morris* ou *SRM*) évalue la mémoire spatiale (**Figure 3**).

À 4 mois, les souris SAMP8-NE et SAMR1-NE d'une part, SAMP8-EE et SAMR1 d'autre part, présentent une évolution des latences au cours des 5 jours d'apprentissage comparables (**Fig. 3A**). Par contre, les souris SAMP8 maintenues en environnement enrichi présentent des latences significativement plus courtes en comparaison aux souris SAMP8 élevées en conditions normales (F**ig 3A**, test de Fisher, respectives valeur de p = 0.02).

À 6 mois, les souris SAMR1 et SAMP8-EE présentent une diminution significative des latences par rapport aux souris SAMP8-NE (**Fig. 3B**, test de Fisher, respectivement valeur de p = 0.03 et 0.01). Les souris SAMP8-EE présentent un profil d'apprentissage spatial comparable aux souris SAMR1 (test de Fisher, valeur de p = 0.64). À cet âge, le groupe a un effet significatif sur l'évolution des latences au cours des 5 jours de test (test ANOVA, valeur de p=0.03). Les différences entres les souris SAMP8-EE et SAMP8-NE sont significatives les trois derniers jours (test de Fisher, respectivement valeur de p = 0.004, 0.002 et 0.005).

Enfin à 9 mois il n'est plus observé de différence significative dans l'évolution de la latence au fil des 5 jours d'apprentissage entre les souris SAMP8-NE et SAMR1-NE, SAMP8-NE et SAMP8-EE, et SAMP8-EE et SAMR1-NE (**Fig. 3C**, test Fisher, respectivement valeur de p=0.33, 0.26 et 0.84).

Le test *SRM* se décompose en une première phase d'apprentissage sur 5 jours, puis une phase de rappel différé en deux temps : lors du cinquième jour puis après un temps différé de 48h. Cette seconde phase du test (dite également *Probe Test ou PT*) permet de mesurer la rétention mnésique des souris à court et long terme. À 4 mois, les souris SAMP8-EE présentent une meilleure rétention de l'information que les souris SAMP8-NE et SAMR1-NE (**Fig. 3A**, test de Fisher, respectivement valeur de p = 0.02 et 0.03). Les souris SAMP8 et SAMR1 élevées en cages normales ne présentent pas de différence significative (test de Fisher, valeur de p = 0.9). L'enrichissement entraîne une baisse significative de la latence dans le test de rétention uniquement à 4 mois et pour la rétention à court terme chez les souris SAMP8 (**Fig. 3A**, test de Fisher, valeur de p = 0.02). Ces différences ne sont plus observées à 6 et 9 mois (**Fig. 3B et 3C**).

En résumé, les souris SAMP8 présentent un défaut de mémoire spatiale détecté à 6 mois uniquement. L'environnement enrichi améliore les capacités d'apprentissage des souris SAMP8 à 6 mois, et dès 4 mois pour les compétences mnésiques spatiales. La rétention de l'information est pour sa part très partiellement améliorée à 4 mois uniquement. Cet effet bénéfique de l'environnement enrichi disparaît totalement à 9 mois.

Évaluation du phénotype anxieux et de la résignation comportementale des souris SAMP8 ou SAMR1 élevées en milieu normal ou enrichi.

Nous avons également évalué l'humeur des nos différents groupes de souris. En effet il est bien établi que le niveau d'anxiété peut influer sur les capacités d'apprentissage. Nous avons donc mesuré i) les comportements anxieux dans le test du labyrinthe en croix surélevée et ii) le niveau de résignation dans le test de suspension par la queue. Ce test est couramment utilisé comme un reflet de la sensibilité aux antidépresseurs.

À 4 mois, dans le test du labyrinthe en croix surélevé, les souris SAMP8-NE présentent un pourcentage de temps passé dans les bras ouverts significativement plus important que les souris SAMP8-EE (**Fig. 4A**, test de Fisher, valeur de p = 0.011) ou SAMR1 (test de Fisher, valeur de p = 0.004). Les souris SAMP8-EE sont à cet âge comparables aux souris SAMR1 dans ce test (test de Fisher, valeur de p = 0.74). Il en va de même pour le nombre d'entrées dans les bras ouverts, significativement plus important chez les souris SAMP8-NE comparativement aux souris SAMP8-EE (**Fig. 4B**, test de Fisher, valeur de p = 0.01) et aux souris SAMR1 (test de Fisher, valeur de p = 0.04). Là encore, les souris SAMP8 maintenues en environnement enrichi ont un comportement comparables aux souris SAMR1 (test de Fisher, valeur de p = 0.51). Cet effet significatif de l'environnement enrichi sur le phénotype anxieux (pour durées et nombre d'entrées dans les bras ouverts, respectivement valeur de p = 0.007 et 0.03, test ANOVA) disparaît chez les souris âgées de 6 et 9 mois (**Fig. 4A-B**).

Ainsi les souris SAMP8 sont moins anxieuses à 4 mois que les souris SAMR1. L'environnement enrichi a un effet anxiogène chez les souris SAMP8 mais uniquement à cet âge.

Dans le test de suspension par la queue, il n'existe aucune différence significative entre les souris SAMP8 et SAMR1 âgées de 4 mois et 9 mois (**Fig. 5A-C**). L'environnement

enrichi ne modifie pas la résignation des souris SAMP8. Chez les souris SAMP8 âgées de 6 mois, on observe un effet significatif de l'environnement enrichi sur l'allongement de latence avant le premier temps d'immobilisation (Fig. 5A, test ANOVA, valeur de p =0.009). De même, le temps d'immobilité est diminué (Fig. 5B, test ANOVA, valeur de *p* = 0.007) et le nombre de périodes d'immobilité augmenté (Fig. 5C, test ANOVA, valeur de p = 0.03) par rapport aux deux autres groupes d'animaux. Les souris SAMP8-EE attendent significativement plus longtemps avant de s'immobiliser que les souris SAMP8-NE (test de Fisher, valeur de p = 0.002) et que les souris SAMR1 (test de Fisher, valeur de p = 0.0001). Le temps d'immobilité est pour sa part significativement moins important que chez les souris SAMP8-NE (test de Fisher, valeur de p = 0.004) uniquement. Enfin le nombre de périodes d'immobilité est significativement plus faible chez les souris SAMP8-EE en comparaison aux souris SAMP8-NE (test de Fisher, valeur de p = 0.03) et aux souris SAMR1 (test de Fisher, valeur de p = 0.0004). Il faut également noter un effet significatif de l'âge sur : i) l'évolution des latences qui ont tendance à diminuer (test ANOVA, valeur de p=0.0007), ii) du temps d'immobilité qui a tendance à augmenter (test ANOVA, valeur de p=0.03) et iii) du nombre de périodes d'immobilité qui a tendance à augmenter (test ANOVA, valeur de p<0.0001) (Fig. 5).

Ainsi les souris SAMP8 ne semble pas plus résignées que les SAMR1 mais l'environnement enrichi réduit ce phénotype à l'âge de 6 mois uniquement.

Discussion

Le test de la piscine de Morris en référentiel égocentrique (ou *Cuetask*), permet de mesurer les capacités d'apprentissage des souris en l'absence de tout référentiel spatial. Dans ce test, il n'existe pas de différences significatives entre les souris SAMP8-NE et SAMR1 aux 3 âges que nous avons testés. Ce test ne permet donc pas de mettre en évidence de difficultés d'apprentissage chez les souris SAMP8. Par contre le test de la piscine de Morris en référentiel allocentrique (ou *SRM*) à 6 mois permet de détecter une difficulté significative d'apprentissage chez les souris SAMP8 en milieu normal comparées aux souris SAMR1. Ces données sont concordantes avec la littérature. Elles confirment l'existence d'un déficit portant essentiellement sur la mémoire spatiale en raison d'une atteinte préférentielle de l'hippocampe dorsal (Lopez-Ramos, Jurado-Parras et al. 2012). Le défaut de rétention de l'information apprise, décrit chez des souris SAMP8 à 5 mois (Tomobe and Nomura 2009), n'est retrouvé à aucun âge dans notre étude. Il apparaît nécessaire de rechercher cette donnée dans d'autres tests tel que la reconnaissance d'objet, étude actuellement en cours.

À 6 mois, l'élevage des souris SAMP8 en environnement enrichi améliore significativement l'apprentissage dans les deux tests de la piscine de Morris. Cet effet bénéfique de l'environnement enrichi sur l'apprentissage est par contre détecté plus précocement, dès 4 mois, dans la *SRM*. L'effet positif de l'environnement enrichi sur les performances mnésiques est effectivement essentiellement visible chez des souris d'âge moyen à élevé (Girbovan and Plamondon 2013). Il est intéressant de noter qu'à 6 mois, le profil d'apprentissage des souris SAMP8-EE dans la *SRM* est comparable à celui des souris SAMR1. Cette donnée signe que l'environnement enrichi permet de corriger l'altération mnésique des souris SAMP8 à cet âge. Il est probable que cet effet bénéfique ne persiste pas à 9 mois en raison de l'atteinte de la plasticité cérébrale déjà trop avancée des souris SAMP8.

Enfin l'environnement enrichi semble améliorer la rétention de l'information à court terme chez les souris SAMP8 en comparaison aux souris SAMP8 ou SAMR1 élevées en conditions contrôles. Cet effet n'est visible qu'à 4 mois, et se perd au delà. Il faut toutefois analyser ces données avec prudence étant donné que la recherche de la plateforme dans la piscine de Morris est conditionnée par l'activité locomotrice ou l'humeur des souris, deux modalités elles-mêmes modifiées par le génotype ou les conditions de vie des souris.

La sénescence accélérée des souris SAMP8 n'affecte pas la force motrice de ces dernières. L'environnement enrichi augmente l'activité exploratoire des souris, notamment dans certains modèles animaux murins de la maladie d'Alzheimer (Hong, Estrada-Sanchez et al. 2016; Gortz, Lewejohann et al. 2008). Par ailleurs il a été démontré une baisse de la motivation à explorer son environnement et un faible attrait pour la nouveauté chez les souris SAMP8 (Flood and Morley 1992; Lopez-Ramos, Jurado-Parras et al. 2012). Dans la version indexée du test de la piscine de Morris, les souris SAMP8-EE apprennent plus rapidement et retiennent l'information plus longuement que les souris SAMP8 ou SAMR1 élevées en milieu normal. Cet effet pourrait être dû à une activité locomotrice exploratoire ou à une motivation plus importante. L'analyse des vitesses de nage de nos souris permettra de répondre à cette question. Le test de reconnaissance d'objet permet en outre une analyse plus fine de la composante motivationnelle et d'attrait pour la nouveauté. Cette analyse (en cours) permettra également de confirmer s'il s'agit ici d'un effet motivationnel, locomoteur ou cognitif.

En l'absence d'enrichissement de leur environnement, les souris SAMP8 présentent un phénotype moins anxieux, visible uniquement à 4 mois dans le test du labyrinthe en croix surélevé. Ce résultat est en corrélation partielle avec ceux obtenus en 1992 par Miyamoto *et aliter* qui mettaient en évidence une diminution du nombre d'entrée et du temps passé dans les bras ouverts lors de ce test chez des souris SAMP8 âgées de 4 à 12 mois en comparaison avec des souris SAMR1 (Miyamoto, Kiyota et al. 1992). Ils observaient une augmentation de cette différence avec l'avancée en âge, concluant à une diminution de l'anxiété lors du vieillissement prématuré des souris SAMP8 (Miyamoto, Kiyota et al. 1992). Cependant des études plus récentes concluent pour leur part à une augmentation significative de l'anxiété chez les souris SAMP8 par rapport aux souris SAMR1 de 5 à 14 mois, qui serait mieux détectée dans le test de l'*openfield* (Meeker, Chadman et al. 2013).

D'autres travaux récents montrent que l'environnement enrichi diminue le phénotype anxieux chez des souris femelles dans les tests du labyrinthe en croix surélevé comme dans l'*openfield* (Pena, Prunell et al. 2006; Yuan, Gu et al. 2009). Cet effet est plus
important chez les rates jeunes plutôt qu'âgées (Harati, Barbelivien et al. 2013). Nous observons une diminution significative du temps passé et du nombre d'entrées dans les bras ouverts du labyrinthe en croix surélevé de nos souris SAMP8 ayant bénéficié d'un environnement enrichi uniquement à 4 mois. Ce résultat n'est donc pas concordant avec les données de la littérature. Cependant, la faible anxiété des souris SAMP8-NE dans l'EPM pourrait être interprétée comme pathologique, évoquant la méconnaissance du danger ou une forme de désinhibition, qui serait ici réduite par l'environnement enrichi. Nous tentons actuellement de confirmer ou d'infirmer ces données dans le test de l'*open field*. Ainsi l'environnement enrichi semble augmenter le phénotype anxieux (ou réduire la désinhibition) uniquement chez les souris SAMP8 jeune, et cet effet se perdrait lors de l'avancée en âge.

Le test de suspension par la queue est un test très utilisé en pharmaco-comportement en raison de sa sensibilité aux antidépresseurs. Cependant son interprétation a été au centre de nombreuses polémiques. Il est en effet difficile de déterminer si l'immobilité de la souris reflète : de la dépression, du désespoir, de la résignation ou tout simplement l'adaptation à une situation. En dépit de ces difficultés d'interprétation, ce test permet de révéler d'intéressantes différentes entres les trois groupes de souris.

Dans le test de suspension par la queue, l'avancée en âge i) diminue significativement la latence avant la première période d'immobilité et ii) augmente le temps d'immobilité et le nombre de périodes d'immobilité des souris. Le vieillissement augmente donc le « désespoir » (ou la résignation) comportementale. Les souris SAMP8-NE ne présentent pas de désespoir comportemental significativement plus marqué que les souris SAMR1 quelque soit l'âge. Le vieillissement cérébral prématuré des souris SAMP8 ne constituerait donc pas un facteur de risque de « désespoir » comportemental.

Les souris SAMP8-EE présentent par contre une latence avant de s'immobiliser significativement plus longue que les deux autres groupes. De plus, à 6 mois, nous avons observé un temps d'immobilité significativement plus court et un nombre de périodes d'immobilité plus faible que ceux des souris SAMP8-NE ou SAMR1. À cet âge l'environnement enrichi diminue donc le désespoir ou la résignation chez les souris SAMP8. Il serait intéressant de déterminer si un milieu enrichi induit également cet effet chez des souris SAMR1.

Il est possible que cet effet ne soit visible à partir de 6 mois en raison de l'augmentation de la fragilité de l'humeur liée à l'âge. L'effet bénéfique de l'environnement enrichi sur le désespoir disparaît à 9 mois. Ceci laisse présager qu'il ne suffit pas à limiter sur le long terme l'augmentation du désespoir comportemental lié à l'âge.

Le désespoir comportemental est utilisé par certain comme un marqueur murin de dépression (Hales, Stuart et al. 2014). Comme mentionné ci dessus, cette interprétation est à prendre avec prudence. Le temps d'immobilité permet néanmoins d'évaluer cette composante thymique chez la souris. Si l'on accepte cette approximation, nos résultats pourraient suggérer que l'environnement enrichi est capable de prévenir le risque de dépression lié à l'âge. Est-il uniquement bénéfique sur un terrain de fragilité gériatrique comme les souris SAMP8 ou bien est-il également bénéfique sur un terrain sain? Une étude récente menée sur de jeunes rats a mis en évidence un impact positif de l'environnement enrichi sur la « dépression » (Mahati, Bhagya et al. 2016). Ces rats étaient traités précocement (entre P8 et P21) par clomipramine, protocole permettant de produire des modèles de dépression (Vogel, Neill et al. 1990). Certains d'entre eux étaient ensuite placés en environnement enrichi 6 heures par jour pendant 14 jours à partir de P76. Divers tests comportementaux et évaluations neuro-anatomiques et électrophysiologiques étaient ensuite réalisés. Les rats « dépressifs » présentaient des troubles de la mémoire spatiale, une augmentation de leur phénotype anxieux, ainsi qu'une hypotrophie du gyrus denté et une hypertrophie amygdalienne, associées à une baisse de la LTP. L'exposition courte à un environnement enrichi permettait de reverser totalement ce phénotype (Mahati, Bhagya et al. 2016). Si l'environnement enrichi (ou la stimulation cognitive ?) semble être un possible outil thérapeutique de la dépression endogène du sujet jeune, il se pourrait qu'il puisse également prévenir la survenue de dépression du sujet âgé.

Au vu de nos résultats, il apparaît nécessaire de tester cette hypothèse sur des souris SAMR1-EE âgées, afin de déterminer si l'environnement enrichi apporte un bénéfice thymique uniquement chez les souris SAMP8, et donc un terrain fragilisé, ou bien chez toute souris âgée au vieillissement normal.

Conclusion et perspectives :

L'environnement enrichi semble améliorer la thymie, la désinhibition et les capacités mnésiques des souris SAMP8. Mais l'effet serait temporaire et partiel selon less données comportementales analysées ici. Il semblerait que l'environnement enrichi puisse participer à réduire la fragilité des souris SAMP8 essentiellement sur le plan émotionnel. Les patients souffrant de la maladie d'Alzheimer présentent fréquemment des symptômes psycho-comportementaux très invalidants, généralement en début de maladie, et parfois à des stades asymptomatiques sur le plan cognitif (Jost and Grossberg 1996). Les mesures comportementales, plutôt que médicamenteuses, pourraient donc constituer un élément essentiel dans la prise en charge de ces patients. Cela permettrait de limiter la iatrogénie médicamenteuse induite par l'usage souvent massif de psychotropes pour traiter les troubles psycho-comportementaux liés à la démence. Les données recueillies ici sont un argument supplémentaire pour proposer des traitements non médicamenteux en tout début de la maladie.

Cependant lorsque le vieillissement est trop avancé, l'environnement enrichi ne semble plus permettre de limiter les troubles. Il nous semble ici essentiel de trouver des marqueurs permettant de prédire ce basculement vers la pathologie, notamment au sein des marqueurs de plasticité synaptique tels que les VGLUTs. Cheng *et aliter* ont déjà mis en évidence une modification de l'expression des VGLUTs dans le système nerveux central des souris SAMP8 (Cheng, Yang et al. 2011). Il a également déjà été mis en évidence une modification de l'expression des VGLUTs dans certains troubles psychiatriques (Tordera, Totterdell et al. 2007; Zink, Vollmayr et al. 2010). Des souris sous-exprimant VGLUT1 présentent par exemple un comportement plus anxieux et « dépressif » (Tordera, Totterdell et al. 2007; Zink, Vollmayr et al. 2010). Il existe en outre une interaction complexe entre le système glutamatergique et GABAergique au cours du vieillissement normal et pathologique (Mora, Segovia et al. 2007). Or ce même équilibre est modifié dans l'hippocampe de rats ayant bénéficié d'un environnement enrichi (Mora-Gallegos, Rojas-Carvajal et al. 2015).

Dans les mois à venir, nous allons explorer le niveau d'expression des VGLUTs et de VIAAT au sein de diverses régions cérébrales essentielles dans les processus cognitifs et

émotionnels des souris (cortex préfrontal, striatum et hippocampe). Ces analyses seront effectuées dans un double but :

 Premièrement nous souhaitons rechercher des marqueurs précoces de dégradation cognitive et/ou émotionnelle chez ces souris SAMP8, modèle de vieillissement cérébral prématuré.

- Deuxièmement nous souhaitons évaluer l'impact de l'environnement enrichi sur ces marqueurs de plasticité synaptique, afin de savoir s'il permet de repousser le moment du basculement du normal vers le pathologique.

Ces analyses sont actuellement en cours.

Nous espérons par ce travail contribuer à une meilleure compréhension des troubles cognitifs et thymiques au cours du vieillissement normal ou pathologique. À plus long terme ce travail pourrait permettre d'identifier de nouvelles cibles pharmacologiques.

Figure 1



« Grip test »

Évaluation de la force musculaire des souris SAMP8 en environnement enrichi (EE), SAMP8 (NE) et SAMR1 en environnement normal âgées de 4, 6 et 9 mois. Le nombre de souris utilisées dans chaque groupe figure en blanc entre parenthèse dans les barres respectives. Il n'existe pas de différence significative entre les groupes SAMP8-EE et SAMP8-NE à 4, 6 et 9 mois (test de Fisher, respectivement valeur de p = 0.05, 0.57, 0.14); entre les groupes SAMP8-EE et SAMR1 à 4, 6 et 9 mois (test de Fisher, respectivement valeur de p = 0.56, 0.17, 0.07) et entre les groupes SAMP8-NE et SAMR1 à 4, 6 et 9 mois (test de Fisher, respectivement valeur de p = 0.12, 0.36, 0.81).





Piscine de Morris en référentiel égocentrique

Mesure de la latence de temps moyenne (en secondes) entre le début du test et le moment où la souris trouve la plateforme chaque jour (J1 à 4) dans le test de la piscine de Morris en référentiel égocentrique. Le test a été réalisé avec des souris SAMP8 élevée en environnement enrichi (SAMP8-EE) ou en environnement normal (SAMP8-NE) et des souris SAMR1 élevée en environnement normal (SAMR1-NE) à 4 mois (A), 6 mois (b) et 9 mois (c). Le nombre de souris utilisées dans chaque groupe était de : Souris SAMP8-EE âgée de: 4 mois, n=13 ; 6 mois, n=19 ; 9 mois, n=13. (B) Souris SAMP8-NE âgées de : 4 mois, n=12 ; 6 mois, n=25 ; 9 mois, n=11. (c) Souris SAMR1 âgées de : 4 mois, n=14 ; 6 mois, n=22 et 9 mois, n=16.

Concernant le profil d'apprentissage au cours des 4 jours successifs de test, il existe des différences significatives entre les groupes SAMP8-EE et SAMP8-NE à 4 mois (test de Fisher, valeur de p=0.04) et 6 mois (test de Fisher, valeur de p=0.007), et non significatives à 9 mois (test de Fisher, valeur de p=0.13). Il n'existe pas de différence significative entre les groupes SAMP8-EE et SAMR1 à 4 mois (test de Fisher, valeur de p=0.15), à 6 mois (test de Fisher, valeur de p=0.09) ni à 9 mois (test de Fisher, valeur de p=0.21). Il n'existe pas de différence significative entre les groupes SAMP8-EE et SAMR1 à 4 mois (test de Fisher, valeur de p=0.21). Il n'existe pas de différence significative entre les groupes SAMP8-NE et SAMR1 à 4 mois (test de Fisher, valeur de p=0.59), à 6 mois (test de Fisher, valeur de p=0.29) ni à 9 mois (test de Fisher, valeur de p=0.29) ni à 9 mois (test de Fisher, valeur de p=0.74).

Chaque point représente la moyenne \pm SEM. * p < 0.05.

Figure 3



Piscine de Morris en référentiel allocentrique.

Mesure de la latence moyenne en secondes, temps entre le début du test et le moment où la souris trouve la plateforme, chaque jour lors de l'apprentissage (J1 à 5) et lors des tests de rétention (PT1 le 5^{ème} jour, et PT2 48h après la fin de la phase d'apprentissage). dans le test de la piscine de Morris en référentiel allocentrique, chez des souris âgées de 4 mois SAMP8-EE (n=13), SAMP8-NE (n=12) et SAMR1 (n=14) (A), chez des souris âgées de 6 mois SAMP8-EE (n=19), SAMP8-NE (n=25) et SAMR1 (n=22) (B), et chez des souris âgées de 9 mois SAMP8-EE (n=13), SAMP8-NE (n=11) et SAMR1 (n=16) (C). Concernant le profil d'apprentissage au cours des 5 jours successifs d'apprentissage, il existe des différences significatives entre les groupes SAMP8-EE et SAMP8-NE à 4 mois (test de Fisher, valeur de p = 0.02) et 6 mois (test de Fisher, valeur de p = 0.01), et non significatives à 9 mois (test de Fisher, valeur de p = 0.26). Il n'existe pas de différence significative entre les groupes SAMP8-EE et SAMR1 à 4 mois (test de Fisher, valeur de p = 0.16), à 6 mois (test de Fisher, valeur de p = 0.64) ni à 9 mois (test de Fisher, valeur de p = 0.84). Il n'existe pas de différence significative entre les groupes SAMP8-NE et SAMR1 à 4 mois (test de Fisher, valeur de p = 0.33), mais une différence significative à 6 mois (test de Fisher, valeur de p = 0.33), mais une différence significative à 6 mois (test de Fisher, valeur de p = 0.33).

groupes SAMP8-EE et SAMP8-NE à 4 mois (test de Fisher, valeur de p = 0.02), et non significative à 6 et 9 mois (test de Fisher, respectivement valeur de p = 0.16 et 0.36). Il n'existe pas des différences significatives entre les groupes SAMP8-EE et SAMR1 à 4 mois (test de Fisher, valeur de p = 0.03), mais non significatives à 6 mois (test de Fisher, valeur de p = 0.48) et à 9 mois (test de Fisher, valeur de p = 0.85). Il n'existe pas de différence significative entre les groupes SAMP8-NE et SAMR1 à 4 mois (test de Fisher, valeur de p = 0.9), à 6 mois (test de Fisher, valeur de p = 0.48), ni à 9 mois (test de Fisher, valeur de p = 0.45).

Pour les comparaisons des moyennes des latences entre les groupes chaque jour : Tests de Fisher : * (bleu) = comparaison entre les souris SAMP8-EE et SAMP-NE valeur de p < 0.05; * (vert) = comparaison entre les souris SAMP8-EE et SAMR1 valeur de p < 0.05; * (rouge) = comparaison entre les souris SAMP8-NE et SAMR1 valeur de p < 0.05.

Figure 4



Labyrinthe en croix surélevé.

Pourcentage de temps passé dans les bras ouverts (A) et nombre d'entrée (B) des souris SAMP8 élevée en environnement enrichi (EE) ou normal (NE) et des souris SAMR1 maintenue en milieu non enrichi, âgées de 4, 6 et 9 mois.

À 4 mois, les souris SAMP8-NE reste significativement plus longtemps dans les bras ouverts que les souris SAMP8-EE et SAMR1-NE. À 6 mois les différences ne sont plus significatives (test de Fisher, comparaison des groupes SAMP8-EE et SAMP8-NE valeur de p = 0.48, SAMP8-EE et SAMR1 valeur de p = 0.25, SAMP8-NE et SAMR1 valeur de p =0.63). Il en va de même à 9 mois (test de Fisher, comparaison des groupes SAMP8-EE et SAMP8-NE valeur de p = 0.73, SAMP8-EE et SAMR1 valeur de p = 0.43, SAMP8-NE et SAMP8-NE valeur de p = 0.27).

À 4 mois, les souris SAMP8-NE réalisent significativement plus d'entrées dans les bras ouverts que les souris SAMP8-EE et SAMR1. À 6 mois les différences ne sont plus significatives (test de Fisher, comparaison des groupes SAMP8-EE et SAMP8-NE valeur de p = 0.16, SAMP8-EE et SAMR1 valeur de p = 0.9, SAMP8-NE et SAMR1 valeur de p =0.12). Il en va de même à 9 mois (test de Fisher, comparaison des groupes SAMP8-EE et SAMP8-NE valeur de p = 0.6, SAMP8-EE et SAMR1 valeur de p = 0.68, SAMP8-NE et SAMP8-NE valeur de p = 0.48).





Test de suspension par la queue

(A) Latence entre le début du test et la première période d'immobilité des souris. (B) Temps d'immobilité total durant le test. (C) Nombre de périodes d'immobilité au cours du test de suspension par la queue chez des souris SAMP8-EE, SAMP8-NE et SAMR1 âgées de 4, 6 et 9 mois.

À 4 mois il n'est observé aucune différence significative entre les différents groupes concernant la latence (test de Fisher, comparaison des groupes SAMP8-EE et SAMP8-NE valeur de p = 0.21, comparaison SAMP8-EE et SAMR1 valeur de p = 0.26, comparaison SAMP8-NE et SAMR1 valeur de p = 0.83). De même, pour le temps d'immobilité (test de Fisher, comparaison des groupes SAMP8-EE et SAMP8-NE valeur de p = 0.38, comparaison SAMP8-EE et SAMR1 valeur de p = 0.07, comparaison SAMP8-NE et SAMR1 valeur de p = 0.41). Enfin, le nombre de périodes d'immobilité n'est pas statistiquement différent entre les 3 groupes (test de Fisher, comparaison des groupes SAMP8-EE et SAMP8-NE valeur de p = 0.87, comparaison SAMP8-EE et SAMR1 valeur de p = 0.45, comparaison SAMP8-NE et SAMR1 valeur de p = 0.39).

À 6 mois, nous observons une augmentation significative de la latence et une baisse significative du temps d'immobilité ainsi que du nombre de périodes d'immobilité chez les souris SAMP8-EE en comparaison aux souris SAMP8-NE et SAMR1 (Tests de Fisher, pour la latence : comparaison des groupes SAMP8-EE et SAMP8-NE valeur de p = 0.002, comparaison SAMP8-EE et SAMR1 valeur de p = 0.001, comparaison SAMP8-NE et SAMR1 valeur de p = 0.29) (Tests de Fisher pour le temps d'immobilité comparaison des groupes SAMP8-EE et SAMR1 valeur de p = 0.004, SAMP8-EE et SAMR1 valeur de p =0.08, SAMP8-NE et SAMR1 valeur de p = 0.26) (Tests de Fisher pour le nombre de périodes d'immobilité comparaison des groupes SAMP8-EE et SAMP8-NE valeur de p = 0.03, comparaison SAMP8-EE et SAMR1 valeur de p = 0.0004, comparaison SAMP8-NE et SAMR1 valeur de p =0.08).

Ces différences disparaissent à 9 mois pour la latence (test de Fisher, comparaison des groupes SAMP8-EE et SAMP8-NE valeur de p = 0.28, comparaison SAMP8-EE et SAMR1 valeur de p = 0.59, comparaison SAMP8-NE et SAMR1 valeur de p = 0.12), le temps d'immobilité (test de Fisher, comparaison des groupes SAMP8-EE et SAMP8-NE valeur de p = 0.16, comparaison SAMP8-EE et SAMR1 valeur de p = 0.9, comparaison SAMP8-NE et SAMR1 valeur de p = 0.9, comparaison SAMP8-NE et SAMR1 valeur de p = 0.12) et le nombre de périodes d'immobilité (test de Fisher, comparaison des groupes SAMP8-NE valeur de p = 0.07, comparaison SAMP8-EE et SAMP8-NE valeur de p = 0.07, comparaison SAMP8-EE et SAMP8-NE et SAMR1 valeur de p = 0.62, comparaison SAMP8-NE et SAMR1 valeur de p = 0.14).

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les VGLUTs constituent un système complexe, intervenant dans des processus normaux et pathologiques très variés.

De par sa présence dans des neurones théoriquement non-glutamatergiques, VGLUT3 est un VGLUT pléomorphe et atypique. Sa découverte a permis de mettre en évidence des fonctions insoupçonnées du glutamate comme la synergie vésiculaire. Sa possible implication dans un processus autophagique pourrait lui conférer la capacité d'intervenir dans le vieillissement prématuré des cellules ciliées internes entrainant la surdité DFNA25. L'autophagie est impliquée dans divers processus de développement (Berry and Baehrecke 2007; Kwon, Cho et al. 2010; Denton, Nicolson et al. 2012). En facilitant la transmission sérotoninergique dans le raphé, VGLUT3 influence le phénotype anxieux mais également le développement respiratoire et l'adaptation au stress hypoxique néonatal. L'étude de l'ontogenèse révèle que l'apparition des VGLUTs est synchrone à la synaptogenèse chez les mammifères (Tabb and Ueda 1991). Or cette dernière est également essentielle dans la maturation du système respiratoire néonatal. On peut donc se poser la question d'une éventuelle intervention de VGLUT3 dans l'autophagie néonatale.

L'autophagie est un mécanisme très conservé au cours de l'évolution (Chen and Yu 2013). Elle est décrite aussi bien dans des organismes procaryotes qu'eucaryotes, et constitue une fonction cellulaire phylogénétiquement très ancienne. Les VGLUTs sont pour leur part d'apparition plus récente. En 2010, un nouveau VGLUT a été identifié chez la lamproie (IVGLUT) distinct des trois autres VGLUTs des mammifères. La différenciation de ce lVGLUT des VGLUT1-3 a en effet eu lieu avant la fixation phylogénétique entre les cyclostomes et les gnathostomes, faisant des VGLUTs une caractéristique ancestrale des vertébrés (Villar-Cervino, Rocancourt et al. 2010). L'analyse de l'arbre phylogénétique des VGLUTs laisse envisager une apparition antérieure à la différenciation entre invertébrés et vertébrés des VGLUTs actuellement identifiés. Chez les invertébrés, il n'est pas retrouvé d'isoformes tels que les 3 VGLUTs mais un VGLUT chaque fois spécifique à une espèce donnée. Au sein des vertébrés, VGLUT3 se différencie pour sa part plus précocement que VGLUT2 et VGLUT1. Il est intéressant de noter que le motif touché par la mutation décrite dans la surdité DFNA25 (KWAPPLER) est parfaitement conservé chez les vertébrés. On le retrouve en partie chez les invertébrés, devenant YWAPPLMER chez Caenorhabditis (nématode),

FWAPPLMER chez la drosophile et HWAPPLER chez la lymnée (gastéropode d'eau douce) (Villar-Cervino, Rocancourt et al. 2010).

Cette possible fonction autophagique « fossile » de VGLUT3 pourrait-elle s'expliquer par son caractère plus ancestral que les autres VGLUTs ? La réponse à cette question est sans doute négative étant donne que le motif KWAPPLER est conservé par les trois VGLUTs. Pourrait-on également trouver cette fonction parmi les VGLUTs des invertébrés, le motif étant très proche et l'alanine conservée dans cette branche phylogénétique? Il est à présent bien prouvé que les VGLUTs interviennent dans le développement embryonnaire de tous les organismes les exprimant, et plus particulièrement au sein de leur système nerveux central. Pourraient-ils intervenir bien au delà de la régulation de la transmission glutamatergique ? Et notamment en participant directement ou indirectement aux processus de survie et de mort cellulaire en jeu lors du développement embryonnaire et néonatal ?

Les VGLUTs et plus particulièrement VGLUT3 semblent être des senseurs de l'adaptabilité, tant au cours du développement précoce que du vieillissement, participant ainsi à la capacité de l'organisme de s'adapter à des conditions extrêmes.

RÉFÉRENCES

Abadie, V., J. Champagnat and G. Fortin (2000). "Branchiomotor activities in mouse embryo." <u>Neuroreport</u> **11**(1): 141-145.

Adams, J. M. and S. Cory (2007). "The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy." <u>Oncogene</u> **26**(9): 1324-1337.

Aihara, Y., H. Mashima, H. Onda, S. Hisano, H. Kasuya, T. Hori, S. Yamada, H. Tomura, Y. Yamada, I. Inoue, I. Kojima and J. Takeda (2000). "Molecular cloning of a novel braintype Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter." <u>J Neurochem</u> **74**(6): 2622-2625.

Alenina, N., D. Kikic, M. Todiras, V. Mosienko, F. Qadri, R. Plehm, P. Boye, L. Vilianovitch, R. Sohr, K. Tenner, H. Hortnagl and M. Bader (2009). "Growth retardation and altered autonomic control in mice lacking brain serotonin." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **106**(25): 10332-10337.

Allain, A. E., P. Meyrand and P. Branchereau (2005). "Ontogenic changes of the spinal GABAergic cell population are controlled by the serotonin (5-HT) system: implication of 5-HT1 receptor family." <u>J Neurosci</u> **25**(38): 8714-8724.

Almqvist, J., Y. Huang, A. Laaksonen, D. N. Wang and S. Hovmoller (2007). "Docking and homology modeling explain inhibition of the human vesicular glutamate transporters." <u>Protein Sci</u> **16**(9): 1819-1829.

Altieri, D. C. (2010). "Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms." <u>Biochem</u> **J 430**(2): 199-205.

Alvarez-Garcia, O., I. Vega-Naredo, V. Sierra, B. Caballero, C. Tomas-Zapico, A. Camins, J. J. Garcia, M. Pallas and A. Coto-Montes (2006). "Elevated oxidative stress in the brain of senescence-accelerated mice at 5 months of age." <u>Biogerontology</u> **7**(1): 43-52.

Amano, T., H. Nakanishi, M. Oka and K. Yamamoto (1995). "Increased expression of cathepsins E and D in reactive microglial cells associated with spongiform degeneration in the brain stem of senescence-accelerated mouse." <u>Exp Neurol</u> **136**(2): 171-182.

American Psychiatric Association. (2013). DSM-V. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. Fifth edition. Arlington: APA.

Amiel, J., V. Dubreuil, N. Ramanantsoa, G. Fortin, J. Gallego, J. F. Brunet and C. Goridis (2009). "PHOX2B in respiratory control: lessons from congenital central hypoventilation syndrome and its mouse models." <u>Respir Physiol Neurobiol</u> **168**(1-2): 125-132.

Amilhon, B., E. Lepicard, T. Renoir, R. Mongeau, D. Popa, O. Poirel, S. Miot, C. Gras, A. M. Gardier, J. Gallego, M. Hamon, L. Lanfumey, B. Gasnier, B. Giros and S. El Mestikawy (2010). "VGLUT3 (vesicular glutamate transporter type 3) contribution to the regulation of serotonergic transmission and anxiety." <u>J Neurosci</u> **30**(6): 2198-2210.

Bai, L., H. Xu, J. F. Collins and F. K. Ghishan (2001). "Molecular and functional analysis of a novel neuronal vesicular glutamate transporter." <u>J Biol Chem</u> **276**(39): 36764-36769.

Bayram, B., S. Nikolai, P. Huebbe, B. Ozcelik, S. Grimm, T. Grune, J. Frank and G. Rimbach (2013). "Biomarkers of oxidative stress, antioxidant defence and inflammation are altered in the senescence-accelerated mouse prone 8." <u>Age (Dordr)</u> **35**(4): 1205-1217.

Bellocchio, E. E., H. Hu, A. Pohorille, J. Chan, V. M. Pickel and R. H. Edwards (1998). "The localization of the brain-specific inorganic phosphate transporter suggests a specific presynaptic role in glutamatergic transmission." <u>J Neurosci</u> **18**(21): 8648-8659.

Bellocchio, E. E., R. J. Reimer, R. T. Fremeau, Jr. and R. H. Edwards (2000). "Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter." <u>Science</u> **289**(5481): 957-960.

Belmin, J., Sebban C. (2005) Physiologie du vieillissement, in *Gérontologie pour le praticien*, Ed Masson, p8-20.

Bernard C. (1878) Leçons sur les phénomènes de la vie communs aux animaux et aux végétaux, tome premier, J.-B. Baillière et fils, seconde édition, 1885.

Berry, D. L. and E. H. Baehrecke (2007). "Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in Drosophila." <u>Cell</u> **131**(6): 1137-1148.

Berube-Carriere, N., M. Riad, G. Dal Bo, D. Levesque, L. E. Trudeau and L. Descarries (2009). "The dual dopamine-glutamate phenotype of growing mesencephalic neurons regresses in mature rat brain." <u>J Comp Neurol</u> **517**(6): 873-891.

Bhutia, S. K., S. Mukhopadhyay, N. Sinha, D. N. Das, P. K. Panda, S. K. Patra, T. K. Maiti, M. Mandal, P. Dent, X. Y. Wang, S. K. Das, D. Sarkar and P. B. Fisher (2013). "Autophagy: cancer's friend or foe?" <u>Adv Cancer Res</u> **118**: 61-95.

Bierer, L. M., V. Haroutunian, S. Gabriel, P. J. Knott, L. S. Carlin, D. P. Purohit, D. P. Perl, J. Schmeidler, P. Kanof and K. L. Davis (1995). "Neurochemical correlates of dementia severity in Alzheimer's disease: relative importance of the cholinergic deficits." <u>J Neurochem</u> **64**(2): 749-760.

Blanchi, B., L. M. Kelly, J. C. Viemari, I. Lafon, H. Burnet, M. Bevengut, S. Tillmanns, L. Daniel, T. Graf, G. Hilaire and M. H. Sieweke (2003). "MafB deficiency causes defective respiratory rhythmogenesis and fatal central apnea at birth." <u>Nat Neurosci</u> **6**(10): 1091-1100.

Bollen, B., M. Bouslama, B. Matrot, Y. Rotrou, G. Vardon, F. Lofaso, O. Van den Bergh, R. D'Hooge and J. Gallego (2009). "Cold stimulates the behavioral response to hypoxia in newborn mice." <u>Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol</u> **296**(5): R1503-1511.

Bouccara D. et al. (2005) Presbyacousie. EMC consult.

Boulland, J. L., T. Qureshi, R. P. Seal, A. Rafiki, V. Gundersen, L. H. Bergersen, R. T. Fremeau, Jr., R. H. Edwards, J. Storm-Mathisen and F. A. Chaudhry (2004). "Expression of the vesicular glutamate transporters during development indicates the widespread corelease of multiple neurotransmitters." J Comp Neurol **480**(3): 264-280.

Bouvier, J., M. Thoby-Brisson, N. Renier, V. Dubreuil, J. Ericson, J. Champagnat, A. Pierani, A. Chedotal and G. Fortin (2010). "Hindbrain interneurons and axon guidance signaling critical for breathing." <u>Nat Neurosci</u> **13**(9): 1066-1074.

Bowman, E. J., A. Siebers and K. Altendorf (1988). "Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **85**(21): 7972-7976.

Bradford, H. F. and H. K. Ward (1976). "On glutaminase activity in mammalian synaptosomes." <u>Brain Res</u> **110**(1): 115-125.

Bras, H., S. P. Gaytan, P. Portalier, S. Zanella, R. Pasaro, P. Coulon and G. Hilaire (2008). "Prenatal activation of 5-HT2A receptor induces expression of 5-HT1B receptor in phrenic motoneurons and alters the organization of their premotor network in newborn mice." <u>Eur J Neurosci</u> **28**(6): 1097-1107.

Buée, L., Maurage, C.A. (2008) Le vieillissement : des molecules, des cellules et des structures cérébrales en involution, in *Neuropyshcologie du vieillissement nomal et pathologique*, Ed Masson, p11-26.

Butterfield, D. A. and C. B. Pocernich (2003). "The glutamatergic system and Alzheimer's disease: therapeutic implications." <u>CNS Drugs</u> **17**(9): 641-652.

Butterfield, D. A. and H. F. Poon (2005). "The senescence-accelerated prone mouse (SAMP8): a model of age-related cognitive decline with relevance to alterations of the gene expression and protein abnormalities in Alzheimer's disease." <u>Exp Gerontol</u> **40**(10): 774-783.

Campbell, V. A., J. E. Crews, D. G. Moriarty, M. M. Zack and D. K. Blackman (1999). "Surveillance for sensory impairment, activity limitation, and health-related quality of life among older adults--United States, 1993-1997." <u>MMWR CDC Surveill Summ</u> **48**(8): 131-156.

Campisi, J. (2013). "Aging, cellular senescence, and cancer." <u>Annu Rev Physiol</u> **75**: 685-705.

Canudas, A. M., J. Gutierrez-Cuesta, M. I. Rodriguez, D. Acuna-Castroviejo, F. X. Sureda, A. Camins and M. Pallas (2005). "Hyperphosphorylation of microtubuleassociated protein tau in senescence-accelerated mouse (SAM)." <u>Mech Ageing Dev</u> **126**(12): 1300-1304. Carson, S., M. S. McDonagh and K. Peterson (2006). "A systematic review of the efficacy and safety of atypical antipsychotics in patients with psychological and behavioral symptoms of dementia." <u>J Am Geriatr Soc</u> **54**(2): 354-361.

Caubit, X., M. Thoby-Brisson, N. Voituron, P. Filippi, M. Bevengut, H. Faralli, S. Zanella, G. Fortin, G. Hilaire and L. Fasano (2010). "Teashirt 3 regulates development of neurons involved in both respiratory rhythm and airflow control." <u>J Neurosci</u> **30**(28): 9465-9476.

Cerpa, V. J., L. Aylwin Mde, S. Beltran-Castillo, E. U. Bravo, I. R. Llona, G. B. Richerson and J. L. Eugenin (2015). "The Alteration of Neonatal Raphe Neurons by Prenatal-Perinatal Nicotine. Meaning for Sudden Infant Death Syndrome." <u>Am J Respir Cell Mol</u> <u>Biol</u> **53**(4): 489-499.

Chandra, T. and K. Kirschner (2016). "Chromosome organisation during ageing and senescence." <u>Curr Opin Cell Biol</u> **40**: 161-167.

Chang, N. C., M. Nguyen, M. Germain and G. C. Shore (2010). "Antagonism of Beclin 1dependent autophagy by BCL-2 at the endoplasmic reticulum requires NAF-1." <u>EMBO J</u> **29**(3): 606-618.

Chen, G. H., Y. J. Wang, X. M. Wang and J. N. Zhou (2004). "Accelerated senescence prone mouse-8 shows early onset of deficits in spatial learning and memory in the radial six-arm water maze." <u>Physiol Behav</u> **82**(5): 883-890.

Chen, X., W. Li, J. Ren, D. Huang, W. T. He, Y. Song, C. Yang, W. Li, X. Zheng, P. Chen and J. Han (2014). "Translocation of mixed lineage kinase domain-like protein to plasma membrane leads to necrotic cell death." <u>Cell Res</u> **24**(1): 105-121.

Chen, Y., Z. Yang, M. Meng, Y. Zhao, N. Dong, H. Yan, L. Liu, M. Ding, H. B. Peng and F. Shao (2009). "Cullin mediates degradation of RhoA through evolutionarily conserved BTB adaptors to control actin cytoskeleton structure and cell movement." <u>Mol Cell</u> **35**(6): 841-855.

Chen, Y. and L. Yu (2013). "Autophagic lysosome reformation." <u>Exp Cell Res</u> **319**(2): 142-146.

Cheng, E. H., M. C. Wei, S. Weiler, R. A. Flavell, T. W. Mak, T. Lindsten and S. J. Korsmeyer (2001). "BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis." <u>Mol Cell</u> **8**(3): 705-711.

Cheng, X. R., Y. Yang, W. X. Zhou and Y. X. Zhang (2011). "Expression of VGLUTs contributes to degeneration and acquisition of learning and memory." <u>Neurobiol Learn</u> <u>Mem</u> **95**(3): 361-375.

Childs, B. G., D. J. Baker, T. Wijshake, C. A. Conover, J. Campisi and J. M. van Deursen (2016). "Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis." <u>Science</u> **354**(6311): 472-477.

Christensen, E. D., J. Berger, M. M. Alashari, H. Coon, C. Robison, H. T. Ho, D. R. Adams, W. A. Gahl, K. R. Smith, J. M. Opitz and D. R. Johnson (2016). "Sudden infant death "syndrome"-Insights and future directions from a Utah population database analysis." <u>Am J Med Genet A</u>.

Chung, H. R., M. Vakil, M. Munroe, A. Parikh, B. M. Meador, P. T. Wu, J. H. Jeong, J. A. Woods, K. R. Wilund and M. D. Boppart (2016). "The Impact of Exercise on Statin-Associated Skeletal Muscle Myopathy." <u>PLoS One</u> **11**(12): e0168065.

Clegg, A., J. Young, S. Iliffe, M. O. Rikkert and K. Rockwood (2013). "Frailty in elderly people." <u>Lancet</u> **381**(9868): 752-762.

Collier, T. J., J. G. Greene, D. L. Felten, S. Y. Stevens and K. S. Collier (2004). "Reduced cortical noradrenergic neurotransmission is associated with increased neophobia and impaired spatial memory in aged rats." <u>Neurobiol Aging</u> **25**(2): 209-221.

Collingridge, G. L., S. Peineau, J. G. Howland and Y. T. Wang (2010). "Long-term depression in the CNS." <u>Nat Rev Neurosci</u> **11**(7): 459-473.

Costantini, C., H. Scrable and L. Puglielli (2006). "An aging pathway controls the TrkA to p75NTR receptor switch and amyloid beta-peptide generation." <u>EMBO J</u> **25**(9): 1997-2006.

Coucke, P. J., P. Van Hauwe, P. M. Kelley, H. Kunst, I. Schatteman, D. Van Velzen, J. Meyers, R. J. Ensink, M. Verstreken, F. Declau, H. Marres, K. Kastury, S. Bhasin, W. T.

McGuirt, R. J. Smith, C. W. Cremers, P. Van de Heyning, P. J. Willems, S. D. Smith and G. Van Camp (1999). "Mutations in the KCNQ4 gene are responsible for autosomal dominant deafness in four DFNA2 families." <u>Hum Mol Genet</u> **8**(7): 1321-1328.

Courville, P., M. Quick and R. J. Reimer (2010). "Structure-function studies of the SLC17 transporter sialin identify crucial residues and substrate-induced conformational changes." J Biol Chem **285**(25): 19316-19323.

Cruickshanks, K. J., T. L. Wiley, T. S. Tweed, B. E. Klein, R. Klein, J. A. Mares-Perlman and D. M. Nondahl (1998). "Prevalence of hearing loss in older adults in Beaver Dam, Wisconsin. The Epidemiology of Hearing Loss Study." <u>Am J Epidemiol</u> **148**(9): 879-886.

Cummings, J. L. (2004). "Alzheimer's disease." <u>N Engl J Med</u> **351**(1): 56-67.

Cummings, K. J. (2016). "Aspiring to inspire - serotonin, the laryngeal chemoreflex and the sudden infant death syndrome." <u>Exp Physiol</u> **101**(7): 790.

Cummings, K. J., K. G. Commons, J. C. Hewitt, J. A. Daubenspeck, A. Li, H. C. Kinney and E. E. Nattie (2011). "Failed heart rate recovery at a critical age in 5-HT-deficient mice exposed to episodic anoxia: implications for SIDS." <u>J Appl Physiol (1985)</u> **111**(3): 825-833.

Dal Bo, G., N. Berube-Carriere, J. A. Mendez, D. Leo, M. Riad, L. Descarries, D. Levesque and L. E. Trudeau (2008). "Enhanced glutamatergic phenotype of mesencephalic dopamine neurons after neonatal 6-hydroxydopamine lesion." <u>Neuroscience</u> **156**(1): 59-70.

Danbolt, N. C. (2001). "Glutamate uptake." Prog Neurobiol 65(1): 1-105.

Daniels, R. W., C. A. Collins, K. Chen, M. V. Gelfand, D. E. Featherstone and A. DiAntonio (2006). "A single vesicular glutamate transporter is sufficient to fill a synaptic vesicle." <u>Neuron</u> **49**(1): 11-16.

Daumas, S., J. Sandin, K. S. Chen, D. Kobayashi, J. Tulloch, S. J. Martin, D. Games and R. G. Morris (2008). "Faster forgetting contributes to impaired spatial memory in the PDAPP mouse: deficit in memory retrieval associated with increased sensitivity to interference?" <u>Learn Mem</u> **15**(9): 625-632.

Davanipour, Z., N. M. Lu, M. Lichtenstein and K. S. Markides (2000). "Hearing problems in Mexican American elderly." <u>Am J Otol</u> **21**(2): 168-172.

Dejean, L. M., S. Martinez-Caballero, L. Guo, C. Hughes, O. Teijido, T. Ducret, F. Ichas, S. J. Korsmeyer, B. Antonsson, E. A. Jonas and K. W. Kinnally (2005). "Oligomeric Bax is a component of the putative cytochrome c release channel MAC, mitochondrial apoptosis-induced channel." <u>Mol Biol Cell</u> **16**(5): 2424-2432.

del Valle, J., S. Bayod, A. Camins, C. Beas-Zarate, D. A. Velazquez-Zamora, I. Gonzalez-Burgos and M. Pallas (2012). "Dendritic spine abnormalities in hippocampal CA1 pyramidal neurons underlying memory deficits in the SAMP8 mouse model of Alzheimer's disease." <u>J Alzheimers Dis</u> **32**(1): 233-240.

Del Valle, J., J. Duran-Vilaregut, G. Manich, A. Camins, M. Pallas, J. Vilaplana and C. Pelegri (2009). "Time-course of blood-brain barrier disruption in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) mice." <u>Int J Dev Neurosci</u> **27**(1): 47-52.

Del Valle, J., J. Duran-Vilaregut, G. Manich, G. Casadesus, M. A. Smith, A. Camins, M. Pallas, C. Pelegri and J. Vilaplana (2010). "Early amyloid accumulation in the hippocampus of SAMP8 mice." <u>J Alzheimers Dis</u> **19**(4): 1303-1315.

del Valle, J., J. Duran-Vilaregut, G. Manich, M. Pallas, A. Camins, J. Vilaplana and C. Pelegri (2011). "Cerebral amyloid angiopathy, blood-brain barrier disruption and amyloid accumulation in SAMP8 mice." <u>Neurodegener Dis</u> **8**(6): 421-429.

Deng, L., J. Yao, C. Fang, N. Dong, B. Luscher and G. Chen (2007). "Sequential postsynaptic maturation governs the temporal order of GABAergic and glutamatergic synaptogenesis in rat embryonic cultures." <u>J Neurosci</u> **27**(40): 10860-10869.

Denton, D., S. Nicolson and S. Kumar (2012). "Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts." <u>Cell Death Differ</u> **19**(1): 87-95.

Dobarro, M., L. Orejana, N. Aguirre and M. J. Ramirez (2013). "Propranolol restores cognitive deficits and improves amyloid and Tau pathologies in a senescence-accelerated mouse model." <u>Neuropharmacology</u> **64**: 137-144.

Donnelly, W. T., D. Bartlett, Jr. and J. C. Leiter (2016). "Serotonin in the solitary tract nucleus shortens the laryngeal chemoreflex in anaesthetized neonatal rats." <u>Exp Physiol</u> **101**(7): 946-961.

Duan, P. and L. F. Bonewald (2016). "The role of the wnt/beta-catenin signaling pathway in formation and maintenance of bone and teeth." <u>Int J Biochem Cell Biol</u> **77**(Pt A): 23-29.

Dujardin K., Lemaire P. (2008) Neurophysiologie du vieillissement normal et pathologique, Elsevier Masson, Paris.

Duncan, J. R., D. S. Paterson, J. M. Hoffman, D. J. Mokler, N. S. Borenstein, R. A. Belliveau, H. F. Krous, E. A. Haas, C. Stanley, E. E. Nattie, F. L. Trachtenberg and H. C. Kinney (2010). "Brainstem serotonergic deficiency in sudden infant death syndrome." JAMA **303**(5): 430-437.

Edwards, R. H. (2007). "The neurotransmitter cycle and quantal size." <u>Neuron</u> **55**(6): 835-858.

Eiden, L. E. (2000). "The vesicular neurotransmitter transporters: current perspectives and future prospects." <u>FASEB J</u> **14**(15): 2396-2400.

El Mestikawy, S., A. Wallen-Mackenzie, G. M. Fortin, L. Descarries and L. E. Trudeau (2011). "From glutamate co-release to vesicular synergy: vesicular glutamate transporters." <u>Nat Rev Neurosci</u> **12**(4): 204-216.

Elgendy, M., C. Sheridan, G. Brumatti and S. J. Martin (2011). "Oncogenic Rasinduced expression of Noxa and Beclin-1 promotes autophagic cell death and limits clonogenic survival." <u>Mol Cell</u> **42**(1): 23-35.

Ellison, D. W., M. F. Beal, M. F. Mazurek, E. D. Bird and J. B. Martin (1986). "A postmortem study of amino acid neurotransmitters in Alzheimer's disease." <u>Ann Neurol</u> **20**(5): 616-621.

Erickson, J. T., G. Shafer, M. D. Rossetti, C. G. Wilson and E. S. Deneris (2007). "Arrest of 5HT neuron differentiation delays respiratory maturation and impairs neonatal homeostatic responses to environmental challenges." <u>Respir Physiol Neurobiol</u> **159**(1): 85-101.

Eskes, R., S. Desagher, B. Antonsson and J. C. Martinou (2000). "Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane." <u>Mol Cell</u> <u>Biol</u> **20**(3): 929-935.

Eybalin, M. (1993). "Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea." <u>Physiol Rev</u> **73**(2): 309-373.

Farley, S., S. Dumas, S. El Mestikawy and B. Giros (2012). "Increased expression of the Vesicular Glutamate Transporter-1 (VGLUT1) in the prefrontal cortex correlates with differential vulnerability to chronic stress in various mouse strains: effects of fluoxetine and MK-801." <u>Neuropharmacology</u> **62**(1): 503-517.

Favre-Besse, F. C., O. Poirel, T. Bersot, E. Kim-Grellier, S. Daumas, S. El Mestikawy, F. C. Acher and N. Pietrancosta (2014). "Design, synthesis and biological evaluation of small-azo-dyes as potent Vesicular Glutamate Transporters inhibitors." <u>Eur J Med Chem</u> **78**: 236-247.

Feng, W., S. Huang, H. Wu and M. Zhang (2007). "Molecular basis of Bcl-xL's target recognition versatility revealed by the structure of Bcl-xL in complex with the BH3 domain of Beclin-1." <u>J Mol Biol</u> **372**(1): 223-235.

Fenton, M., H. L. Huang, Y. Hong, E. Hawe, D. J. Kurz and J. D. Erusalimsky (2004). "Early atherogenesis in senescence-accelerated mice." <u>Exp Gerontol</u> **39**(1): 115-122.

Flood, J. F., S. A. Farr, F. E. Kaiser and J. E. Morley (1995). "Age-related impairment in learning but not memory in SAMP8 female mice." <u>Pharmacol Biochem Behav</u> **50**(4): 661-664.

Flood, J. F., F. J. Harris and J. E. Morley (1996). "Age-related changes in hippocampal drug facilitation of memory processing in SAMP8 mice." <u>Neurobiol Aging</u> **17**(1): 15-24.

Flood, J. F. and J. E. Morley (1992). "Early onset of age-related impairment of aversive and appetitive learning in the SAM-P/8 mouse." <u>J Gerontol</u> **47**(2): B52-59.

Flood, J. F. and J. E. Morley (1998). "Learning and memory in the SAMP8 mouse." <u>Neurosci Biobehav Rev</u> **22**(1): 1-20.

Flood, J. F., J. E. Morley and M. La Reginna (1993). "Age-related changes in the pharmacological improvement of retention in senescence accelerated mouse (SAM)." <u>Neurobiol Aging</u> **14**(2): 159-166.

Fremeau, R. T., Jr., J. Burman, T. Qureshi, C. H. Tran, J. Proctor, J. Johnson, H. Zhang, D. Sulzer, D. R. Copenhagen, J. Storm-Mathisen, R. J. Reimer, F. A. Chaudhry and R. H. Edwards (2002). "The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **99**(22): 14488-14493.

Fremeau, R. T., Jr., M. D. Troyer, I. Pahner, G. O. Nygaard, C. H. Tran, R. J. Reimer, E. E. Bellocchio, D. Fortin, J. Storm-Mathisen and R. H. Edwards (2001). "The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse." <u>Neuron</u> **31**(2): 247-260.

Fried, L. P., C. M. Tangen, J. Walston, A. B. Newman, C. Hirsch, J. Gottdiener, T. Seeman, R. Tracy, W. J. Kop, G. Burke, M. A. McBurnie and G. Cardiovascular Health Study Collaborative Research (2001). "Frailty in older adults: evidence for a phenotype." J <u>Gerontol A Biol Sci Med Sci</u> **56**(3): M146-156.

Fujibayashi, Y., S. Yamamoto, A. Waki, J. Konishi and Y. Yonekura (1998). "Increased mitochondrial DNA deletion in the brain of SAMP8, a mouse model for spontaneous oxidative stress brain." <u>Neurosci Lett</u> **254**(2): 109-112.

Fujiyama, F., T. Furuta and T. Kaneko (2001). "Immunocytochemical localization of candidates for vesicular glutamate transporters in the rat cerebral cortex." <u>J Comp</u> <u>Neurol</u> **435**(3): 379-387.

Galluzzi, L., I. Vitale, J. M. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, T. M. Dawson, V. L. Dawson, W. S. El-Deiry, S. Fulda, E. Gottlieb, D. R. Green, M. O. Hengartner, O. Kepp, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, X. Lu, F. Madeo, W. Malorni, P. Mehlen, G. Nunez, M. E. Peter, M. Piacentini, D. C. Rubinsztein, Y. Shi, H. U. Simon, P. Vandenabeele, E. White, J. Yuan, B. Zhivotovsky, G. Melino and G. Kroemer (2012). "Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012." <u>Cell Death Differ</u> **19**(1): 107-120.

Gangarossa, G., M. Guzman, V. F. Prado, M. A. Prado, S. Daumas, S. El Mestikawy and E. Valjent (2016). "Role of the atypical vesicular glutamate transporter VGLUT3 in l-DOPA-induced dyskinesia." <u>Neurobiol Dis</u> **87**: 69-79.

Garwood, C. J., L. E. Ratcliffe, J. E. Simpson, P. R. Heath, P. G. Ince and S. B. Wharton (2016). "Review: Astrocytes in Alzheimer's disease and other age-associated dementias; a supporting player with a central role." <u>Neuropathol Appl Neurobiol</u>.

Gasnier, B. (2000). "The loading of neurotransmitters into synaptic vesicles." <u>Biochimie</u> **82**(4): 327-337.

Gaspar, P., O. Cases and L. Maroteaux (2003). "The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics." <u>Nat Rev Neurosci</u> **4**(12): 1002-1012.

Gatto, C. L. and K. Broadie (2010). "Genetic controls balancing excitatory and inhibitory synaptogenesis in neurodevelopmental disorder models." <u>Front Synaptic Neurosci</u> **2**: 4.

Georgakopoulou, E., K. Evangelou, S. Havaki, P. Townsend, P. Kanavaros and V. G. Gorgoulis (2016). "Apoptosis or senescence? Which exit route do epithelial cells and fibroblasts preferentially follow?" <u>Mech Ageing Dev</u> **156**: 17-24.

Gil-Loyzaga, P. and R. Pujol (1988). "Synaptophysin in the developing cochlea." <u>Int J</u> <u>Dev Neurosci</u> **6**(2): 155-160.

Gillespie, D. C., G. Kim and K. Kandler (2005). "Inhibitory synapses in the developing auditory system are glutamatergic." <u>Nat Neurosci</u> **8**(3): 332-338.

Girbovan, C. and H. Plamondon (2013). "Environmental enrichment in female rodents: considerations in the effects on behavior and biochemical markers." <u>Behav</u> <u>Brain Res</u> **253**: 178-190. Gong, Y., L. Liu, B. Xie, Y. Liao, E. Yang and Z. Sun (2008). "Ameliorative effects of lotus seedpod proanthocyanidins on cognitive deficits and oxidative damage in senescence-accelerated mice." <u>Behav Brain Res</u> **194**(1): 100-107.

Gortz, N., L. Lewejohann, M. Tomm, O. Ambree, K. Keyvani, W. Paulus and N. Sachser (2008). "Effects of environmental enrichment on exploration, anxiety, and memory in female TgCRND8 Alzheimer mice." <u>Behav Brain Res</u> **191**(1): 43-48.

Grander, D., P. Kharaziha, E. Laane, K. Pokrovskaja and T. Panaretakis (2009). "Autophagy as the main means of cytotoxicity by glucocorticoids in hematological malignancies." <u>Autophagy</u> **5**(8): 1198-1200.

Granseth, B., F. K. Andersson and S. H. Lindstrom (2015). "The initial stage of reversal learning is impaired in mice hemizygous for the vesicular glutamate transporter (VGluT1)." <u>Genes Brain Behav</u> **14**(6): 477-485.

Grant, L., E. Yi and E. Glowatzki (2010). "Two modes of release shape the postsynaptic response at the inner hair cell ribbon synapse." <u>J Neurosci</u> **30**(12): 4210-4220.

Gras, C., B. Amilhon, E. M. Lepicard, O. Poirel, J. Vinatier, M. Herbin, S. Dumas, E. T. Tzavara, M. R. Wade, G. G. Nomikos, N. Hanoun, F. Saurini, M. L. Kemel, B. Gasnier, B. Giros and S. El Mestikawy (2008). "The vesicular glutamate transporter VGLUT3 synergizes striatal acetylcholine tone." <u>Nat Neurosci</u> **11**(3): 292-300.

Gras, C., E. Herzog, G. C. Bellenchi, V. Bernard, P. Ravassard, M. Pohl, B. Gasnier, B. Giros and S. El Mestikawy (2002). "A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotoninergic neurons." <u>J Neurosci</u> **22**(13): 5442-5451.

Gras, C., J. Vinatier, B. Amilhon, A. Guerci, C. Christov, P. Ravassard, B. Giros and S. El Mestikawy (2005). "Developmentally regulated expression of VGLUT3 during early postnatal life." <u>Neuropharmacology</u> **49**(6): 901-911.

Gregory, F. D., K. E. Bryan, T. Pangrsic, I. E. Calin-Jageman, T. Moser and A. Lee (2011). "Harmonin inhibits presynaptic Cav1.3 Ca(2)(+) channels in mouse inner hair cells." <u>Nat Neurosci</u> **14**(9): 1109-1111.

Gross, A., X. M. Yin, K. Wang, M. C. Wei, J. Jockel, C. Milliman, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and S. J. Korsmeyer (1999). "Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death." J Biol Chem **274**(2): 1156-1163.

Haddad J., Langer B (2004) Médecine foetale et néonatale, éditions Springer, Paris.

Hales, C. A., S. A. Stuart, M. H. Anderson and E. S. Robinson (2014). "Modelling cognitive affective biases in major depressive disorder using rodents." <u>Br J Pharmacol</u> **171**(20): 4524-4538.

Harati, H., A. Barbelivien, K. Herbeaux, M. A. Muller, M. Engeln, C. Kelche, J. C. Cassel and M. Majchrzak (2013). "Lifelong environmental enrichment in rats: impact on emotional behavior, spatial memory vividness, and cholinergic neurons over the lifespan." <u>Age (Dordr)</u> **35**(4): 1027-1043.

Harris, J. (2011). "Autophagy and cytokines." Cytokine 56(2): 140-144.

Hartinger, J. and R. Jahn (1993). "An anion binding site that regulates the glutamate transporter of synaptic vesicles." <u>J Biol Chem</u> **268**(31): 23122-23127.

Hayflick, L. and P. S. Moorhead (1961). "The serial cultivation of human diploid cell strains." <u>Exp Cell Res</u> **25**: 585-621.

He, S., Y. Liang, F. Shao and X. Wang (2011). "Toll-like receptors activate programmed necrosis in macrophages through a receptor-interacting kinase-3-mediated pathway." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **108**(50): 20054-20059.

Hendricks, T. J., D. V. Fyodorov, L. J. Wegman, N. B. Lelutiu, E. A. Pehek, B. Yamamoto, J. Silver, E. J. Weeber, J. D. Sweatt and E. S. Deneris (2003). "Pet-1 ETS gene plays a critical role in 5-HT neuron development and is required for normal anxiety-like and aggressive behavior." <u>Neuron</u> **37**(2): 233-247.

Herzog, E., G. C. Bellenchi, C. Gras, V. Bernard, P. Ravassard, C. Bedet, B. Gasnier, B. Giros and S. El Mestikawy (2001). "The existence of a second vesicular glutamate

transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons." <u>J Neurosci</u> **21**(22): RC181.

Herzog, E., J. Gilchrist, C. Gras, A. Muzerelle, P. Ravassard, B. Giros, P. Gaspar and S. El Mestikawy (2004). "Localization of VGLUT3, the vesicular glutamate transporter type 3, in the rat brain." <u>Neuroscience</u> **123**(4): 983-1002.

Herzog, E., M. Landry, E. Buhler, R. Bouali-Benazzouz, C. Legay, C. E. Henderson, F. Nagy, P. Dreyfus, B. Giros and S. El Mestikawy (2004). "Expression of vesicular glutamate transporters, VGLUT1 and VGLUT2, in cholinergic spinal motoneurons." <u>Eur J Neurosci</u> **20**(7): 1752-1760.

Herzog, E., F. Nadrigny, K. Silm, C. Biesemann, I. Helling, T. Bersot, H. Steffens, R. Schwartzmann, U. V. Nagerl, S. El Mestikawy, J. Rhee, F. Kirchhoff and N. Brose (2011). "In vivo imaging of intersynaptic vesicle exchange using VGLUT1 Venus knock-in mice." J <u>Neurosci</u> **31**(43): 15544-15559.

Higley, M. J., A. H. Gittis, I. A. Oldenburg, N. Balthasar, R. P. Seal, R. H. Edwards, B. B. Lowell, A. C. Kreitzer and B. L. Sabatini (2011). "Cholinergic interneurons mediate fast VGluT3-dependent glutamatergic transmission in the striatum." <u>PLoS One</u> **6**(4): e19155.

Higuchi, K. (1997). "Genetic characterization of senescence-accelerated mouse (SAM)." <u>Exp Gerontol</u> **32**(1-2): 129-138.

Hilaire, G. (2006). "Endogenous noradrenaline affects the maturation and function of the respiratory network: possible implication for SIDS." <u>Auton Neurosci</u> **126-127**: 320-331.

Hilaire, G. and B. Duron (1999). "Maturation of the mammalian respiratory system." <u>Physiol Rev</u> **79**(2): 325-360.

Hilaire, G., N. Voituron, C. Menuet, R. M. Ichiyama, H. H. Subramanian and M. Dutschmann (2010). "The role of serotonin in respiratory function and dysfunction." <u>Respir Physiol Neurobiol</u> **174**(1-2): 76-88.

Hioki, H., F. Fujiyama, K. Nakamura, S. X. Wu, W. Matsuda and T. Kaneko (2004). "Chemically specific circuit composed of vesicular glutamate transporter 3- and preprotachykinin B-producing interneurons in the rat neocortex." <u>Cereb Cortex</u> **14**(11): 1266-1275.

Hioki, H., H. Nakamura, Y. F. Ma, M. Konno, T. Hayakawa, K. C. Nakamura, F. Fujiyama and T. Kaneko (2010). "Vesicular glutamate transporter 3-expressing nonserotonergic projection neurons constitute a subregion in the rat midbrain raphe nuclei." <u>J Comp Neurol</u> **518**(5): 668-686.

Hodges, M. R., S. Best and G. B. Richerson (2011). "Altered ventilatory and thermoregulatory control in male and female adult Pet-1 null mice." <u>Respir Physiol</u> <u>Neurobiol</u> **177**(2): 133-140.

Holler, N., R. Zaru, O. Micheau, M. Thome, A. Attinger, S. Valitutti, J. L. Bodmer, P. Schneider, B. Seed and J. Tschopp (2000). "Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule." <u>Nat Immunol</u> **1**(6): 489-495.

Hong, S. L., A. M. Estrada-Sanchez, S. J. Barton and G. V. Rebec (2016). "Early exposure to dynamic environments alters patterns of motor exploration throughout the lifespan." <u>Behav Brain Res</u> **302**: 81-87.

Hosokawa, M., T. Abe, K. Higuchi, K. Shimakawa, Y. Omori, T. Matsushita, K. Kogishi, E. Deguchi, Y. Kishimoto, K. Yasuoka and T. Takeda (1997). "Management and design of the maintenance of SAM mouse strains: an animal model for accelerated senescence and age-associated disorders." <u>Exp Gerontol</u> **32**(1-2): 111-116.

Hosokawa, M., H. Fujisawa, B. H. Zhu, H. Jujo and K. Higuchi (1997). "In vitro study of the mechanisms of senescence acceleration." <u>Exp Gerontol</u> **32**(1-2): 197-203.

Hsu, Y. T., K. G. Wolter and R. J. Youle (1997). "Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **94**(8): 3668-3672.

Hu, Z. Y., G. Liu, X. R. Cheng, Y. Huang, S. Yang, S. Y. Qiao, L. Sun, W. X. Zhou and Y. X. Zhang (2012). "JD-30, an active fraction extracted from Danggui-Shaoyao-San, decreases beta-amyloid content and deposition, improves LTP reduction and prevents spatial cognition impairment in SAMP8 mice." <u>Exp Gerontol</u> **47**(1): 14-22.

Hudson, A. M. and L. Cooley (2010). "Drosophila Kelch functions with Cullin-3 to organize the ring canal actin cytoskeleton." <u>J Cell Biol</u> **188**(1): 29-37.

Huh, C. Y., M. Danik, F. Manseau, L. E. Trudeau and S. Williams (2008). "Chronic exposure to nerve growth factor increases acetylcholine and glutamate release from cholinergic neurons of the rat medial septum and diagonal band of Broca via mechanisms mediated by p75NTR." <u>J Neurosci</u> **28**(6): 1404-1409.

Ihara, Y. (2006). "Neurofibrillary tangles/paired helical filaments (1981-83)." J <u>Alzheimers Dis</u> **9**(3 Suppl): 209-217.

Ishikawa, T., Y. Sahara and T. Takahashi (2002). "A single packet of transmitter does not saturate postsynaptic glutamate receptors." <u>Neuron</u> **34**(4): 613-621.

Jin, Z., Y. Li, R. Pitti, D. Lawrence, V. C. Pham, J. R. Lill and A. Ashkenazi (2009). "Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling." <u>Cell</u> **137**(4): 721-735.

Jost, B. C. and G. T. Grossberg (1996). "The evolution of psychiatric symptoms in Alzheimer's disease: a natural history study." <u>J Am Geriatr Soc</u> **44**(9): 1078-1081.

Jost, P. J., S. Grabow, D. Gray, M. D. McKenzie, U. Nachbur, D. C. Huang, P. Bouillet, H. E. Thomas, C. Borner, J. Silke, A. Strasser and T. Kaufmann (2009). "XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis." <u>Nature</u> **460**(7258): 1035-1039.

Juge, N., Y. Yoshida, S. Yatsushiro, H. Omote and Y. Moriyama (2006). "Vesicular glutamate transporter contains two independent transport machineries." J Biol Chem **281**(51): 39499-39506.

Kaneko, T. and F. Fujiyama (2002). "Complementary distribution of vesicular glutamate transporters in the central nervous system." <u>Neurosci Res</u> **42**(4): 243-250.

Kang, R., H. J. Zeh, M. T. Lotze and D. Tang (2011). "The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis." <u>Cell Death Differ</u> **18**(4): 571-580.

Kao, Y. H., L. Lassova, T. Bar-Yehuda, R. H. Edwards, P. Sterling and N. Vardi (2004). "Evidence that certain retinal bipolar cells use both glutamate and GABA." <u>J Comp</u> <u>Neurol</u> **478**(3): 207-218.

Karasawa, N., I. Nagatsu, K. Sakai, T. Nagatsu, K. Watanabe and M. Onozuka (1997). "Immunocytochemical study of catecholaminergic neurons in the senescenceaccelerated mouse (SAM-P8) brain." <u>J Neural Transm (Vienna)</u> **104**(11-12): 1267-1275.

Kashani, A., C. Betancur, B. Giros, E. Hirsch and S. El Mestikawy (2007). "Altered expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in Parkinson disease." <u>Neurobiol Aging</u> **28**(4): 568-578.

Kashani, A., E. Lepicard, O. Poirel, C. Videau, J. P. David, C. Fallet-Bianco, A. Simon, A. Delacourte, B. Giros, J. Epelbaum, C. Betancur and S. El Mestikawy (2008). "Loss of VGLUT1 and VGLUT2 in the prefrontal cortex is correlated with cognitive decline in Alzheimer disease." <u>Neurobiol Aging</u> **29**(11): 1619-1630.

Kaushik, S., U. Bandyopadhyay, S. Sridhar, R. Kiffin, M. Martinez-Vicente, M. Kon, S. J. Orenstein, E. Wong and A. M. Cuervo (2011). "Chaperone-mediated autophagy at a glance." <u>J Cell Sci</u> **124**(Pt 4): 495-499.

Kawamata, T., I. Akiguchi, K. Maeda, C. Tanaka, K. Higuchi, M. Hosokawa and T. Takeda (1998). "Age-related changes in the brains of senescence-accelerated mice (SAM): association with glial and endothelial reactions." <u>Microsc Res Tech</u> **43**(1): 59-67.

Kerr, J. F., A. H. Wyllie and A. R. Currie (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." <u>Br J Cancer</u> **26**(4): 239-257.

Khimich, D., R. Nouvian, R. Pujol, S. Tom Dieck, A. Egner, E. D. Gundelfinger and T. Moser (2005). "Hair cell synaptic ribbons are essential for synchronous auditory signalling." <u>Nature</u> **434**(7035): 889-894.

Kinney, H. C., G. B. Richerson, S. M. Dymecki, R. A. Darnall and E. E. Nattie (2009). "The brainstem and serotonin in the sudden infant death syndrome." <u>Annu Rev Pathol</u> **4**: 517-550. Kiraz, Y., A. Adan, M. Kartal Yandim and Y. Baran (2016). "Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis." <u>Tumour Biol</u> **37**(7): 8471-8486.

Kitamura, Y., X. H. Zhao, T. Ohnuki and Y. Nomura (1989). "Ligand-binding characteristics of [3H]QNB, [3H]prazosin, [3H]rauwolscine, [3H]TCP and [3H]nitrendipine to cerebral cortical and hippocampal membranes of senescence accelerated mouse." <u>Neurosci Lett</u> **106**(3): 334-338.

Kitamura, Y., X. H. Zhao, T. Ohnuki, M. Takei and Y. Nomura (1992). "Age-related changes in transmitter glutamate and NMDA receptor/channels in the brain of senescence-accelerated mouse." <u>Neurosci Lett</u> **137**(2): 169-172.

Kolodziejczak, M., C. Bechade, N. Gervasi, T. Irinopoulou, S. M. Banas, C. Cordier, A. Rebsam, A. Roumier and L. Maroteaux (2015). "Serotonin Modulates Developmental Microglia via 5-HT2B Receptors: Potential Implication during Synaptic Refinement of Retinogeniculate Projections." <u>ACS Chem Neurosci</u> **6**(7): 1219-1230.

Kraft, C. and S. Martens (2012). "Mechanisms and regulation of autophagosome formation." <u>Curr Opin Cell Biol</u> **24**(4): 496-501.

Kraus, T., W. L. Neuhuber and M. Raab (2004). "Vesicular glutamate transporter 1 immunoreactivity in motor endplates of striated esophageal but not skeletal muscles in the mouse." <u>Neurosci Lett</u> **360**(1-2): 53-56.

Kuwana, T., M. R. Mackey, G. Perkins, M. H. Ellisman, M. Latterich, R. Schneiter, D. R. Green and D. D. Newmeyer (2002). "Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane." <u>Cell</u> **111**(3): 331-342.

Kwon, S. I., H. J. Cho, J. H. Jung, K. Yoshimoto, K. Shirasu and O. K. Park (2010). "The Rab GTPase RabG3b functions in autophagy and contributes to tracheary element differentiation in Arabidopsis." <u>Plant J</u> **64**(1): 151-164.

Laane, E., K. P. Tamm, E. Buentke, K. Ito, P. Kharaziha, J. Oscarsson, M. Corcoran, A. C. Bjorklund, K. Hultenby, J. Lundin, M. Heyman, S. Soderhall, J. Mazur, A. Porwit, P. P. Pandolfi, B. Zhivotovsky, T. Panaretakis and D. Grander (2009). "Cell death induced by

dexamethasone in lymphoid leukemia is mediated through initiation of autophagy." <u>Cell</u> <u>Death Differ</u> **16**(7): 1018-1029.

Lacor, P. N., M. C. Buniel, L. Chang, S. J. Fernandez, Y. Gong, K. L. Viola, M. P. Lambert, P. T. Velasco, E. H. Bigio, C. E. Finch, G. A. Krafft and W. L. Klein (2004). "Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers." <u>J Neurosci</u> **24**(45): 10191-10200.

Lee, Y., H. R. Kim and S. C. Ahn (2015). "Vesicular glutamate transporter 3 is strongly upregulated in cochlear inner hair cells and spiral ganglion cells of developing circling mice." <u>Neurosci Lett</u> **584**: 320-324.

Lee, Y. R., W. C. Yuan, H. C. Ho, C. H. Chen, H. M. Shih and R. H. Chen (2010). "The Cullin 3 substrate adaptor KLHL20 mediates DAPK ubiquitination to control interferon responses." <u>EMBO J</u> **29**(10): 1748-1761.

Leranth, C., M. Shanabrough and T. L. Horvath (2000). "Hormonal regulation of hippocampal spine synapse density involves subcortical mediation." <u>Neuroscience</u> **101**(2): 349-356.

LeVay, S., M. P. Stryker and C. J. Shatz (1978). "Ocular dominance columns and their development in layer IV of the cat's visual cortex: a quantitative study." <u>J Comp Neurol</u> **179**(1): 223-244.

Levine, B., S. Sinha and G. Kroemer (2008). "Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy." <u>Autophagy</u> **4**(5): 600-606.

Li, G., H. Cheng, X. Zhang, X. Shang, H. Xie, X. Zhang, J. Yu and J. Han (2013). "Hippocampal neuron loss is correlated with cognitive deficits in SAMP8 mice." <u>Neurol</u> <u>Sci</u> **34**(6): 963-969.

Li, W. W., J. Li and J. K. Bao (2012). "Microautophagy: lesser-known self-eating." <u>Cell</u> <u>Mol Life Sci</u> **69**(7): 1125-1136.

Liberman, M. C. (1982). "Single-neuron labeling in the cat auditory nerve." <u>Science</u> **216**(4551): 1239-1241.

Liberman, M. C., L. W. Dodds and S. Pierce (1990). "Afferent and efferent innervation of the cat cochlea: quantitative analysis with light and electron microscopy." <u>J Comp</u> <u>Neurol</u> **301**(3): 443-460.

Lin, H. W., A. C. Furman, S. G. Kujawa and M. C. Liberman (2011). "Primary neural degeneration in the Guinea pig cochlea after reversible noise-induced threshold shift." J <u>Assoc Res Otolaryngol</u> **12**(5): 605-616.

Littré E. (2013) Le Nouveau petit Littré, direction générale Blum C., editions Garnier, Paris, 2009, édition 03.

Liu, G., Z. K. Wang, Z. Y. Wang, D. B. Yang, Z. P. Liu and L. Wang (2016). "Mitochondrial permeability transition and its regulatory components are implicated in apoptosis of primary cultures of rat proximal tubular cells exposed to lead." <u>Arch Toxicol</u> **90**(5): 1193-1209.

Liu, S. Y., C. L. Chen, T. T. Yang, W. C. Huang, C. Y. Hsieh, W. J. Shen, T. T. Tsai, C. C. Shieh and C. F. Lin (2012). "Albumin prevents reactive oxygen species-induced mitochondrial damage, autophagy, and apoptosis during serum starvation." <u>Apoptosis</u> **17**(11): 1156-1169.

Liu, X. A., J. Song, Q. Jiang, Q. Wang, Q. Tian and J. Z. Wang (2012). "Expression of the hyperphosphorylated tau attenuates ER stress-induced apoptosis with upregulation of unfolded protein response." <u>Apoptosis</u> **17**(10): 1039-1049.

Lopez-Ramos, J. C., M. T. Jurado-Parras, C. Sanfeliu, D. Acuna-Castroviejo and J. M. Delgado-Garcia (2012). "Learning capabilities and CA1-prefrontal synaptic plasticity in a mice model of accelerated senescence." <u>Neurobiol Aging</u> **33**(3): 627 e613-626.

Luciani, M. F., C. Giusti, B. Harms, Y. Oshima, H. Kikuchi, Y. Kubohara and P. Golstein (2011). "Atg1 allows second-signaled autophagic cell death in Dictyostelium." <u>Autophagy</u> **7**(5): 501-508.

Luo, S., M. Garcia-Arencibia, R. Zhao, C. Puri, P. P. Toh, O. Sadiq and D. C. Rubinsztein (2012). "Bim inhibits autophagy by recruiting Beclin 1 to microtubules." <u>Mol Cell</u> **47**(3): 359-370.
Luo, S. and D. C. Rubinsztein (2010). "Apoptosis blocks Beclin 1-dependent autophagosome synthesis: an effect rescued by Bcl-xL." <u>Cell Death Differ</u> **17**(2): 268-277.

Luo, X., I. Budihardjo, H. Zou, C. Slaughter and X. Wang (1998). "Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors." <u>Cell</u> **94**(4): 481-490.

Lyness, S. A., C. Zarow and H. C. Chui (2003). "Neuron loss in key cholinergic and aminergic nuclei in Alzheimer disease: a meta-analysis." <u>Neurobiol Aging</u> **24**(1): 1-23.

Mahati, K., V. Bhagya, T. Christofer, A. Sneha and B. S. Shankaranarayana Rao (2016). "Enriched environment ameliorates depression-induced cognitive deficits and restores abnormal hippocampal synaptic plasticity." <u>Neurobiol Learn Mem</u> **134 Pt B**: 379-391.

Mainardi, M., A. Di Garbo, M. Caleo, N. Berardi, A. Sale and L. Maffei (2014). "Environmental enrichment strengthens corticocortical interactions and reduces amyloid-beta oligomers in aged mice." <u>Front Aging Neurosci</u> **6**: 1.

Mann, D. M., P. O. Yates and B. Marcyniuk (1985). "Correlation between senile plaque and neurofibrillary tangle counts in cerebral cortex and neuronal counts in cortex and subcortical structures in Alzheimer's disease." <u>Neurosci Lett</u> **56**(1): 51-55.

Markowska, A. L., E. L. Spangler and D. K. Ingram (1998). "Behavioral assessment of the senescence-accelerated mouse (SAM P8 and R1)." <u>Physiol Behav</u> **64**(1): 15-26.

Marquez, R. T. and L. Xu (2012). "Bcl-2:Beclin 1 complex: multiple, mechanisms regulating autophagy/apoptosis toggle switch." <u>Am J Cancer Res</u> **2**(2): 214-221.

Martini, A., M. Mazzoli, M. Rosignoli, P. Trevisi, S. Maggi, G. Enzi and G. Crepaldi (2001). "Hearing in the elderly: a population study." <u>Audiology</u> **40**(6): 285-293.

Masliah, E. and R. Terry (1993). "The role of synaptic proteins in the pathogenesis of disorders of the central nervous system." <u>Brain Pathol</u> **3**(1): 77-85.

Massie, A., A. Schallier, K. Vermoesen, L. Arckens and Y. Michotte (2010). "Biphasic and bilateral changes in striatal VGLUT1 and 2 protein expression in hemi-Parkinson rats." <u>Neurochem Int</u> **57**(2): 111-118.

Matjusaitis, M., G. Chin, E. A. Sarnoski and A. Stolzing (2016). "Biomarkers to identify and isolate senescent cells." <u>Ageing Res Rev</u> **29**: 1-12.

Matthews, T. J. and M. F. MacDorman (2013). "Infant mortality statistics from the 2010 period linked birth/infant death data set." <u>Natl Vital Stat Rep</u> **62**(8): 1-26.

Maycox, P. R., T. Deckwerth, J. W. Hell and R. Jahn (1988). "Glutamate uptake by brain synaptic vesicles. Energy dependence of transport and functional reconstitution in proteoliposomes." J Biol Chem **263**(30): 15423-15428.

McPhee, C. K. and E. H. Baehrecke (2010). "The engulfment receptor Draper is required for autophagy during cell death." <u>Autophagy</u> **6**(8): 1192-1193.

Meeker, H. C., K. K. Chadman, A. T. Heaney and R. I. Carp (2013). "Assessment of social interaction and anxiety-like behavior in senescence-accelerated-prone and - resistant mice." <u>Physiol Behav</u> **118**: 97-102.

Melchionda, S., N. Ahituv, L. Bisceglia, T. Sobe, F. Glaser, R. Rabionet, M. L. Arbones, A. Notarangelo, E. Di Iorio, M. Carella, L. Zelante, X. Estivill, K. B. Avraham and P. Gasparini (2001). "MYO6, the human homologue of the gene responsible for deafness in Snell's waltzer mice, is mutated in autosomal dominant nonsyndromic hearing loss." <u>Am J Hum Genet</u> **69**(3): 635-640.

Menardo, J., Y. Tang, S. Ladrech, M. Lenoir, F. Casas, C. Michel, J. Bourien, J. Ruel, G. Rebillard, T. Maurice, J. L. Puel and J. Wang (2012). "Oxidative stress, inflammation, and autophagic stress as the key mechanisms of premature age-related hearing loss in SAMP8 mouse Cochlea." <u>Antioxid Redox Signal</u> **16**(3): 263-274.

Menuet, C., N. Kourdougli, G. Hilaire and N. Voituron (2011). "Differences in serotoninergic metabolism possibly contribute to differences in breathing phenotype of FVB/N and C57BL/6J mice." <u>J Appl Physiol (1985)</u> **110**(6): 1572-1581.

Meyer, A. C., T. Frank, D. Khimich, G. Hoch, D. Riedel, N. M. Chapochnikov, Y. M. Yarin, B. Harke, S. W. Hell, A. Egner and T. Moser (2009). "Tuning of synapse number, structure and function in the cochlea." <u>Nat Neurosci</u> **12**(4): 444-453.

Mistry, H., B. A. Wilson, I. J. Roberts, C. J. O'Kane and J. B. Skeath (2004). "Cullin-3 regulates pattern formation, external sensory organ development and cell survival during Drosophila development." <u>Mech Dev</u> **121**(12): 1495-1507.

Mitnitski, A. B., A. J. Mogilner and K. Rockwood (2001). "Accumulation of deficits as a proxy measure of aging." <u>ScientificWorldJournal</u> **1**: 323-336.

Miyaji, T., N. Echigo, M. Hiasa, S. Senoh, H. Omote and Y. Moriyama (2008). "Identification of a vesicular aspartate transporter." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **105**(33): 11720-11724.

Miyamoto, M. (1997). "Characteristics of age-related behavioral changes in senescence-accelerated mouse SAMP8 and SAMP10." <u>Exp Gerontol</u> **32**(1-2): 139-148.

Miyamoto, M., Y. Kiyota, M. Nishiyama and A. Nagaoka (1992). "Senescence-accelerated mouse (SAM): age-related reduced anxiety-like behavior in the SAM-P/8 strain." <u>Physiol Behav</u> **51**(5): 979-985.

Miyamoto, M., Y. Kiyota, N. Yamazaki, A. Nagaoka, T. Matsuo, Y. Nagawa and T. Takeda (1986). "Age-related changes in learning and memory in the senescence-accelerated mouse (SAM)." <u>Physiol Behav</u> **38**(3): 399-406.

Moechars, D., M. C. Weston, S. Leo, Z. Callaerts-Vegh, I. Goris, G. Daneels, A. Buist, M. Cik, P. van der Spek, S. Kass, T. Meert, R. D'Hooge, C. Rosenmund and R. M. Hampson (2006). "Vesicular glutamate transporter VGLUT2 expression levels control quantal size and neuropathic pain." <u>J Neurosci</u> **26**(46): 12055-12066.

Mora, F., G. Segovia and A. del Arco (2007). "Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain." <u>Brain Res Rev</u> **55**(1): 78-88.

Mora-Gallegos, A., M. Rojas-Carvajal, S. Salas, A. Saborio-Arce, J. Fornaguera-Trias and J. C. Brenes (2015). "Age-dependent effects of environmental enrichment on spatial memory and neurochemistry." <u>Neurobiol Learn Mem</u> **118**: 96-104.

Morley, J. E. (2002). "The SAMP8 mouse: a model of Alzheimer disease?" <u>Biogerontology</u> **3**(1-2): 57-60.

Morley, J. E., V. B. Kumar, A. E. Bernardo, S. A. Farr, K. Uezu, N. Tumosa and J. F. Flood (2000). "Beta-amyloid precursor polypeptide in SAMP8 mice affects learning and memory." <u>Peptides</u> **21**(12): 1761-1767.

Morrison, S. F., K. Nakamura and C. J. Madden (2008). "Central control of thermogenesis in mammals." <u>Exp Physiol</u> **93**(7): 773-797.

Moser, T. and D. Beutner (2000). "Kinetics of exocytosis and endocytosis at the cochlear inner hair cell afferent synapse of the mouse." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **97**(2): 883-888.

Mukhopadhyay, S., P. K. Panda, N. Sinha, D. N. Das and S. K. Bhutia (2014). "Autophagy and apoptosis: where do they meet?" <u>Apoptosis</u> **19**(4): 555-566.

Naito, S. and T. Ueda (1985). "Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles." <u>J Neurochem</u> **44**(1): 99-109.

Nakahara, H., T. Kanno, Y. Inai, K. Utsumi, M. Hiramatsu, A. Mori and L. Packer (1998). "Mitochondrial dysfunction in the senescence accelerated mouse (SAM)." <u>Free</u> <u>Radic Biol Med</u> **24**(1): 85-92.

Nakamura, K., H. Hioki, F. Fujiyama and T. Kaneko (2005). "Postnatal changes of vesicular glutamate transporter (VGluT)1 and VGluT2 immunoreactivities and their colocalization in the mouse forebrain." <u>J Comp Neurol</u> **492**(3): 263-288.

Nakamura, K., S. X. Wu, F. Fujiyama, K. Okamoto, H. Hioki and T. Kaneko (2004). "Independent inputs by VGLUT2- and VGLUT3-positive glutamatergic terminals onto rat sympathetic preganglionic neurons." <u>Neuroreport</u> **15**(3): 431-436. Nardai, G., P. Csermely and C. Soti (2002). "Chaperone function and chaperone overload in the aged. A preliminary analysis." <u>Exp Gerontol</u> **37**(10-11): 1257-1262.

Nelson, A. R., M. D. Sweeney, A. P. Sagare and B. V. Zlokovic (2016). "Neurovascular dysfunction and neurodegeneration in dementia and Alzheimer's disease." <u>Biochim</u> <u>Biophys Acta</u> **1862**(5): 887-900.

Nemzou, N. R., A. V. Bulankina, D. Khimich, A. Giese and T. Moser (2006). "Synaptic organization in cochlear inner hair cells deficient for the CaV1.3 (alpha1D) subunit of L-type Ca2+ channels." <u>Neuroscience</u> **141**(4): 1849-1860.

Neufeld, T. P. (2010). "TOR-dependent control of autophagy: biting the hand that feeds." <u>Curr Opin Cell Biol</u> **22**(2): 157-168.

Ni, B., P. R. Rosteck, Jr., N. S. Nadi and S. M. Paul (1994). "Cloning and expression of a cDNA encoding a brain-specific Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **91**(12): 5607-5611.

Nickerson Poulin, A., A. Guerci, S. El Mestikawy and K. Semba (2006). "Vesicular glutamate transporter 3 immunoreactivity is present in cholinergic basal forebrain neurons projecting to the basolateral amygdala in rat." <u>J Comp Neurol</u> **498**(5): 690-711.

Nishi, T., N. Shimizu, M. Hiramoto, I. Sato, Y. Yamaguchi, M. Hasegawa, S. Aizawa, H. Tanaka, K. Kataoka, H. Watanabe and H. Handa (2002). "Spatial redox regulation of a critical cysteine residue of NF-kappa B in vivo." J Biol Chem **277**(46): 44548-44556.

Nishida, Y., S. Arakawa, K. Fujitani, H. Yamaguchi, T. Mizuta, T. Kanaseki, M. Komatsu, K. Otsu, Y. Tsujimoto and S. Shimizu (2009). "Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy." <u>Nature</u> **461**(7264): 654-658.

Nishimaru, H., C. E. Restrepo, J. Ryge, Y. Yanagawa and O. Kiehn (2005). "Mammalian motor neurons corelease glutamate and acetylcholine at central synapses." <u>Proc Natl</u> <u>Acad Sci U S A</u> **102**(14): 5245-5249.

Nishizawa, K., H. Saito and N. Nishiyama (1990). "Effects of Kamikihi-To, a traditional Chinese medicine, on passive and conditioned avoidance performance impairment in senescence accelerated mouse (SAM)." Jpn J Pharmacol **54**(4): 375-382.

Nithianantharajah, J., H. Levis and M. Murphy (2004). "Environmental enrichment results in cortical and subcortical changes in levels of synaptophysin and PSD-95 proteins." <u>Neurobiol Learn Mem</u> **81**(3): 200-210.

Njus, D., P. M. Kelley and G. J. Harnadek (1986). "Bioenergetics of secretory vesicles." <u>Biochim Biophys Acta</u> **853**(3-4): 237-265.

Nomura, Y., Y. Kitamura, T. Ohnuki, T. Arima, Y. Yamanaka, K. Sasaki and Y. Oomura (1997). "Alterations in acetylcholine, NMDA, benzodiazepine receptors and protein kinase C in the brain of the senescence-accelerated mouse: an animal model useful for studies on cognitive enhancers." <u>Behav Brain Res</u> **83**(1-2): 51-55.

Nomura, Y. and Y. Okuma (1999). "Age-related defects in lifespan and learning ability in SAMP8 mice." <u>Neurobiol Aging</u> **20**(2): 111-115.

Nouvian R. et al. (2006) Physiologie de l'audition. EMC consult.

Nouvian, R., D. Beutner, T. D. Parsons and T. Moser (2006). "Structure and function of the hair cell ribbon synapse." <u>J Membr Biol</u> **209**(2-3): 153-165.

Nouvian, R., J. Neef, A. V. Bulankina, E. Reisinger, T. Pangrsic, T. Frank, S. Sikorra, N. Brose, T. Binz and T. Moser (2011). "Exocytosis at the hair cell ribbon synapse apparently operates without neuronal SNARE proteins." <u>Nat Neurosci</u> **14**(4): 411-413.

Oberstein, A., P. D. Jeffrey and Y. Shi (2007). "Crystal structure of the Bcl-XL-Beclin 1 peptide complex: Beclin 1 is a novel BH3-only protein." <u>J Biol Chem</u> **282**(17): 13123-13132.

Ogita, K., K. Hirata, D. G. Bole, S. Yoshida, Y. Tamura, A. M. Leckenby and T. Ueda (2001). "Inhibition of vesicular glutamate storage and exocytotic release by Rose Bengal." J Neurochem 77(1): 34-42.

Ohta, A., I. Akiguchi, N. Seriu, K. Ohnishi, H. Yagi, K. Higuchi and M. Hosokawa (2001). "Deterioration in learning and memory of fear conditioning in response to context in aged SAMP8 mice." <u>Neurobiol Aging</u> **22**(3): 479-484.

Oliveira, A. L., F. Hydling, E. Olsson, T. Shi, R. H. Edwards, F. Fujiyama, T. Kaneko, T. Hokfelt, S. Cullheim and B. Meister (2003). "Cellular localization of three vesicular glutamate transporter mRNAs and proteins in rat spinal cord and dorsal root ganglia." <u>Synapse</u> **50**(2): 117-129.

Omote, H., T. Miyaji, N. Juge and Y. Moriyama (2011). "Vesicular neurotransmitter transporter: bioenergetics and regulation of glutamate transport." <u>Biochemistry</u> **50**(25): 5558-5565.

Onimaru, H. and I. Homma (2003). "A novel functional neuron group for respiratory rhythm generation in the ventral medulla." <u>J Neurosci</u> **23**(4): 1478-1486.

Op de Beeck, K., J. Schacht and G. Van Camp (2011). "Apoptosis in acquired and genetic hearing impairment: the programmed death of the hair cell." <u>Hear Res</u> **281**(1-2): 18-27.

Opresko, P. L. and J. W. Shay (2016). "Telomere-associated aging disorders." <u>Ageing</u> <u>Res Rev</u>.

Osaka, T. (2011). "Hypoxia-induced hypothermia mediated by noradrenaline and nitric oxide in the rostromedial preoptic area." <u>Neuroscience</u> **179**: 170-178.

Ottem, E. N., J. G. Godwin, S. Krishnan and S. L. Petersen (2004). "Dual-phenotype GABA/glutamate neurons in adult preoptic area: sexual dimorphism and function." J <u>Neurosci</u> **24**(37): 8097-8105.

Ouyang, L., Z. Shi, S. Zhao, F. T. Wang, T. T. Zhou, B. Liu and J. K. Bao (2012). "Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis." <u>Cell Prolif</u> **45**(6): 487-498.

Pallas, M., A. Camins, M. A. Smith, G. Perry, H. G. Lee and G. Casadesus (2008). "From aging to Alzheimer's disease: unveiling "the switch" with the senescence-accelerated mouse model (SAMP8)." <u>J Alzheimers Dis</u> **15**(4): 615-624.

Panchal, M., M. Rholam and N. Brakch (2004). "Abnormalities of peptide metabolism in Alzheimer disease." <u>Curr Neurovasc Res</u> **1**(4): 317-323.

Pangrsic, T., L. Lasarow, K. Reuter, H. Takago, M. Schwander, D. Riedel, T. Frank, L. M. Tarantino, J. S. Bailey, N. Strenzke, N. Brose, U. Muller, E. Reisinger and T. Moser (2010). "Hearing requires otoferlin-dependent efficient replenishment of synaptic vesicles in hair cells." <u>Nat Neurosci</u> **13**(7): 869-876.

Parsons, S. M. (2000). "Transport mechanisms in acetylcholine and monoamine storage." <u>FASEB J</u> **14**(15): 2423-2434.

Paterson, D. S., F. L. Trachtenberg, E. G. Thompson, R. A. Belliveau, A. H. Beggs, R. Darnall, A. E. Chadwick, H. F. Krous and H. C. Kinney (2006). "Multiple serotonergic brainstem abnormalities in sudden infant death syndrome." JAMA **296**(17): 2124-2132.

Pattingre, S., L. Espert, M. Biard-Piechaczyk and P. Codogno (2008). "Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes." <u>Biochimie</u> **90**(2): 313-323.

Pelegri, C., A. M. Canudas, J. del Valle, G. Casadesus, M. A. Smith, A. Camins, M. Pallas and J. Vilaplana (2007). "Increased permeability of blood-brain barrier on the hippocampus of a murine model of senescence." <u>Mech Ageing Dev</u> **128**(9): 522-528.

Pena, Y., M. Prunell, V. Dimitsantos, R. Nadal and R. M. Escorihuela (2006). "Environmental enrichment effects in social investigation in rats are gender dependent." <u>Behav Brain Res</u> **174**(1): 181-187.

Peng, B. G., Q. X. Li, T. Y. Ren, S. Ahmad, S. P. Chen, P. Chen and X. Lin (2004). "Group I metabotropic glutamate receptors in spiral ganglion neurons contribute to excitatory neurotransmissions in the cochlea." <u>Neuroscience</u> **123**(1): 221-230.

Peng, Z., G. P. Wang, R. Zeng, J. Y. Guo, C. F. Chen and S. S. Gong (2013). "Temporospatial expression and cellular localization of VGLUT3 in the rat cochlea." <u>Brain Res</u> **1537**: 100-110.

Peters, L. M., D. W. Anderson, A. J. Griffith, K. M. Grundfast, T. B. San Agustin, A. C. Madeo, T. B. Friedman and R. J. Morell (2002). "Mutation of a transcription factor, TFCP2L3, causes progressive autosomal dominant hearing loss, DFNA28." <u>Hum Mol</u> <u>Genet</u> **11**(23): 2877-2885.

Pietrancosta, N., A. Kessler, F. C. Favre-Besse, N. Triballeau, T. Quentin, B. Giros, S. El Mestikawy and F. C. Acher (2010). "Rose Bengal analogs and vesicular glutamate transporters (VGLUTs)." <u>Bioorg Med Chem</u> **18**(18): 6922-6933.

Puel, J. L. (1995). "Chemical synaptic transmission in the cochlea." <u>Prog Neurobiol</u> **47**(6): 449-476.

Puel, J. L., R. Pujol, F. Tribillac, S. Ladrech and M. Eybalin (1994). "Excitatory amino acid antagonists protect cochlear auditory neurons from excitotoxicity." <u>J Comp Neurol</u> **341**(2): 241-256.

Radoshevich, L., L. Murrow, N. Chen, E. Fernandez, S. Roy, C. Fung and J. Debnath (2010). "ATG12 conjugation to ATG3 regulates mitochondrial homeostasis and cell death." <u>Cell</u> **142**(4): 590-600.

Ramirez, S., T. Allen, L. Villagracia, Y. Chae, J. M. Ramirez and D. D. Rubens (2016). "Inner ear lesion and the differential roles of hypoxia and hypercarbia in triggering active movements: Potential implication for the Sudden Infant Death Syndrome." <u>Neuroscience</u> **337**: 9-16.

Reijnierse, G. L., H. Veldstra and C. J. Van den Berg (1975). "Subcellular localization of gamma-aminobutyrate transaminase and glutamate dehydrogenase in adult rat brain. Evidence for at least two small glutamate compartments in brain." <u>Biochem J</u> **152**(3): 469-475.

Ren, J., C. Qin, F. Hu, J. Tan, L. Qiu, S. Zhao, G. Feng and M. Luo (2011). "Habenula "cholinergic" neurons co-release glutamate and acetylcholine and activate postsynaptic neurons via distinct transmission modes." <u>Neuron</u> **69**(3): 445-452.

Renault, T. T., O. Teijido, B. Antonsson, L. M. Dejean and S. Manon (2013). "Regulation of Bax mitochondrial localization by Bcl-2 and Bcl-x(L): keep your friends close but your enemies closer." <u>Int J Biochem Cell Biol</u> **45**(1): 64-67.

Riedel, G. and K. G. Reymann (1996). "Metabotropic glutamate receptors in hippocampal long-term potentiation and learning and memory." <u>Acta Physiol Scand</u> **157**(1): 1-19.

Robinson, C. M., J. Y. Jung and G. J. Nau (2012). "Interferon-gamma, tumor necrosis factor, and interleukin-18 cooperate to control growth of Mycobacterium tuberculosis in human macrophages." <u>Cytokine</u> **60**(1): 233-241.

Rockwood, K. and A. Mitnitski (2007). "Frailty in relation to the accumulation of deficits." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **62**(7): 722-727.

Romero-Garcia, R., M. Atienza and J. L. Cantero (2014). "Predictors of coupling between structural and functional cortical networks in normal aging." <u>Hum Brain Mapp</u> **35**(6): 2724-2740.

Roseth, S., E. M. Fykse and F. Fonnum (1995). "Uptake of L-glutamate into rat brain synaptic vesicles: effect of inhibitors that bind specifically to the glutamate transporter." <u>J Neurochem</u> **65**(1): 96-103.

Rosin, D. L., D. A. Chang and P. G. Guyenet (2006). "Afferent and efferent connections of the rat retrotrapezoid nucleus." <u>J Comp Neurol</u> **499**(1): 64-89.

Rubinstein, A. D., M. Eisenstein, Y. Ber, S. Bialik and A. Kimchi (2011). "The autophagy protein Atg12 associates with antiapoptotic Bcl-2 family members to promote mitochondrial apoptosis." <u>Mol Cell</u> **44**(5): 698-709.

Ruel, J., R. P. Bobbin, D. Vidal, R. Pujol and J. L. Puel (2000). "The selective AMPA receptor antagonist GYKI 53784 blocks action potential generation and excitotoxicity in the guinea pig cochlea." <u>Neuropharmacology</u> **39**(11): 1959-1973.

Ruel, J., S. Emery, R. Nouvian, T. Bersot, B. Amilhon, J. M. Van Rybroek, G. Rebillard, M. Lenoir, M. Eybalin, B. Delprat, T. A. Sivakumaran, B. Giros, S. El Mestikawy, T. Moser, R. J. Smith, M. M. Lesperance and J. L. Puel (2008). "Impairment of SLC17A8 encoding vesicular glutamate transporter-3, VGLUT3, underlies nonsyndromic deafness DFNA25 and inner hair cell dysfunction in null mice." <u>Am J Hum Genet</u> **83**(2): 278-292.

Ruel, J., R. Nouvian, C. Gervais d'Aldin, R. Pujol, M. Eybalin and J. L. Puel (2001). "Dopamine inhibition of auditory nerve activity in the adult mammalian cochlea." <u>Eur J</u> <u>Neurosci</u> **14**(6): 977-986. Ruel, J., J. Wang, D. Dememes, S. Gobaille, J. L. Puel and G. Rebillard (2006). "Dopamine transporter is essential for the maintenance of spontaneous activity of auditory nerve neurones and their responsiveness to sound stimulation." <u>J Neurochem</u> **97**(1): 190-200.

Safieddine, S. and M. Eybalin (1995). "Expression of mGluR1 alpha mRNA receptor in rat and guinea pig cochlear neurons." <u>Neuroreport</u> **7**(1): 193-196.

Sagne, C., S. El Mestikawy, M. F. Isambert, M. Hamon, J. P. Henry, B. Giros and B. Gasnier (1997). "Cloning of a functional vesicular GABA and glycine transporter by screening of genome databases." <u>FEBS Lett</u> **417**(2): 177-183.

Sakae, D. Y., F. Marti, S. Lecca, F. Vorspan, E. Martin-Garcia, L. J. Morel, A. Henrion, J. Gutierrez-Cuesta, A. Besnard, N. Heck, E. Herzog, S. Bolte, V. F. Prado, M. A. Prado, F. Bellivier, C. B. Eap, S. Crettol, P. Vanhoutte, J. Caboche, A. Gratton, L. Moquin, B. Giros, R. Maldonado, S. Daumas, M. Mameli, S. Jamain and S. El Mestikawy (2015). "The absence of VGLUT3 predisposes to cocaine abuse by increasing dopamine and glutamate signaling in the nucleus accumbens." <u>Mol Psychiatry</u> **20**(11): 1448-1459.

Salminen, A. and K. Kaarniranta (2009). "Regulation of the aging process by autophagy." <u>Trends Mol Med</u> **15**(5): 217-224.

Samuel, W., R. D. Terry, R. DeTeresa, N. Butters and E. Masliah (1994). "Clinical correlates of cortical and nucleus basalis pathology in Alzheimer dementia." <u>Arch Neurol</u> **51**(8): 772-778.

Sato, E., T. Kurokawa, N. Oda and S. Ishibashi (1996). "Early appearance of abnormality of microperoxisomal enzymes in the cerebral cortex of senescence-accelerated mouse." <u>Mech Ageing Dev</u> **92**(2-3): 175-184.

Sato, E., N. Oda, N. Ozaki, S. Hashimoto, T. Kurokawa and S. Ishibashi (1996). "Early and transient increase in oxidative stress in the cerebral cortex of senescence-accelerated mouse." <u>Mech Ageing Dev</u> **86**(2): 105-114.

Schafer, M. K., H. Varoqui, N. Defamie, E. Weihe and J. D. Erickson (2002). "Molecular cloning and functional identification of mouse vesicular glutamate transporter 3 and its expression in subsets of novel excitatory neurons." <u>J Biol Chem</u> **277**(52): 50734-50748.

Schenck, S., S. M. Wojcik, N. Brose and S. Takamori (2009). "A chloride conductance in VGLUT1 underlies maximal glutamate loading into synaptic vesicles." <u>Nat Neurosci</u> **12**(2): 156-162.

Schmitz, F., A. Konigstorfer and T. C. Sudhof (2000). "RIBEYE, a component of synaptic ribbons: a protein's journey through evolution provides insight into synaptic ribbon function." <u>Neuron</u> **28**(3): 857-872.

Seal, R. P., O. Akil, E. Yi, C. M. Weber, L. Grant, J. Yoo, A. Clause, K. Kandler, J. L. Noebels, E. Glowatzki, L. R. Lustig and R. H. Edwards (2008). "Sensorineural deafness and seizures in mice lacking vesicular glutamate transporter 3." <u>Neuron</u> **57**(2): 263-275.

Segovia, G., A. G. Yague, J. M. Garcia-Verdugo and F. Mora (2006). "Environmental enrichment promotes neurogenesis and changes the extracellular concentrations of glutamate and GABA in the hippocampus of aged rats." <u>Brain Res Bull</u> **70**(1): 8-14.

Shamas-Din, A., H. Brahmbhatt, B. Leber and D. W. Andrews (2011). "BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1813**(4): 508-520.

Sharpless, N. E. and C. J. Sherr (2015). "Forging a signature of in vivo senescence." <u>Nat Rev Cancer</u> **15**(7): 397-408.

Sheets, L., J. G. Trapani, W. Mo, N. Obholzer and T. Nicolson (2011). "Ribeye is required for presynaptic Ca(V)1.3a channel localization and afferent innervation of sensory hair cells." <u>Development</u> **138**(7): 1309-1319.

Shen, H. M. and P. Codogno (2011). "Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species?" <u>Autophagy</u> **7**(5): 457-465.

Shen, Y. C., D. L. Liao, C. L. Lu, J. Y. Chen, Y. J. Liou, T. T. Chen and C. H. Chen (2010). "Resequencing of the vesicular glutamate transporter 2 gene (VGLUT2) reveals some rare genetic variants that may increase the genetic burden in schizophrenia." <u>Schizophr</u> <u>Res</u> **121**(1-3): 179-186. Shimizu, S., T. Kanaseki, N. Mizushima, T. Mizuta, S. Arakawa-Kobayashi, C. B. Thompson and Y. Tsujimoto (2004). "Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes." <u>Nat Cell Biol</u> **6**(12): 1221-1228.

Shutoh, F., A. Ina, S. Yoshida, J. Konno and S. Hisano (2008). "Two distinct subtypes of serotonergic fibers classified by co-expression with vesicular glutamate transporter 3 in rat forebrain." <u>Neurosci Lett</u> **432**(2): 132-136.

Smith, J. C., H. H. Ellenberger, K. Ballanyi, D. W. Richter and J. L. Feldman (1991). "Pre-Botzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals." <u>Science</u> **254**(5032): 726-729.

Somogyi, J., A. Baude, Y. Omori, H. Shimizu, S. El Mestikawy, M. Fukaya, R. Shigemoto, M. Watanabe and P. Somogyi (2004). "GABAergic basket cells expressing cholecystokinin contain vesicular glutamate transporter type 3 (VGLUT3) in their synaptic terminals in hippocampus and isocortex of the rat." <u>Eur J Neurosci</u> **19**(3): 552-569.

Stella, S. L., Jr., S. Li, A. Sabatini, A. Vila and N. C. Brecha (2008). "Comparison of the ontogeny of the vesicular glutamate transporter 3 (VGLUT3) with VGLUT1 and VGLUT2 in the rat retina." <u>Brain Res</u> **1215**: 20-29.

Stensrud, M. J., C. J. Sogn and V. Gundersen (2015). "Immunogold characteristics of VGLUT3-positive GABAergic nerve terminals suggest corelease of glutamate." <u>J Comp</u> <u>Neurol</u> **523**(18): 2698-2713.

Stornetta, R. L., C. P. Sevigny and P. G. Guyenet (2002). "Vesicular glutamate transporter DNPI/VGLUT2 mRNA is present in C1 and several other groups of brainstem catecholaminergic neurons." <u>J Comp Neurol</u> **444**(3): 191-206.

Strappazzon, F., M. Vietri-Rudan, S. Campello, F. Nazio, F. Florenzano, G. M. Fimia, M. Piacentini, B. Levine and F. Cecconi (2011). "Mitochondrial BCL-2 inhibits AMBRA1-induced autophagy." <u>EMBO J</u> **30**(7): 1195-1208.

Strata, P. and R. Harvey (1999). "Dale's principle." <u>Brain Res Bull</u> **50**(5-6): 349-350.

Stuber, G. D., T. S. Hnasko, J. P. Britt, R. H. Edwards and A. Bonci (2010). "Dopaminergic terminals in the nucleus accumbens but not the dorsal striatum corelease glutamate." <u>J Neurosci</u> **30**(24): 8229-8233.

Sugiyama, H., H. Akiyama, I. Akiguchi, M. Kameyama and T. Takeda (1987). "[Loss of dendritic spines in hippocampal CA1 pyramidal cells in senescence accelerated mouse (SAM)--a quantitative Golgi study]." <u>Rinsho Shinkeigaku</u> **27**(7): 841-845.

Sulzer, D., M. P. Joyce, L. Lin, D. Geldwert, S. N. Haber, T. Hattori and S. Rayport (1998). "Dopamine neurons make glutamatergic synapses in vitro." <u>J Neurosci</u> **18**(12): 4588-4602.

Sun, L., H. Wang, Z. Wang, S. He, S. Chen, D. Liao, L. Wang, J. Yan, W. Liu, X. Lei and X. Wang (2012). "Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase." <u>Cell</u> **148**(1-2): 213-227.

Sun, Q. J., R. G. Berkowitz, A. K. Goodchild and P. M. Pilowsky (2002). "Serotonin inputs to inspiratory laryngeal motoneurons in the rat." <u>J Comp Neurol</u> **451**(1): 91-98.

Sureda, F. X., J. Gutierrez-Cuesta, M. Romeu, M. Mulero, A. M. Canudas, A. Camins, J. Mallol and M. Pallas (2006). "Changes in oxidative stress parameters and neurodegeneration markers in the brain of the senescence-accelerated mice SAMP-8." <u>Exp Gerontol</u> **41**(4): 360-367.

Swerdlow, R. H. and S. M. Khan (2004). "A "mitochondrial cascade hypothesis" for sporadic Alzheimer's disease." <u>Med Hypotheses</u> **63**(1): 8-20.

Tabb, J. S. and T. Ueda (1991). "Phylogenetic studies on the synaptic vesicle glutamate transport system." <u>J Neurosci</u> **11**(6): 1822-1828.

Thomas A. (2013) Depression in older people, in Oxford Textbook of old age psychiatry, second edition, Oxford, pp 545-570.

Takamori, S., M. Holt, K. Stenius, E. A. Lemke, M. Gronborg, D. Riedel, H. Urlaub, S. Schenck, B. Brugger, P. Ringler, S. A. Muller, B. Rammner, F. Grater, J. S. Hub, B. L. De

Groot, G. Mieskes, Y. Moriyama, J. Klingauf, H. Grubmuller, J. Heuser, F. Wieland and R. Jahn (2006). "Molecular anatomy of a trafficking organelle." <u>Cell</u> **127**(4): 831-846.

Takamori, S., P. Malherbe, C. Broger and R. Jahn (2002). "Molecular cloning and functional characterization of human vesicular glutamate transporter 3." <u>EMBO Rep</u> **3**(8): 798-803.

Takamori, S., J. S. Rhee, C. Rosenmund and R. Jahn (2000). "Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons." <u>Nature</u> **407**(6801): 189-194.

Takamori, S., J. S. Rhee, C. Rosenmund and R. Jahn (2001). "Identification of differentiation-associated brain-specific phosphate transporter as a second vesicular glutamate transporter (VGLUT2)." <u>J Neurosci</u> **21**(22): RC182.

Takeda, T. (1999). "Senescence-accelerated mouse (SAM): a biogerontological resource in aging research." <u>Neurobiol Aging</u> **20**(2): 105-110.

Takeda, T. (2009). "Senescence-accelerated mouse (SAM) with special references to neurodegeneration models, SAMP8 and SAMP10 mice." <u>Neurochem Res</u> **34**(4): 639-659.

Takeda, T., M. Hosokawa, K. Higuchi, M. Hosono, I. Akiguchi and H. Katoh (1994). "A novel murine model of aging, Senescence-Accelerated Mouse (SAM)." <u>Arch Gerontol Geriatr</u> **19**(2): 185-192.

Takeda, T., M. Hosokawa, S. Takeshita, M. Irino, K. Higuchi, T. Matsushita, Y. Tomita, K. Yasuhira, H. Hamamoto, K. Shimizu, M. Ishii and T. Yamamuro (1981). "A new murine model of accelerated senescence." <u>Mech Ageing Dev</u> **17**(2): 183-194.

Takei, N., I. Nihonmatsu and H. Kawamura (1989). "Age-related decline of acetylcholine release evoked by depolarizing stimulation." <u>Neurosci Lett</u> **101**(2): 182-186.

Tamura, Y., K. Ogita and T. Ueda (2014). "A new VGLUT-specific potent inhibitor: pharmacophore of Brilliant Yellow." <u>Neurochem Res</u> **39**(1): 117-128.

Tanaka, J., Y. Okuma, K. Tomobe and Y. Nomura (2005). "The age-related degeneration of oligodendrocytes in the hippocampus of the senescence-accelerated mouse (SAM) P8: a quantitative immunohistochemical study." <u>Biol Pharm Bull</u> **28**(4): 615-618.

Terman, A. and U. T. Brunk (2004). "Aging as a catabolic malfunction." <u>Int J Biochem</u> <u>Cell Biol</u> **36**(12): 2365-2375.

Thoby-Brisson, M., M. Karlen, N. Wu, P. Charnay, J. Champagnat and G. Fortin (2009). "Genetic identification of an embryonic parafacial oscillator coupling to the preBotzinger complex." <u>Nat Neurosci</u> **12**(8): 1028-1035.

Tomobe, K. and Y. Nomura (2009). "Neurochemistry, neuropathology, and heredity in SAMP8: a mouse model of senescence." <u>Neurochem Res</u> **34**(4): 660-669.

Toni, N., P. A. Buchs, I. Nikonenko, C. R. Bron and D. Muller (1999). "LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite." <u>Nature</u> **402**(6760): 421-425.

Tordera, R. M., S. Totterdell, S. M. Wojcik, N. Brose, N. Elizalde, B. Lasheras and J. Del Rio (2007). "Enhanced anxiety, depressive-like behaviour and impaired recognition memory in mice with reduced expression of the vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1)." <u>Eur J Neurosci</u> **25**(1): 281-290.

Trowbridge, S., N. Narboux-Neme and P. Gaspar (2011). "Genetic models of serotonin (5-HT) depletion: what do they tell us about the developmental role of 5-HT?" <u>Anat Rec (Hoboken)</u> **294**(10): 1615-1623.

Uchida, Y., S. Sugiura, M. Sone, H. Ueda and T. Nakashima (2014). "Progress and prospects in human genetic research into age-related hearing impairment." <u>Biomed Res</u> <u>Int</u> **2014**: 390601.

Ueno, M., H. Sakamoto, K. Kanenishi, M. Onodera, I. Akiguchi and M. Hosokawa (2001). "Ultrastructural and permeability features of microvessels in the hippocampus, cerebellum and pons of senescence-accelerated mice (SAM)." <u>Neurobiol Aging</u> **22**(3): 469-478.

Uezato, A., J. H. Meador-Woodruff and R. E. McCullumsmith (2009). "Vesicular glutamate transporter mRNA expression in the medial temporal lobe in major depressive disorder, bipolar disorder, and schizophrenia." <u>Bipolar Disord</u> **11**(7): 711-725.

Upton, A. L., N. Salichon, C. Lebrand, A. Ravary, R. Blakely, I. Seif and P. Gaspar (1999). "Excess of serotonin (5-HT) alters the segregation of ispilateral and contralateral retinal projections in monoamine oxidase A knock-out mice: possible role of 5-HT uptake in retinal ganglion cells during development." J Neurosci **19**(16): 7007-7024.

van Deursen, J. M. (2014). "The role of senescent cells in ageing." <u>Nature</u> **509**(7501): 439-446.

Varga, V., A. Losonczy, B. V. Zemelman, Z. Borhegyi, G. Nyiri, A. Domonkos, B. Hangya, N. Holderith, J. C. Magee and T. F. Freund (2009). "Fast synaptic subcortical control of hippocampal circuits." <u>Science</u> **326**(5951): 449-453.

Varoqui, H., M. K. Schafer, H. Zhu, E. Weihe and J. D. Erickson (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**(1): 142-155.

Viemari, J. C., H. Burnet, M. Bevengut and G. Hilaire (2003). "Perinatal maturation of the mouse respiratory rhythm-generator: in vivo and in vitro studies." <u>Eur J Neurosci</u> **17**(6): 1233-1244.

Vigneault, E., O. Poirel, M. Riad, J. Prud'homme, S. Dumas, G. Turecki, C. Fasano, N. Mechawar and S. El Mestikawy (2015). "Distribution of vesicular glutamate transporters in the human brain." <u>Front Neuroanat</u> **9**: 23.

Villar-Cervino, V., C. Rocancourt, A. Menuet, C. Da Silva, P. Wincker, R. Anadon, S. Mazan and M. C. Rodicio (2010). "A vesicular glutamate transporter in lampreys: cDNA cloning and early expression in the nervous system." <u>J Chem Neuroanat</u> **40**(1): 71-81.

Vogel, G., D. Neill, M. Hagler and D. Kors (1990). "A new animal model of endogenous depression: a summary of present findings." <u>Neurosci Biobehav Rev</u> **14**(1): 85-91.

Voisin, A. N., O. Mnie-Filali, N. Giguere, G. M. Fortin, E. Vigneault, S. El Mestikawy, L. Descarries and L. E. Trudeau (2016). "Axonal Segregation and Role of the Vesicular Glutamate Transporter VGLUT3 in Serotonin Neurons." <u>Front Neuroanat</u> **10**: 39.

Voituron, N., Y. Shvarev, C. Menuet, M. Bevengut, C. Fasano, E. Vigneault, S. El Mestikawy and G. Hilaire (2010). "Fluoxetine treatment abolishes the in vitro respiratory response to acidosis in neonatal mice." <u>PLoS One</u> **5**(10): e13644.

Volkmann, N., F. M. Marassi, D. D. Newmeyer and D. Hanein (2014). "The rheostat in the membrane: BCL-2 family proteins and apoptosis." <u>Cell Death Differ</u> **21**(2): 206-215.

Wallach, D., T. B. Kang, C. P. Dillon and D. R. Green (2016). "Programmed necrosis in inflammation: Toward identification of the effector molecules." <u>Science</u> **352**(6281): aaf2154.

Wang, H. H., H. L. Li, R. Liu, Y. Zhang, K. Liao, Q. Wang, J. Z. Wang and S. J. Liu (2010). "Tau overexpression inhibits cell apoptosis with the mechanisms involving multiple viability-related factors." <u>J Alzheimers Dis</u> **21**(1): 167-179.

Wang, J. Z. and Z. H. Wang (2015). "Senescence may mediate conversion of tau phosphorylation-induced apoptotic escape to neurodegeneration." <u>Exp Gerontol</u> **68**: 82-86.

Wang, J. Z., Z. H. Wang and Q. Tian (2014). "Tau hyperphosphorylation induces apoptotic escape and triggers neurodegeneration in Alzheimer's disease." <u>Neurosci Bull</u> **30**(2): 359-366.

Wang, L., Q. Jiang, J. Chu, L. Lin, X. G. Li, G. S. Chai, Q. Wang, J. Z. Wang and Q. Tian (2013). "Expression of Tau40 induces activation of cultured rat microglial cells." <u>PLoS</u> <u>One</u> **8**(10): e76057.

Wang, W., J. K. Tiwari, S. R. Bradley, R. V. Zaykin and G. B. Richerson (2001). "Acidosis-stimulated neurons of the medullary raphe are serotonergic." <u>J Neurophysiol</u> **85**(5): 2224-2235. Wei, Y., S. Sinha and B. Levine (2008). "Dual role of JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 in autophagy and apoptosis regulation." <u>Autophagy</u> **4**(7): 949-951.

Weiner M. F., Lipton A. m. (2012) Clinical Manual of Alzheimer disease and others dementias, American Psychiatric Association, Washington : APA.

West, M. J., P. D. Coleman, D. G. Flood and J. C. Troncoso (1994). "Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease." <u>Lancet</u> **344**(8925): 769-772.

Westphal, D., G. Dewson, P. E. Czabotar and R. M. Kluck (2011). "Molecular biology of Bax and Bak activation and action." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1813**(4): 521-531.

Wilson, N. R., J. Kang, E. V. Hueske, T. Leung, H. Varoqui, J. G. Murnick, J. D. Erickson and G. Liu (2005). "Presynaptic regulation of quantal size by the vesicular glutamate transporter VGLUT1." <u>J Neurosci</u> **25**(26): 6221-6234.

Wirawan, E., T. Vanden Berghe, S. Lippens, P. Agostinis and P. Vandenabeele (2012). "Autophagy: for better or for worse." <u>Cell Res</u> **22**(1): 43-61.

Wisniewski, H. M. and J. Wegiel (1991). "Spatial relationships between astrocytes and classical plaque components." <u>Neurobiol Aging</u> **12**(5): 593-600.

Wittmeier, S., G. Song, J. Duffin and C. S. Poon (2008). "Pacemakers handshake synchronization mechanism of mammalian respiratory rhythmogenesis." <u>Proc Natl Acad</u> <u>Sci U S A</u> **105**(46): 18000-18005.

Wojcik, S. M., J. S. Rhee, E. Herzog, A. Sigler, R. Jahn, S. Takamori, N. Brose and C. Rosenmund (2004). "An essential role for vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) in postnatal development and control of quantal size." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **101**(18): 7158-7163.

Woolley, C. S., N. G. Weiland, B. S. McEwen and P. A. Schwartzkroin (1997). "Estradiol increases the sensitivity of hippocampal CA1 pyramidal cells to NMDA receptor-mediated synaptic input: correlation with dendritic spine density." <u>J Neurosci</u> **17**(5): 1848-1859. Wootz, H., A. Enjin, A. Wallen-Mackenzie, D. Lindholm and K. Kullander (2010). "Reduced VGLUT2 expression increases motor neuron viability in Sod1(G93A) mice." <u>Neurobiol Dis</u> **37**(1): 58-66.

Xie, Z. and D. J. Klionsky (2007). "Autophagosome formation: core machinery and adaptations." <u>Nat Cell Biol</u> **9**(10): 1102-1109.

Yagi, H., I. Akiguchi, A. Ohta, N. Yagi, M. Hosokawa and T. Takeda (1998). "Spontaneous and artificial lesions of magnocellular reticular formation of brainstem deteriorate avoidance learning in senescence-accelerated mouse SAM." <u>Brain Res</u> **791**(1-2): 90-98.

Yagi, H., M. Irino, T. Matsushita, S. Katoh, M. Umezawa, T. Tsuboyama, M. Hosokawa, I. Akiguchi, R. Tokunaga and T. Takeda (1989). "Spontaneous spongy degeneration of the brain stem in SAM-P/8 mice, a newly developed memory-deficient strain." <u>J Neuropathol Exp Neurol</u> **48**(5): 577-590.

Yamada, S., S. Uchida, T. Ohkura, R. Kimura, M. Yamaguchi, M. Suzuki and M. Yamamoto (1996). "Alterations in calcium antagonist receptors and calcium content in senescent brain and attenuation by nimodipine and nicardipine." <u>J Pharmacol Exp Ther</u> **277**(2): 721-727.

Yamaguchi, T., W. Sheen and M. Morales (2007). "Glutamatergic neurons are present in the rat ventral tegmental area." <u>Eur J Neurosci</u> **25**(1): 106-118.

Yang, S., H. Qiao, L. Wen, W. Zhou and Y. Zhang (2005). "D-serine enhances impaired long-term potentiation in CA1 subfield of hippocampal slices from aged senescence-accelerated mouse prone/8." <u>Neurosci Lett</u> **379**(1): 7-12.

Yang, Z. and D. J. Klionsky (2010). "Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation." <u>Curr Opin Cell Biol</u> **22**(2): 124-131.

Young, M. M., Y. Takahashi, O. Khan, S. Park, T. Hori, J. Yun, A. K. Sharma, S. Amin, C. D. Hu, J. Zhang, M. Kester and H. G. Wang (2012). "Autophagosomal membrane serves as platform for intracellular death-inducing signaling complex (iDISC)-mediated caspase-8 activation and apoptosis." J Biol Chem **287**(15): 12455-12468.

Yousefi, S., R. Perozzo, I. Schmid, A. Ziemiecki, T. Schaffner, L. Scapozza, T. Brunner and H. U. Simon (2006). "Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis." <u>Nat Cell Biol</u> **8**(10): 1124-1132.

Yu, L., A. Alva, H. Su, P. Dutt, E. Freundt, S. Welsh, E. H. Baehrecke and M. J. Lenardo (2004). "Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8." <u>Science</u> **304**(5676): 1500-1502.

Yu, S. W., S. H. Baek, R. T. Brennan, C. J. Bradley, S. K. Park, Y. S. Lee, E. J. Jun, K. J. Lookingland, E. K. Kim, H. Lee, J. L. Goudreau and S. W. Kim (2008). "Autophagic death of adult hippocampal neural stem cells following insulin withdrawal." <u>Stem Cells</u> **26**(10): 2602-2610.

Yu, X. and S. He (2016). "The interplay between human herpes simplex virus infection and the apoptosis and necroptosis cell death pathways." <u>Virol J</u> **13**: 77.

Yuan, Z. Y., P. Gu, L. Liu, Y. Y. Wang, J. Liu, D. S. Cui, Y. Geng, Z. X. Zhang, A. P. Zhu, L. Ma and M. W. Wang (2009). "Neuroprotective effects of enriched environment in MPTP-treated SAMP8 mice." <u>Neurosci Lett</u> **454**(1): 6-10.

Zalckvar, E., H. Berissi, M. Eisenstein and A. Kimchi (2009). "Phosphorylation of Beclin 1 by DAP-kinase promotes autophagy by weakening its interactions with Bcl-2 and Bcl-XL." <u>Autophagy</u> **5**(5): 720-722.

Zalckvar, E., H. Berissi, L. Mizrachy, Y. Idelchuk, I. Koren, M. Eisenstein, H. Sabanay, R. Pinkas-Kramarski and A. Kimchi (2009). "DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy." <u>EMBO Rep</u> **10**(3): 285-292.

Zhang, J. and P. A. Ney (2009). "Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy." <u>Cell Death Differ</u> **16**(7): 939-946.

Zhang, Q., H. Ding, W. Li, Z. Fan, A. Sun, J. Luo and Z. J. Ke (2009). "Senescence accelerated mouse strain is sensitive to neurodegeneration induced by mild impairment of oxidative metabolism." <u>Brain Res</u> **1264**: 111-118.

Zhang, W., A. Barnbrock, S. Gajic, A. Pfeiffer and B. Ritter (2002). "Differential ontogeny of GABA(B)-receptor-mediated pre- and postsynaptic modulation of GABA and glycine transmission in respiratory rhythm-generating network in mouse." J Physiol **540**(Pt 2): 435-446.

Zhao, X. H., Y. Kitamura and Y. Nomura (1992). "Age-related changes in NMDAinduced [3H]acetylcholine release from brain slices of senescence-accelerated mouse." <u>Int J Dev Neurosci</u> **10**(2): 121-129.

Zhou, W. and J. Yuan (2014). "Necroptosis in health and diseases." <u>Semin Cell Dev</u> <u>Biol</u> **35**: 14-23.

Zhu, Y., L. Zhao, L. Liu, P. Gao, W. Tian, X. Wang, H. Jin, H. Xu and Q. Chen (2010). "Beclin 1 cleavage by caspase-3 inactivates autophagy and promotes apoptosis." <u>Protein</u> <u>Cell</u> **1**(5): 468-477.

Zimmermann, J., M. A. Herman and C. Rosenmund (2015). "Co-release of glutamate and GABA from single vesicles in GABAergic neurons exogenously expressing VGLUT3." <u>Front Synaptic Neurosci</u> **7**: 16.

Zink, M., B. Vollmayr, P. J. Gebicke-Haerter and F. A. Henn (2010). "Reduced expression of glutamate transporters vGluT1, EAAT2 and EAAT4 in learned helpless rats, an animal model of depression." <u>Neuropharmacology</u> **58**(2): 465-473.

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Représentation schématique des voies apoptotiques.	28
Figure 2 : Représentation schématique du processus autophagique.	34
Figure 3 : Représentation schématique de la structure de la protéine Becline 1.	36
Figure 4 : Représentation schématique des voies auditives issues de la cochlée et aboutissant au cortex	
auditif primaire.	47
Figure 5 : Représentation schématique de la cochlée et coupe transversale de l'organe de Corti.	48
Figure 6 : Représentation schématique du modèle de vieillissement selon Hosokawa et al.	53
Figure 7 : Représentation schématique des régulations de la voie septo-hippocampiquE	60
Figure 8 : Représentation schématique des propriétés bioénergétiques des VGLUTs.	68
Figure 9 : Distribution des ARNm codant pour VGLUT1-3 sur des coupes horizontales de cerveau de	
souris.	71
Figure 10 : Représentation schématique d'une cellule ciliée interne et de sa synapse à ruban	81

MIOT Stéphanie – thèse de doctorat – Année 2017

Résumé :

Avant d'être libéré dans la fente synaptique, le glutamate est accumulé dans les vésicules présynaptiques par les transporteurs vésiculaires du glutamate (VGLUTs). Il existe 3 types de VGLUTs. VGLUT3 possède une distribution anatomique et des fonctions atypiques. Au sein du système nerveux central, VGLUT3 est exprimé dans des neurones glutamatergiques mais aussi non glutamatergiques, dans lesquels il assure les fonctions de co-transmission ou de synergie vésiculaire. On le retrouve notamment dans certains neurones sérotoninergiques du raphé. Au sein de l'oreille interne, VGLUT3 est l'unique VGLUT décrit dans les cellules ciliées internes (CCI).

La sérotonine joue un rôle essentiel dans le contrôle respiratoire néonatal. En étudiant la respiration de souriceaux n'exprimant plus le VGLUT3, nous avons démontré le rôle de VGLUT3 dans l'adaptation au stress hypoxique néonatal.

Une mutation de VGLUT3 a été mise en évidence dans une surdité humaine très proche cliniquement de la presbyacousie et appelée DFNA25. En étudiant le phénotype auditif de souris exprimant cette mutation, nous avons prouvé l'implication de cette mutation dans l'atteinte des CCI à l'origine de la surdité DFNA25. L'étude des processus biochimiques mis en jeu nous a permis d'envisager un rôle indirect de VGLUT3 dans l'activation de la mort autophagique, via la protéine Becline 1 et une possible interaction au sein de la voie de la Culline 3.

L'ensemble de ce travail nous a permis de mettre en évidence un rôle de VGLUT3 dans l'adaptation aux conditions extrêmes telles que le développement néonatal ou le processus de vieillissement. Il ouvre de nouvelles perspectives sur les diverses fonctions des VGLUTs.

Mots clefs :

VGLUT3, stress hypoxique néonatal, sérotonine, DFNA25, cellules ciliées internes, autophagie, Culline 3

ATYPICAL VESICULAR GLUTAMATE TRANSPORTER TYPE 3 (VGLUT3) FUNCTION IN THE RESPONSE TO NEONATAL HYPOXIC STRESS, AND THE DFNA25 DEAFNESS

Abstract :

Before its release into synaptic cleft, glutamate is accumulated in presynaptic vesicles by vesicular glutamate transporters (VGLUTs). There are 3 types of VGLUTs. VGLUT3 presents atypical functions and anatomical distribution. In the central nervous system, VGLUT3 is expressed in glutamatergic and non glutamatergic neurons, in which it performs the co-transmission and the vesicular synergy. Particularly, we can observe VGLUT3 in serotoninergic neurons of raphe. In the inner ear, VGLUT3 is the unique VGLUT described in the inner hair cells (IHCs).

Serotonin plays a key role in the neonatal respiratory control. By exploring the respiration of VGLUT3 knock out mice pumps, we have demonstrated the role of VGLUT3 in the response to neonatal hypoxic stress.

One VGLUT3 mutation has been described in a human deafness clinically very close to presbycusis, the DFNA25 deafness. By studying the auditory phenotype of mice expressing this VGLUT3 mutation, we have proved the implication of this mutation in the IHCs impairment at the origin of DFNA25 deafness. Biochemical analysis have helped us to consider an indirect role of VGLUT3 in the autophagic death. Beclin 1 and a possible interaction between VGLUT3 and the Cullin3 pathways could be implicated.

All of our results allowed us to highlight a role of VGLUT3 in the adaptation to extreme conditions like neonatal development or aging process. They open new perspectives on the various functions of VGLUTs.

Key words

VGLUT3, neonatal hypoxic stress, serotonin, DFNA25, inner hair cells, autophagy, Cullin 3