



HAL
open science

Etude du rôle de VGLUT3, un transporteur vésiculaire du glutamate atypique, dans l'amygdale cérébrale dans le contexte de peur acquise

Nida Chabbah

► **To cite this version:**

Nida Chabbah. Etude du rôle de VGLUT3, un transporteur vésiculaire du glutamate atypique, dans l'amygdale cérébrale dans le contexte de peur acquise. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066280 . tel-02324611

HAL Id: tel-02324611

<https://theses.hal.science/tel-02324611>

Submitted on 22 Oct 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

Ecole doctorale 3C : Cerveau, Cognition, Comportement

Neuroscience Paris Seine / Systèmes Glutamatergiques Normaux et Pathologiques

Etude du rôle de VGLUT3, un transporteur vésiculaire du glutamate atypique, dans l'amygdale cérébrale dans le contexte de peur acquise.

Par Nida CHABBAH

Thèse de doctorat de Neurosciences

Dirigée par les Drs. Salah El MESTIKAWY et Stéphanie DAUMAS

Présentée et soutenue publiquement le 20 Octobre 2017

Devant un jury composé de :

Dr. Aline DESMEDT	Rapporteur
Dr. Laurence LANFUMEY	Rapporteur
Pr. Rachel SHERRARD	Examineur
Dr. Dominique HASBOUN	Examineur
Dr. Giovanni MARSICANO	Examineur
Dr. Salah El MESTIKAWY	Directeur de thèse
Dr. Stéphanie DAUMAS	Encadrante

À mon grand-père Ali Ben Mohamed CHABBAH,

« The only thing we have to fear is fear itself »

Franklin D. Roosevelt, 1933

« L'eau qui ne court pas fait un marais, l'esprit qui ne travaille pas fait un sot. »

« Au fond, Dieu veut que l'homme désobéisse. Désobéir, c'est chercher. »

Victor Hugo, Tas de pierres, 1901

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les Drs. Aline Desmedt et Laurence Lanfumey d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, ainsi que les Drs. Dominique Hasboun et Giovanni Marsicano, et le Pr. Rachel Sherrard d'avoir pris le temps de lire ce mémoire, et de juger et discuter de mes travaux de recherche.

Je souhaite, ensuite, remercier Salah. Merci de m'avoir accueillie dans ton équipe exclusivement féminine. Les discussions scientifiques que j'ai partagées avec toi m'ont beaucoup appris et ouvert l'esprit sur d'autres aspects de mon travail. Merci d'avoir été présent quand je me trouvais face à des impasses, de m'avoir prodigué d'excellents conseils et récompensée à base de glaces Berthillon.

Mes remerciements s'adressent ensuite à toi, Stéphanie. Quand je t'ai rencontrée, j'étais encore une de tes étudiantes de licence et je ne me voyais pas faire une thèse avec une autre personne que toi. La communication a tout de suite été facile entre nous, ce qui nous a permis d'avancer, d'échanger et de réfléchir assez librement. Merci pour la confiance que tu m'as accordée, pour la grande liberté de travail que tu m'as laissée, et pour tous les conseils que tu m'as donnés. Travailler à tes côtés pendant ces trois années m'a énormément enrichie tant sur le plan professionnel qu'humain. Steph, je pense que je peux dire que l'on s'est bien choisi !

Je voudrais également remercier les personnes qui m'ont aidée dans mes travaux : les membres de la plateforme d'imagerie du B7, et particulièrement Susanne Bolte, Richard Schwartzmann et Jean-François Gilles, mais aussi Sylvie Dumas, sans qui la réalisation des FISHs aurait été très compliquée pour moi. Je tiens également à remercier les animaliers du B7 et du B8, Fabrice et Goran. Merci Goran pour l'excellent travail que tu as réalisé pour la gestion de nos nombreuses lignées. Tu nous as beaucoup aidées.

Merci à tous les membres de mon équipe : Véro. B, Véro. F, Odile, Fiona et Nina d'avoir partagé cette expérience avec moi.

Odile, merci pour tout le soutien logistique que tu gères et ta bonne humeur ! Tu as un rôle essentiel au sein de notre équipe.

Véro. B et Véro. F, merci pour les échanges scientifiques que nous avons eus.

Un grand merci aux locataires du bureau des doctorants du B4, porte 422 passés et présents qui ont su rendre cette expérience exceptionnelle et agréable.

Merci à vous, Lauriane, Diana et Elsa, les « grandes sœurs », de m'avoir transmis ce que vous saviez avant votre départ du labo.

J'en viens à présent aux membres du « *Girls Band* » du bureau : Sara, Raphaële, Fiona et Nina. Merci les filles d'avoir été là quand ça n'allait pas (parce que beaucoup de mauvaises

péripéties nous avons eues ensemble) et quand ça allait aussi, pour votre soutien indéfectible et pour les nombreuses réflexions philosophiques que nous avons partagées sur la vie.

Sara, tu as été la médiatrice, la voix de la sagesse qui as su tamponner les frictions entre nous (presque jusqu'à la fin !). Merci de m'avoir prodigué les premiers secours quand j'avais un coup de moins bien tant psychologiquement que physiquement.

Raph, nos traditionnelles pauses potins-cl*** ont grandement participé à l'amélioration de ma psyché, malgré qu'elles m'aient exposée à un tabagisme passif certain. C'était le prix à payer !

Fiona, merci d'avoir apporter ta joie de vivre et ta gentillesse au bureau.

Nina, on a commencé en même temps notre thèse et on va la terminer presque au même moment également. Malgré qu'on ne se soit pas toujours bien entendu, on a toujours pû compter l'une sur l'autre en cas de besoin au labo. Merci d'avoir été là.

Bonne chance à Sara et Nina, qui soutiennent leur thèse dans peu de temps, et bon courage à Raph et Fiona pour la suite de la thèse ! Vous allez y arriver !!

Je voudrais également remercier les autres personnes du B4 pour leur accueil. Merci à Steph DG, Vincent, Victor, Franck, Barbara et Sophie pour les échanges que nous avons eus au niveau scientifique ou autre.

Merci Steph DG pour tes conseils et pour toutes les histoires que tu m'as racontées et qui ont participées à l'amélioration de mon humeur.

J'aimerais à présent remercier mes proches.

A mes parents, pour leur soutien sans faille au cours de ces trois années, pour toujours m'avoir poussée à donner le meilleur de moi-même et pour n'avoir jamais cessé de m'encourager, je vous remercie du fond du cœur. Merci à mes frères et sœurs : Staf, tu as réussi à me supporter pendant la rédaction en gardant ton calme ! Chapeau !, Sbe, ta contribution à mon ravitaillement a été essentielle !, Zazou, merci de m'avoir permis de me changer les idées avec tes anecdotes.

Merci à mes amis Adeline, A'dem, Thomas, Sami, Raphaëlle et Nathalie, qui pour certains d'entre eux, ont vécu une expérience similaire à la mienne (n'est-ce-pas les futurs docteurs Bokhari et Ayari ?). Merci d'avoir été là, pour votre soutien, pour tous les moments que l'on a partagés ensemble, pour l'annuel bal des pompiers grâce au « Caporal Artis » et votre amitié.

J'en arrive maintenant à la personne qui a su me faire découvrir et aimer un monde qui était inconnu pour moi, celui des Arts Martiaux. Merci à toi, Sifu Didier Beddar de me permettre d'apprendre à tes côtés le *Wing Chun* et de profiter de tes enseignements et de tes larges connaissances dans les autres pratiques martiales. J'ai commencé mes travaux de recherche en même temps que mon apprentissage martial, qui m'a beaucoup aidé à gérer différemment certaines situations tant au labo que dans la vie quotidienne. J'ai beaucoup appris avec toi pendant c'est trois ans, et ce n'est pas fini !

Merci à mes frères et sœurs d'armes de l'Académie : Nelly, Josse, Brice, Jacky et Medy, d'avoir été présents, de m'avoir soutenue, et parfois de m'avoir plus ou moins énervée (hein, Medy !) et pour les bons moments que l'on a passés ensemble, qui, j'en suis sûre, ne seront pas les seuls.

Josse, merci d'avoir veillé sur moi, même après ton départ à Bordeaux. Tu portes incontestablement bien l'attribut de « Bienveillant ». Et merci pour ta participation à cette thèse, tes corrections ont été les premières que j'ai reçues !

Nelly, tu as été l'oreille attentive à mes histoires de labo mais pas que, pendant ces trois ans. On a partagé trop de choses pour tout résumer en une phrase, alors je le ferai en un mot : Merci !

Enfin, je voudrais remercier un acteur important dans cette expérience qu'a été la thèse, l'Université de Jussieu. Des sous-sols au toit, du banc des amphithéâtres à la fonction d'enseignant, de TV Jussieu aux soirées étudiantes, des apéros sur les quais à ceux du « potager », du CPM à la DVE, ... (j'en ai encore d'autres, mais je vais m'arrêter là), je pense avoir fait le tour de ce qui est possible de vivre à l'intérieur de tes murs. Après 7 ans d'études, je finis par te quitter. Merci pour toutes les superbes aventures que tu m'as permis de vivre.

Merci à tous ceux que j'aurai pu oublier,

Et merci à vous, lecteurs de cette thèse.

LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	10
INTRODUCTION GÉNÉRALE	13
I/ GÉNÉRALITÉS SUR LA NEUROTRANSMISSION.....	14
II/ LE SYSTÈME GLUTAMATERGIQUE	16
II.1/ LE GLUTAMATE	16
II.1.a) À la découverte du glutamate ...	16
II.1.b) Un acteur clé du métabolisme.....	17
II.1.c) La fonction particulière de NT.....	18
II.2/ LA SYNAPSE GLUTAMATERGIQUE.....	20
II.2.a) Organisation structurelle de la synapse glutamatergique.....	20
II.2.b) La neurotransmission glutamatergique.....	21
II.2.c) Les acteurs majeurs de la transmission glutamatergique.....	24
II.3/ LES TRANSPORTEURS VÉSICULAIRES DU GLUTAMATE	29
II.3.a) Les différentes familles de transporteurs vésiculaires	29
II.3.b) La découverte des VGLUTs	32
II.3.c) La structure des VGLUTs	33
II.3.d) Propriétés biochimiques et pharmacologiques des VGLUTs	35
II.3.e) Distribution anatomique de VGLUT1 et VGLUT2.....	37
III/ LE TRANSPORTEUR VÉSICULAIRE DU GLUTAMATE 3 : VGLUT3	44
III.1/ DISTRIBUTION DE VGLUT3	44
III.2/ VGLUT3 DANS LES NEURONES NON-GLUTAMATERGIQUES.....	47
III.2.a) VGLUT3 dans les neurones sérotoninergiques.....	47
III.2.b) VGLUT3 dans les neurones GABAergiques.....	50
III.2.c) VGLUT3 dans les neurones cholinergiques.....	53
III.3/ LA SYNERGIE VÉSICULAIRE	56
III.4/ AUTRE DISTRIBUTION DE VGLUT3	59
III.4.a) VGLUT3 dans le reste du système nerveux.....	59
III.4.b) VGLUT3 dans les organes sensoriels.....	60
III.4.c) VGLUT3 dans les organes périphériques	64
IV/ L'AMYGDALÉ ET LES MÉMOIRES AVERSIVES	66
IV.1/ STRUCTURE DU COMPLEXE AMYGDALIEN	66
IV.1.a) Organisation morphologique et structurelle	66
IV.1.b) Organisation cellulaire	69
IV.2/ FONCTIONS ASSOCIÉES À L'AMYGDALÉ	72
IV.2.a) La découverte du rôle de l'amygdale dans la peur	72
IV.2.b) L'amygdale dans les processus d'apprentissage et de mémoires de peur	74
IV.2.c) Autres fonctions.....	77
IV.3/ APPRENTISSAGE ET MÉMOIRES ÉMOTIONNELS	78
IV.3.a) Différents types d'apprentissage et de mémoire.....	78
IV.3.b) Les mémoires aversives par le conditionnement de peur.....	80
IV.4/ LE RÉSEAU AMYGDALIEN DANS L'APPRENTISSAGE ASSOCIATIF AVERSIF	82
IV.4.a) Les connexions extra-amygdale.....	83
IV.4.b) Les connexions intra-amygdale.....	87
IV.4.c) Autres régions impliquées dans le réseau amygdalien	96
V/ LE TROUBLE DE STRESS POST-TRAUMATIQUE (TSPT).....	103
V.1/ QU'EST-CE QUE LE TROUBLE DE STRESS POST-TRAUMATIQUE ?	103

V.2/ LE TSPT DANS LE RÉSEAU AMYGDALIEN	104
V.3/ LES TRAITEMENTS DU TSPT	108
PROBLÉMATIQUE	112
MATÉRIEL ET MÉTHODES GÉNÉRALES	115
I/ ANIMAUX	116
II/ LES DIFFÉRENTES LIGNÉES GÉNÉTIQUES	116
II.1/ LA LIGNÉE VGLUT3 ^{-/-}	116
II.2/ LA LIGNÉE VGLUT3 ^{FLOX/FLOX}	117
II.3/ LES DOUBLES MUTANTS : LES LIGNÉES VGLUT3 ^{FLOX-VIAATCRE} , VGLUT3 ^{FLOX-SERTCRE} ET VGLUT3 ^{FLOX-CHATCRE}	117
III/ TECHNIQUES ANATOMIQUES	118
III.1/ HYBRIDATION <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE (FISH)	118
III.2/ IMMUNOFLUORESCENCE	120
III.3/ IMMUNO-AUTORADIOGRAPHIE - IAR	122
IV/ CHIRURGIE STÉRÉOTAXIQUE	122
V/ TESTS COMPORTEMENTAUX	123
V.1/ ACTIVITÉ LOCOMOTRICE – TEST D’ACTIMÉTRIE	123
V.2/ TEST DE L’OPEN FIELD (OF)	124
V.3/ TEST DU LABYRINTHE EN CROIX SURELEVÉ – EPM (<i>ELEVATED PLUS MAZE</i>)	124
V.4/ SENSIBILITÉ AUX CHOCS ÉLECTRIQUES	125
V.5/ TEST DU CONDITIONNEMENT DE PEUR – FC (<i>FEAR CONDITIONING</i>)	125
V.6/ TEST D’EXTINCTION DE CONDITIONNEMENT DE PEUR	126
VI/ STATISTIQUES	128
RÉSULTATS	129
ÉTUDE I :	
CARACTÉRISATION ANATOMIQUE DE VGLUT3 DANS L’AMYGDALE BASOLATÉRALE	
CHAPITRE I : NATURE DES NEURONES VGLUT3 POSITIFS DE L’AMYGDALE BASOLATERALE	130
I/ INTRODUCTION	131
II/ MATERIEL ET METHODES	132
II.1/ ANIMAUX	132
II.2/ DOUBLE HYBRIDATION <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE	132
III/ RESULTATS	132
III.1/ CARACTERISATION DE LA NATURE DES NEURONES VGLUT3 POSITIFS DE L’AMYGDALE BASOLATERALE	132
III.2/ QUANTIFICATION DES NEURONES VGLUT3 POSITIFS DE L’AMYGDALE BASOLATERALE	133
IV/ DISCUSSION	134
CHAPITRE II :	
NATURE DES TERMINAISONS VGLUT3 POSITIVES DE L’AMYGDALE BASOLATERALE	136
I/ INTRODUCTION	137
II/ MATERIEL ET METHODES	138

II.1/ ANIMAUX	138
II.2/ IMMUNOFLUORESCENCE ET QUANTIFICATION	138
III/ RESULTATS.....	138
III.1/ IMMUNOFLUORESCENCES VGLUT3 ET VIAAT, VACHT, OU VMAT2	138
III.2/ IMMUNOFLUORESCENCES VGLUT3 ET PV OU CCK	140
IV/ DISCUSSION.....	142
POINTS IMPORTANTS DE L'ÉTUDE I	145

ÉTUDE II :

CARACTÉRISATION COMPORTEMENTALE DE VGLUT3 DANS L'AMYGDALÉ BASOLATÉRALE

CHAPITRE I :

LE RÔLE DE VGLUT3 DANS LES MÉMOIRES AVERSIVES À TRAVERS L'ÉTUDE DES SOURIS VGLUT3^{-/-}

.....	146
I/ INTRODUCTION	147
II/ MATERIEL ET METHODES	148
II.1/ PROTOCOLE DE SENSIBILITÉ À LA DOULEUR	148
II.2/ TEST DU CONDITIONNEMENT DE PEUR (FC) ET D'EXTINCTION	149
III/ RESULTATS.....	149
III.1/ SENSIBILITÉ À LA DOULEUR.....	149
III.2/ TEST DU CONDITIONNEMENT DE PEUR - FC.....	150
III.3/ TEST D'EXTINCTION DE CONDITIONNEMENT DE PEUR	153
IV/ DISCUSSION.....	155

CHAPITRE II:

LE RÔLE DES DIFFÉRENTS SOUS-SYSTÈMES VGLUT3 POSITIFS DANS LES MÉMOIRES AVERSIVES... 160

I/ INTRODUCTION	161
II/ MATERIEL ET METHODES	163
II.1/ ANIMAUX	163
III.2/ TESTS COMPORTEMENTAUX	164
III/ RESULTATS.....	164
III.1/ VALIDATION ANATOMIQUE DES DIFFÉRENTES LIGNÉES GÉNÉTIQUES	164
III.2/ LES SOURIS VGLUT3 ^{FLOX-SERTCRE}	167
III.2.a) <i>Activité locomotrice</i>	167
III.2.b) <i>Anxiété</i>	167
III.2.c) <i>Test du conditionnement de peur - FC</i>	169
III.2.d) <i>Test d'Extinction de conditionnement de peur</i>	170
III.3/ LES SOURIS VGLUT3 ^{FLOX-VIAATCRE}	172
III.3.a) <i>Activité locomotrice</i>	172
III.3.b) <i>Anxiété</i>	173
III.3.c) <i>Test du conditionnement de peur - FC</i>	174
III.3.d) <i>Test d'Extinction de conditionnement de peur</i>	175
III.4/ LES SOURIS VGLUT3 ^{FLOX-CHATCRE}	177
III.4.a) <i>Activité locomotrice</i>	177
III.4.b) <i>Anxiété</i>	177
III.4.c) <i>Test du conditionnement de peur - FC</i>	178

III.4.d) Test d'Extinction de conditionnement de peur.....	179
IV/ DISCUSSION.....	181
CHAPITRE III :	
LE ROLE DE POPULATIONS GABAERGIQUES ET CHOLINERGIQUES VGLUT3 POSITIVES SPECIFIQUE	
DANS LES MEMOIRES AVERSIVES	188
I/ INTRODUCTION	189
II/ MATERIEL ET METHODES	190
II.1/ ANIMAUX	190
II.2/ ETUDES COMPORTEMENTALES.....	191
III/ RESULTATS.....	191
III.1/ INVALIDATION DE VGLUT3 DANS LES INTERNEURONES GABAERGIQUES DE L'AMYGDALE BASOLATERALE... 191	
III.1.a) Validation des injections	191
III.1.b) Activité locomotrice.....	192
III.1.c) Anxiété.....	192
III.1.d) Test du conditionnement de peur - FC	195
III.1.e) Test d'Extinction de conditionnement de peur.....	197
III.2/ INVALIDATION SPECIFIQUE DE POUR VGLUT3 DANS LES NEURONES CHOLINERGIQUES DU BASAL FOREBRAIN	
.....	199
III.2.a) Validation des injections	199
III.2.b) Activité locomotrice.....	199
III.2.c) Anxiété.....	200
III.2.d) Test du conditionnement de peur - FC	201
III.2.e) Test d'Extinction de conditionnement de peur.....	203
IV/ DISCUSSION.....	205
POINTS IMPORTANTS DE L'ÉTUDE II	210
DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALES	211
<hr/>	
RÉFÉRENCES	220
TABLE DES ILLUSTRATIONS	266
TABLE DES TABLEAUX	268

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AAV	<i>Adeno-associated virus</i>
AC	Adénylate Cyclase
ACh	Acétylcholine
ALAT	ALanine AminoTransferase
AMPA	Acide alpha-amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazole Propionique
AMPC	Adénosine MonoPhosphate cyclique
APC	<i>Amino acid/Polyamine/organocation</i>
AP-5	<i>Acide 2-amino-5-Phosphonovalérique</i>
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ASAT	ASpartate AminoTransferase
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
BA	Noyau Basal de l'amygdale
BDNF	<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
BLA	Complexe/Amygdale Basolatérale
BF	<i>Basal Forebrain</i>
BNPI	<i>Brain-specific Na⁺-dependent inorganic Phosphate co-transporter</i>
BNST	<i>Bed Nucleus of Stria Terminalis</i>
BMA	Noyau Basomédial de l'amygdale
Ca ²⁺	Ion Calcium
Calb/CB	Calbindine
CB1	Récepteur aux cannabinoïdes de type 1
CCCP	Carbonyl Cyanide M-Chloro-Phényldrazone
CCK	Cholécystokinine
CeA	Noyau Central de l'amygdale
CeL	Région latérale du Noyau Central de l'amygdale
CeM	Région médiale du Noyau Médial de l'amygdale
ChAT	<i>Choline Acetyl Transferase</i>
Cl ⁻	Ion Chlore
CPF	Cortex PréFrontal
CPFm	Cortex PréFrontal médian
CPFmd	Cortex PréFrontal médio-dorsal
DA	Dopamine
dACC	<i>Dorsal Anterior Cingulate Cortex</i>
DAG	DiAcylGlycérol
DGL α	DiacylGlycerol Lipase α
DIDS	4,4'-dithiocyanatostilbène-2,2'-disulfonique
DNPI	<i>Differentiation-associated Na⁺-dependent Inorganic Phosphate co-transporter</i>
DNQX	<i>6,7-DiNitroQuinoxaline-2,3-dione</i>
DVC	<i>Dorsal Vagal Complex</i>
EAAC1	<i>Excitatory Amino Acid Carrier 1</i>
EAAT	<i>Excitatory Amino Acid Transporter</i>
EPSP	<i>Excitatory PostSynaptic Potential</i>
FC	<i>Fear Conditioning</i>

GABA	Acide gamma-aminobutyrique
GAD	Glutamate Décarboxylase
GDH	Glutamate DeHydrogenase
GLAST-1	<i>Glutamate Aspartate Transporter-1</i>
Gln	Glutamine
GlpT	<i>Glycerol-3-phosphate Transporter</i>
GLS1/PAG	<i>Phosphate-Activated Glutaminase</i>
GLT1	<i>Glutamate Transporter 1</i>
Glu	Glutamate
GRP	Gastrine
GS	Glutamine Synthétase
HPC _D	Hippocampe Dorsal
HPC _V	Hippocampe Ventral
ICM	<i>Intercalated Cell Masses</i>
ICM _L	Cellules Intercalées latérales
ICM _{MD}	Cellules intercalées médio-dorsales
ICM _{MV}	Cellules Intercalées médio-ventrales
iGluR	<i>Ionotropic Glutamate Receptor</i>
IL	Région InfraLimbique du cortex préfrontal
IPF	<i>Insulin Promoter Factor</i>
IP3	Inositol-3-Phosphate
K ⁺	Ion Potassium
KO	<i>KnockOut</i>
LA	Noyau Latéral de l'amygdale
LA _D	Région dorsale du Noyau Latéral de l'amygdale
LA _V	Région ventrale du Noyau Latéral de l'amygdale
LTP	<i>Long-Term Potentiation</i>
MFS	<i>Major Facilitator Super Families</i>
Mg ²⁺	Ion Magnésium
MGE	<i>Medial Ganglionic Eminence</i>
mGluR	<i>Metabotropic Glutamate Receptor</i>
mIPSC	<i>Miniature Inhibitory PostSynaptic current</i>
MSN	<i>Medium Spiny Neuron</i>
Na ⁺	Ion Sodium
NBM	Noyau Basal de Meynert
NE	Noradrénaline
NEM	N-éthylmaléimide
NMDA	N-Methyl-D-Aspartate
nNOS	<i>Neuronal Nitric Oxide Synthase</i>
NO	Oxide nitrique
NPY	Neuropeptide Y
NPT	<i>Na⁺-dependent Phosphate Transporter</i>
NT	Neurotransmetteur

PA	Potentiel d'Action
PAG	<i>PeriAqueductal Grey</i>
Pi	Phosphate inorganique
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-diphosphate
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine Kinase C
PL	Région PréLimbique du cortex préfrontal
PLC	Phospholipase C
PSD	<i>Postsynaptic Density</i>
PV	Paralbumine
RD	Raphé Dorsal
RM	Raphé médian
SC	Stimulus Conditionné
SERT	<i>Serotonin transporter</i>
SI	Stimulus Inconditionné
SLC	<i>Solute Carrier family</i>
SN	Stimulus Neutre
SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
SOM	Somatostatine
SSRI	<i>Selective Serotonin Reuptake Inhibitor</i>
synCAM	<i>Synaptic Vesicle Precursor</i>
TANs	<i>Tonically Active Neurons</i>
TrkB	<i>Tropomyosin receptor kinase B</i>
TSPT	Trouble de Stress Post-Traumatique
TTX	Tétradotoxine
VAChT	<i>Vesicular Acetylcholine Transporter</i>
VEAAT	<i>Vesicular Excitatory Amino Acid Transporter</i>
VIAAT	<i>Vesicular inhibitory amino acid Transporter</i>
VGAT	<i>Vesicular GABA Transporter</i>
VGLUT	<i>Vesicular Glutamate Transporter</i>
VMAT	<i>Vesicular Monoamine Transporter</i>
VNUT	<i>Vesicular Nucleotide Transporter</i>
VS	Vésicule Synaptique
ZA	Zone active
$\Delta\mu\text{H}^+$	Gradient électrochimique
ΔpH	Gradient de pH
$\Delta\psi$	Gradient électrique
2-AG	2-Arachidonoylglycerol
5-HT	Sérotonine
V-ATPase	Pompe ATPase vacuolaire

INTRODUCTION GENERALE

I/ GÉNÉRALITÉS SUR LA NEUROTRANSMISSION

Dans le système nerveux central (SNC), il existe différents types de populations cellulaires. Parmi les cellules cérébrales, on trouve des cellules capables de transmettre des signaux électrochimiques appelées neurones.

Les neurones sont constitués d'un corps cellulaire (ou soma) duquel se détachent des dendrites, et d'un axone. Les neurones sont des cellules spécialisées dans la communication. Cette communication entre neurones peut se faire de façon chimique ou électrique. La transmission chimique a lieu au niveau de jonctions spécialisées entre la terminaison d'un axone et le dendrite d'un autre neurone formant ce que l'on appelle une synapse. Entre ces deux éléments pré et post synaptiques se trouve la fente synaptique (**Figure 1**).

La transmission électrique existe du fait que des courants électriques se propagent et parcourent les neurones du corps cellulaire à l'axone entraînant des modifications des propriétés électriques de la membrane plasmique.

La transmission chimique d'information passe par la libération d'un composé chimique dans la fente synaptique appelé neurotransmetteur (NT). Celui-ci, une fois libéré par le neurone, va se fixer à ses récepteurs sur le neurone cible entraînant une cascade d'évènements au sein de ce neurone receveur.

Autour de ces neurones et de la fente synaptique, les astrocytes appartenant à la famille des cellules gliales, jouent de nombreux rôles et en particulier, celui de tampon des effets de ces NT notamment par leur recapture.

Le glutamate (Glu) est un des acteurs clés de la neurotransmission. En effet, il s'agit du neurotransmetteur excitateur principal du SNC qui provoque une réponse excitatrice sous forme de potentiel électrique chez le neurone cible.

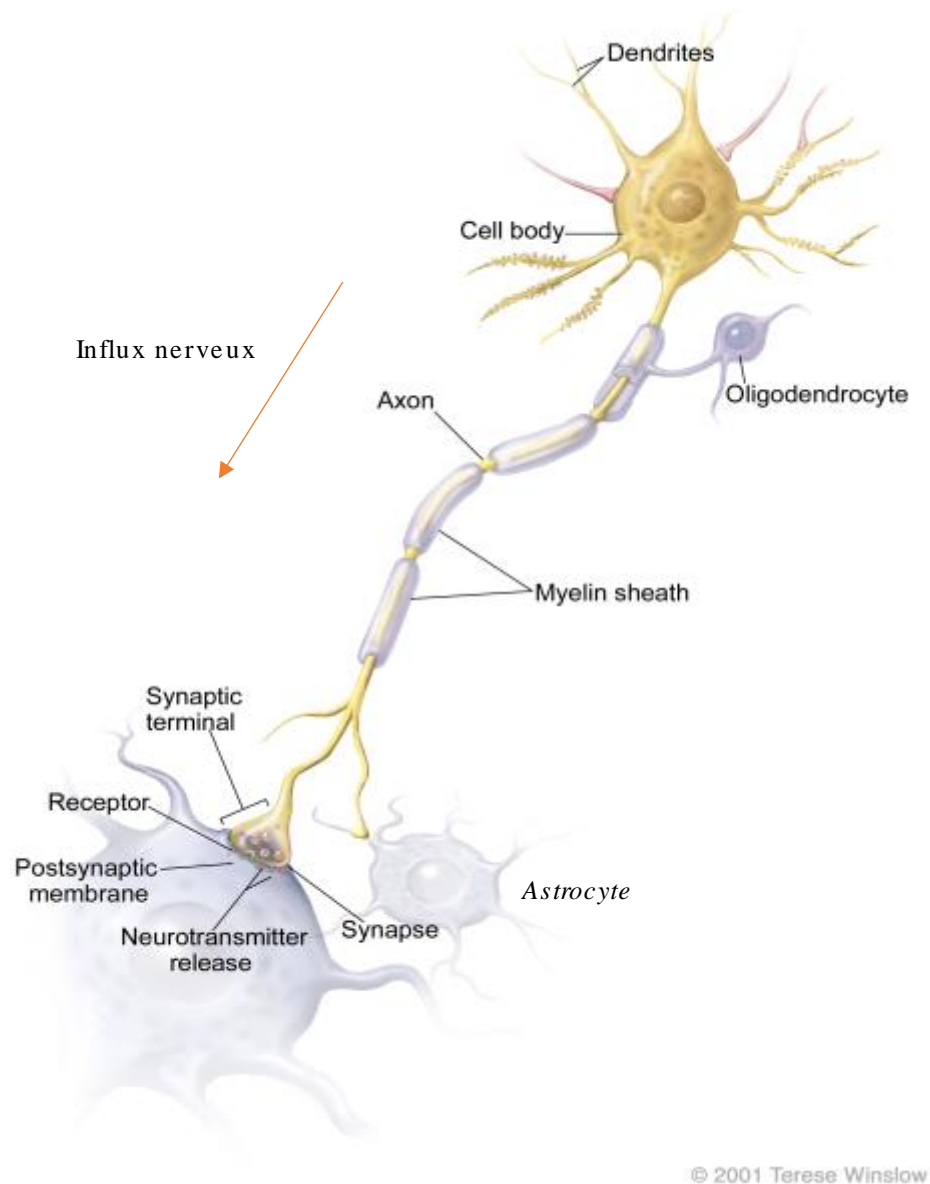


Figure 1: Schéma de l'organisation structurale d'un neurone faisant synapse.

L'influx nerveux parcourt le neurone du corps cellulaire à la terminaison de l'axone où il fait synapse au niveau des dendrites du neurone cible. Les astrocytes environnant s'assurent de la qualité de la transmission nerveuse. (D'après *Regenerative Medicine, Department of Health and Human Services, August 2006. Image par Terese Winslow*)

II/ LE SYSTÈME GLUTAMATERGIQUE

II.1/ LE GLUTAMATE

II.1.a) À la découverte du glutamate ...

Le glutamate (forme anionique de l'acide glutamique) est un acide aminé composé de deux groupes carboxyles $-\text{COOH}$ et d'une fonction amine $-\text{NH}_2$ (**Figure 2**).

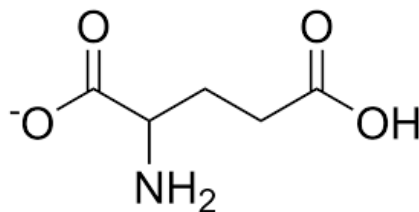


Figure 2: Structure chimique de la forme anionique de l'acide glutamique (glutamate).

Bien qu'étant un acide aminé non essentiel pour l'Homme car il peut être fabriqué par l'organisme via d'autres précurseurs endogènes, le glutamate est l'acide aminé le plus présent dans l'alimentation humaine.

En effet, en 1908 le scientifique japonais Ikeda a cherché à identifier le composé présent dans les algues (famille des *Laminariaceae*) donnant ce goût si particulier aux soupes japonaises. De ces algues, il isola le glutamate à qui il attribua le nom de saveur « umami » (savoureux). Aujourd'hui, cette saveur est reconnue comme étant le cinquième goût.



Figure 3: Le glutamate dans la distribution alimentaire de nos jours.

Sac de 450g de glutamate monosodique commerciale (à gauche). Le glutamate comme additif alimentaire, présent dans de nombreux produits de consommation quotidiens (à droite).

Le glutamate est largement utilisé comme exhausteur de goût dans les préparations alimentaires sous le code E620. Cet additif alimentaire peut également être abondamment trouvé sous la forme de glutamate monosodique (E621) (**Figure 3**).

Ce dernier a été synthétisé chimiquement par Ikeda et Suzuki à des fins industrielles et commerciales. De nos jours, la production mondiale de glutamate est estimée à 2 millions de tonnes par an (**Figure 3**) (Sano, 2009).

II.1.b) Un acteur clé du métabolisme

Le glutamate est largement répandu dans l'organisme où il est présent à des concentrations différentes selon les compartiments cellulaires. En effet, sa concentration plasmatique est comprise entre 30 et 100 μM . Dans les organes périphériques, on le retrouve à une concentration de 5000 μM dans les muscles squelettiques, tandis que dans le cytoplasme des érythrocytes, sa concentration est de 500 μM . Dans le cerveau, sa concentration globale est de 10 mM. La présence de glutamate circulant dans le liquide céphalorachidien est relativement faible ($< 1 \mu\text{M}$) par rapport à sa concentration dans les vésicules synaptiques (VS) à hauteur de 100 mM (Filho et al., 1999; Meldrum, 2000; Small and Tauskela, 2005).

A travers sa distribution, le glutamate est impliqué dans différentes voies fonctionnelles (**Figure 4**) et joue notamment un rôle central dans le métabolisme cellulaire (Krebs, 1935; Owen et al., 2002). En effet, il participe à plusieurs réactions métaboliques comme la synthèse des protéines, la détoxification de l'ammoniaque et le cycle de l'urée (Frigerio et al., 2008; Nissim, 1999; Owen et al., 2002; Weil-Malherbe, 1950).

Le glutamate apparaît aussi comme un précurseur majeur du cycle de Krebs (Owen et al., 2002). En effet, dans les muscles squelettiques par exemple, il est utilisé comme précurseur anaplérotique afin d'augmenter l'efficacité du métabolisme oxydatif dans le cycle de Krebs (Owen et al., 2002; Rennie et al., 2001). Il agit également comme précurseur pour permettre la formation de petite molécule telle que le glutathion (Meister et al., 1979).

De plus, le glutamate peut intervenir en tant que messenger intracellulaire dans les organes et tissus périphériques. En effet, dans les cellules pancréatiques, le glutamate agit dans la régulation de la sécrétion d'insuline suite à une augmentation de glucose (Maechler and

Wollheim, 1999). Il peut également inhiber la synthèse de mélatonine dans l'épiphyse suite à la réception d'un signal cholinergique (Moriyama et al., 2000).

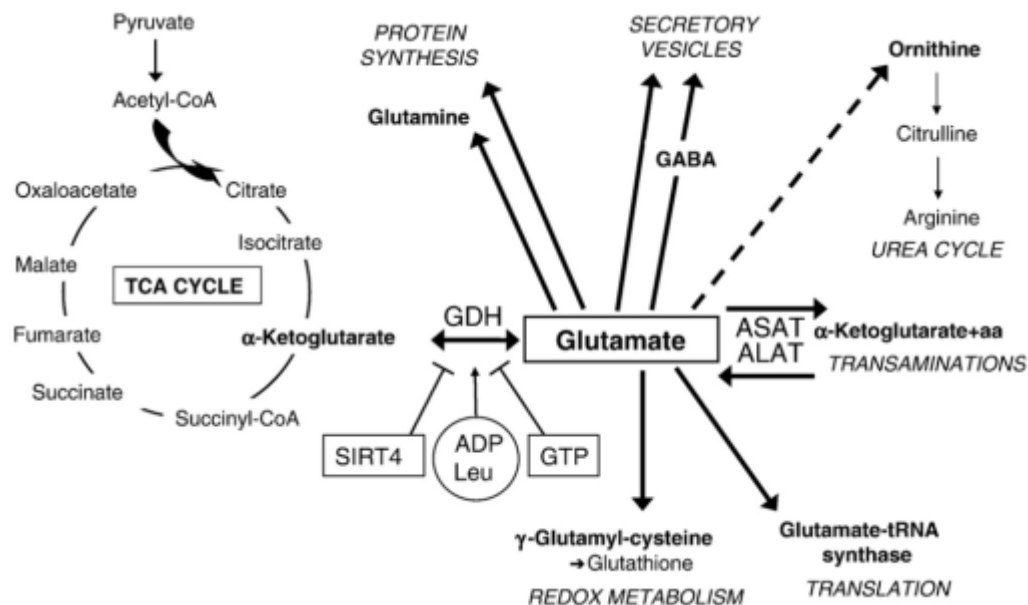


Figure 4 : Schéma des principales voies fonctionnelles impliquant le glutamate.

Le glutamate est au centre de nombreuses réactions métaboliques. Différents enzymes participent à la synthèse et à la dégradation du glutamate comme la glutamate déhydrogenase (GDH), l'alanine aminotransférase (ALAT) et l'aspartate aminotransférase (ASAT). (D'après Frigerio et al., 2008).

Dans le SNC, deux fonctions additionnelles majeures sont associées au glutamate. Celui-ci joue le rôle de NT excitateur dans le SNC chez les mammifères (Schwartz, 2000; Fonnum, 1984; Hackett and Ueda, 2015). D'autre part, il sert d'intermédiaire métabolique de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) qui est le principal NT inhibiteur (Roberts and Frankel, 1950).

II.1.c) La fonction particulière de NT

Le rôle excitateur du glutamate a tout d'abord été découvert à travers son aspect excitotoxique dans les années 1950 par le scientifique Hayashi. En effet, il a observé que des injections à forte concentration de glutamate de sodium dans la matière grise du cortex moteur entraînaient des convulsions de type épileptique chez le chien, le singe et l'homme (Hayashi, 1954).

Aujourd'hui, on sait qu'un excès de glutamate dans le milieu extracellulaire entraîne une hyperstimulation des neurones induisant leur mort (Meldrum, 2000; Meldrum and

Garthwaite, 1990). Cet excès est impliqué dans certaines pathologies comme l'épilepsie, la sclérose amyotrophique latérale, les accidents vasculaires cérébraux et des formes d'amnésie (Meldrum, 2000). C'est pourquoi il est important de maintenir une concentration extracellulaire du glutamate sous le seuil d'excitotoxicité afin de préserver l'homéostasie du cerveau. La concentration intracellulaire de glutamate est particulièrement élevée (1-10 mM) par rapport à la concentration en glutamate dans la fente synaptique (1 μ M). Des processus de régulation interviennent donc suite à la libération du glutamate dans la fente synaptique comme sa recapture rapide par les astrocytes (Meldrum, 2000). Des propriétés protectrices comme l'imperméabilité de la barrière hémato-encéphalique au passage du glutamate de la circulation générale au cerveau permettent aussi la préservation du bon fonctionnement cérébral (Smith, 2000).

À la suite de ces travaux, Curtis et ses collaborateurs ont mis en évidence que le glutamate a un effet excitateur et dépolarisant sur les neurones de la moelle épinière. Ils découvrent ainsi que le glutamate présente des caractéristiques communes avec celles définissant les NT excitateurs (Curtis et al., 1960).

Trente ans plus tard, le rôle du glutamate en tant que principal NT excitateur est confirmé car il remplit les différents critères qui s'y rapportent (Schwartz, 2000; Fonnum, 1984; Hackett and Ueda, 2015) :

- Il est synthétisé dans des neurones spécifiques car il ne franchit pas la barrière hémato-encéphalique
- Il est stocké au niveau des terminaisons présynaptiques dans les VS
- Il est libéré dans la fente synaptique en réponse à des stimuli physiologiques sous forme de potentiel d'action (PA) présynaptique de façon dépendante des ions calciums et en quantité suffisante pour induire une réponse de l'élément postsynaptique
- Il existe des récepteurs spécifiques reconnaissant le glutamate à la synapse
- Le glutamate libéré est rapidement éliminé de la fente synaptique à l'aide de mécanismes de recapture, et notamment par les transporteurs (EAATs).

Le glutamate est un élément clé de la transmission excitatrice neuronale notamment à travers son rôle au sein de la synapse glutamatergique.

II.2/ LA SYNAPSE GLUTAMATERGIQUE

II.2.a) Organisation structurale de la synapse glutamatergique

La transmission neuronale des informations chez les mammifères se fait à travers la zone de contact fonctionnelle qui s'établit entre deux neurones que l'on appelle synapse (**Figure 5**). La synapse est constituée de trois compartiments : le bouton présynaptique, la fente synaptique et l'élément postsynaptique (Gray, 1959; Sheng and Hoogenraad, 2007).

Dans le bouton présynaptique, les VS stockent le glutamate à l'aide de transporteurs vésiculaires du glutamate, les VGLUTs. Une partie de ces vésicules vont être arrimées à la membrane plasmique du bouton présynaptique dans la zone active (ZA). C'est dans cette zone que le processus d'exocytose va avoir lieu aboutissant à la libération du glutamate dans la fente synaptique (Storm-Mathisen and Ottersen, 1990; Südhof and Rizo, 2011).

Une zone dense aux électrons apparaît au niveau de la membrane de l'élément postsynaptique. Cette zone est appelée densité postsynaptique (PSD). Elle caractérise les synapses glutamatergiques. On y retrouve une forte concentration en protéines de signalisation et structurale (Kim and Ryan, 2009; Sheng and Kim, 2011). En effet, de nombreux récepteurs au glutamate s'y trouvent.

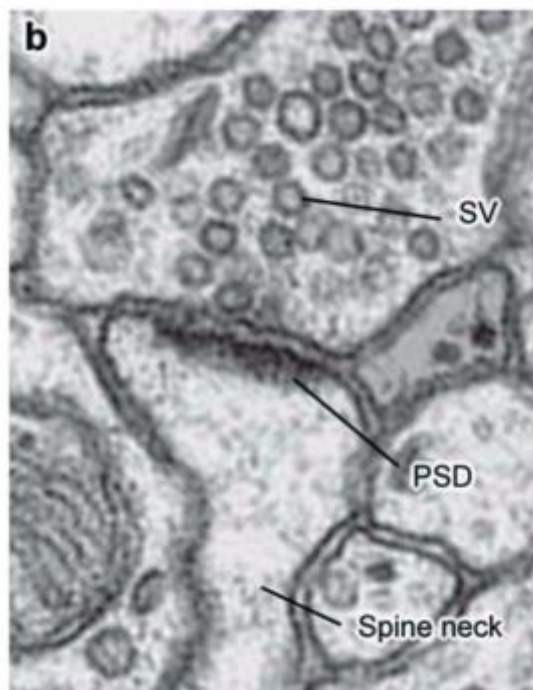


Figure 5: Organisation structurale d'une synapse excitatrice en microscopie électronique.

Le bouton pré-synaptique contient les VS (SV) stockant les NT. Ces derniers vont être libérés dans la fente synaptique qui sépare l'élément présynaptique du PSD se trouvant au niveau du dendrite du neurone postsynaptique.

(D'après Sheng et al., 2007)

Cette zone dense aux électrons joue un rôle important dans la transduction du signal et la plasticité synaptique. La fente synaptique sépare les éléments pré- et postsynaptiques d'une distance comprise entre 15 et 25 nm. Sa largeur est de 30 nm (Zuber et al., 2005).

L'intégrité de la synapse est préservée à l'aide de molécules d'adhésion synaptique (neuroligines/neurexines, cadhérines, éphrines et récepteurs éphrines et synCAM) qui interagissent avec des protéines d'échafaudage intracellulaires. Ces interactions sont également essentielles pour le fonctionnement de la machinerie synaptique dans la PSD (Chua et al., 2010; Gray, 1969; Hruska and Dalva, 2012).

II.2.b) La neurotransmission glutamatergique

Le fonctionnement de la synapse glutamatergique passe par la transduction successive d'un signal électrique en signal chimique liée à la libération du NT. Dans le neurone postsynaptique, ce signal chimique est converti en signal électrique suite à l'activation des récepteurs postsynaptiques par le glutamate (Kandel et al., 2000)).

En effet, suite à l'arrivée d'un PA entraînant une entrée de calcium dans le neurone présynaptique, les vésicules libèrent leur contenu en glutamate dans la fente synaptique par exocytose au niveau de la ZA. Le glutamate, une fois libéré, va interagir avec ses récepteurs au niveau de l'élément postsynaptique, conduisant à une réponse de ce dernier sous forme de potentiel postsynaptique excitateur (EPSP).

Différents récepteurs du glutamate existent au niveau de l'élément postsynaptique :

- Les récepteurs ionotropiques : AMPA, NMDA, Kainate
- Les récepteurs métabotropiques : mGluR1-8.

Pour rétablir une concentration physiologique, le glutamate résiduel présent dans la fente synaptique a deux devenir principaux :

- Il est recapté par diffusion simple dans les synapses (Danbolt, 2001)
- Il est recapté par les Transporteurs des Acides Aminés Excitateurs (EAAT) présents sur les membranes des cellules environnantes (Anderson and Swanson, 2000; Danbolt, 2001; Erecińska and Silver, 1990; Logan and Snyder, 1972).

La recapture du glutamate se fait essentiellement par les astrocytes via les transporteurs EAAT1 et EAAT2. Elle peut également être réalisée par les neurones à l'aide de EAAT3 et EAAT4.

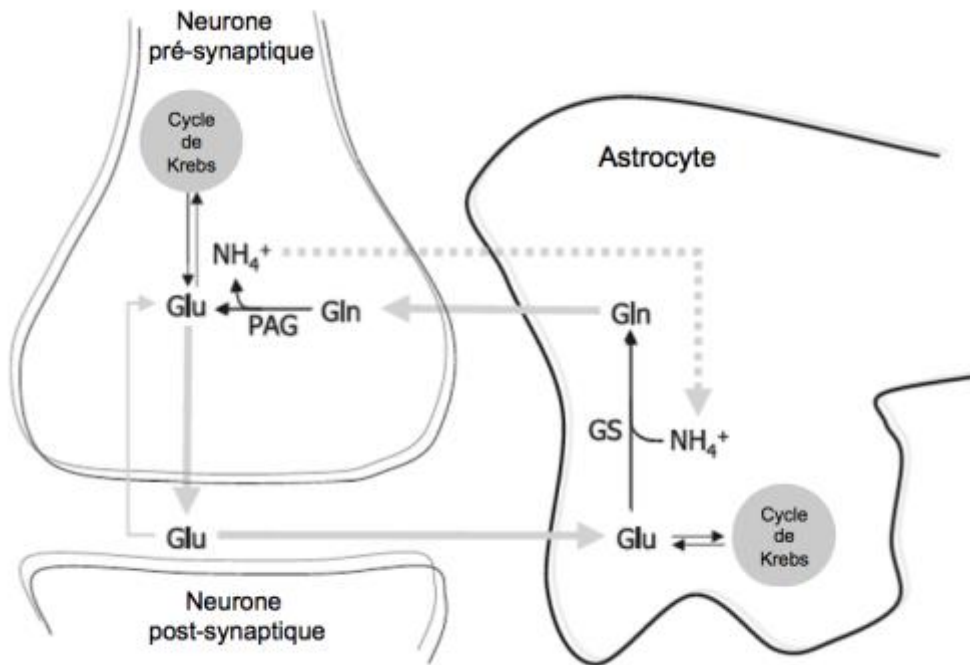


Figure 6 : Schéma du cycle glutamine-glutamate.

Le glutamate (Glu) libéré dans la fente synaptique par exocytose et capté par l'astrocyte pour être transformé en glutamine (Gln). La Gln est ensuite libérée par l'astrocyte pour être recaptée par le neurone. La Gln va alors être convertie en Glu par la mitochondrie neuronale. Le Glu peut être transformé en alpha-cétoglutarate pour intégrer le cycle de Krebs dans le neurone comme dans l'astrocyte. (D'après Back et al., 2006)

Dans l'astrocyte, le glutamate est converti en alpha-cétoglutarate par la glutamate déshydrogénase ou par une transaminase afin d'intégrer par la suite le cycle de Krebs. Il peut également être transformé en glutamine par la glutamine synthétase ATP-dépendante (GS) (Erecińska and Silver, 1990; Laake et al., 1995; Marcaggi and Coles, 2001). La glutamine est ensuite libérée dans l'espace extracellulaire avant d'être captée par les terminaisons axonales où elle est transformée en glutamate par une enzyme mitochondriale, la glutaminase activée par le phosphate (GLS1 ou PAG pour *phosphate-activated glutaminase*) (Erecińska and Silver, 1990).

La glutamine est essentielle à la formation du glutamate neuronale et au bon fonctionnement de la synapse glutamatergique. Ce processus est appelé le cycle glutamine-glutamate (**Figure 6**) (Bak et al., 2006; Van den Berg and Garfinkel, 1971).

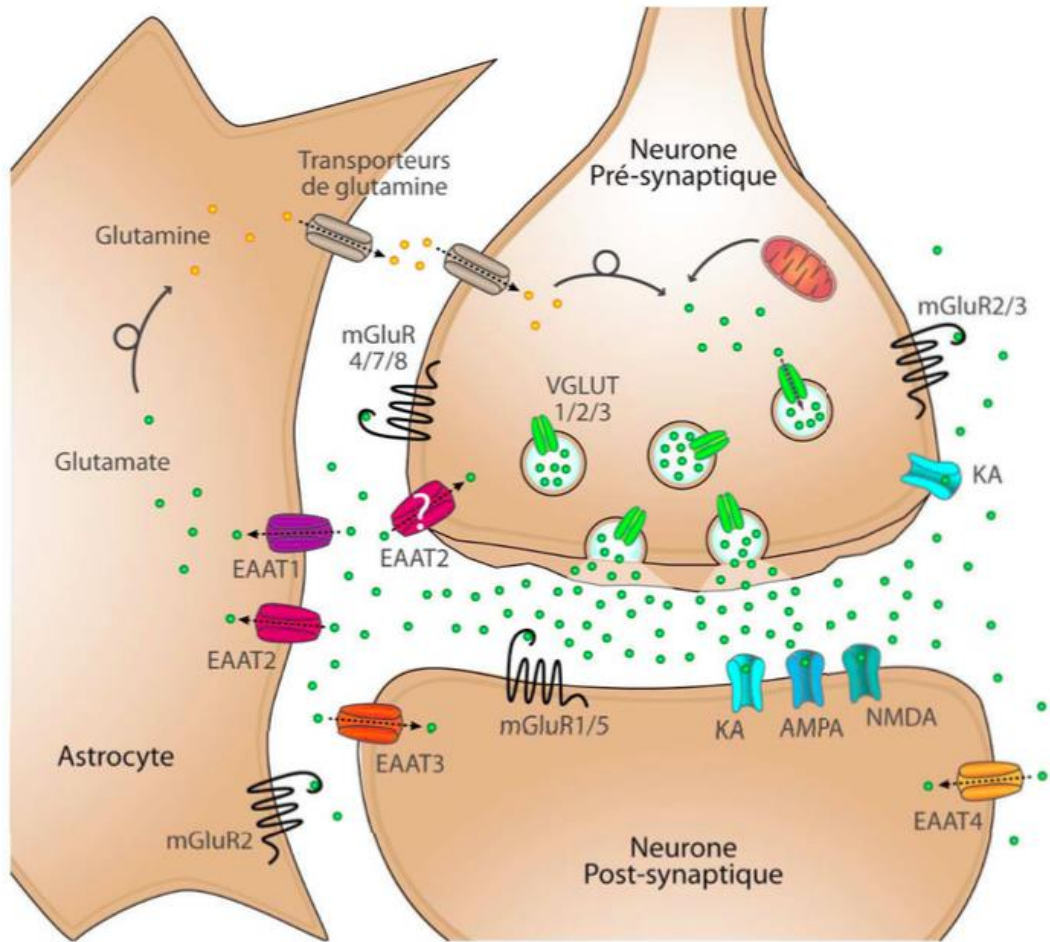


Figure 7: Schéma d'une synapse glutamatergique.

Le glutamate synthétisé dans le neurone présynaptique est accumulé dans les VS à l'aide des transporteurs vésiculaires du glutamate (VGLUTs). Une fois libéré dans la fente synaptique, il active ses récepteurs présents sur le neurone post-synaptique. La transmission excitatrice s'achève lorsque le glutamate est recapturé par les astrocytes et les neurones via les transporteurs plasmiques (EAATs).

Ainsi, la synapse glutamatergique ne fait pas intervenir seulement les neurones qui se transmettent les informations électriques et chimiques, mais sollicite également les cellules gliales comme les astrocytes afin de maintenir une communication neuronale efficace dans le SNC (**Figure 7**).

Au sein de cette synapse, une large variété d'acteurs intervient dont notamment des facteurs interagissant directement avec le glutamate comme les récepteurs du glutamate ou encore les transporteurs du glutamate.

II.2.c) Les acteurs majeurs de la transmission glutamatergique

II.2.c.i) Les récepteurs du glutamate

La transmission neuronale du signal glutamatergique est possible par la liaison du glutamate sur des récepteurs spécifiques. Il en existe deux catégories :

- Les récepteurs ionotropiques (iGluR) ou récepteurs-canaux qui permettent une transmission synaptique excitatrice rapide
- Les récepteurs métabotropiques (mGluRs) couplés à des protéines G faisant intervenir des seconds messagers. Ces récepteurs permettent au glutamate d'exercer un rôle modulateur, et notamment un effet inhibiteur.

➤ Les récepteurs ionotropiques

Les récepteurs ionotropiques sont des récepteurs-canaux. Ils sont exprimés dans environ 70% des synapses du cerveau des mammifères ce qui en fait les récepteurs les plus abondants du SNC (Bekkers and Stevens, 1989). Quatre sous-groupes de iGluRs ont été définis à partir de la séquence de leurs sous-unités et de leurs affinités pharmacologiques pour des ligands de synthèse. La première classification de ces récepteurs a été réalisée selon leur agoniste le plus sélectif (**Tableau 1**).

Les récepteurs AMPA sont des hétérotétramères formés de quatre sous-unités. Les sous-unités existantes sont nommées GluR1-4. Les ligands de ces récepteurs sont le glutamate et l'acide alpha-amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazole Propionique connu sous le nom de AMPA. La fixation du glutamate sur les quatre sites de liaison du récepteur AMPA entraîne à elle seule l'activation de ce dernier. Cette activation se traduit par l'ouverture rapide du canal ionique permettant l'entrée de sodium et de potassium, et la dépolarisation de la membrane plasmique (Ozawa et al., 1998; Pinheiro and Mulle, 2008). La désensibilisation du récepteur est également rapide ce qui conduit à une perte d'activité (Armstrong et al., 2006). Les récepteurs AMPA s'activent plus rapidement que les récepteurs NMDA et précèdent généralement l'activation de ces derniers. La présence des récepteurs AMPA à la membrane plasmique au niveau de la PSD est régulée et dépend notamment de leur mobilité. En effet, ces récepteurs sont capables de se déplacer de quelques microns par seconde. Cette propriété s'inscrit au sein d'un mécanisme permettant de moduler l'intensité de la transmission

synaptique (Anggono and Huganir, 2012; Choquet and Triller, 2013; Gielen, 2010; Heine et al., 2008).

Les récepteurs NMDA sont aussi des tétramères, formés de deux sous unités GluN1 et généralement de deux sous unités GluN2. Il existe sept sous-unités différentes permettant de former les récepteurs NMDA. Ces récepteurs sont activés par le L-glutamate, le L-aspartate et le N-méthyl-D-aspartate (NMDA). Toutefois, la simple liaison du ligand au récepteur n'est pas suffisante pour déclencher l'activation du récepteur. En effet, à l'état basal, le magnésium (Mg^{2+}) bloque le passage des cations par sa fixation au milieu du canal ionique. La dépolarisation de la membrane est nécessaire pour déplacer le Mg^{2+} et libérer ainsi le canal. De plus, pour pouvoir être effectif et permettre la transmission de l'influx nerveux, la liaison du glutamate au récepteur doit être associée à celle d'un co-activateur, la glycine sur son propre site sur le récepteur NMDA. Une fois ces conditions respectées, la fixation du glutamate peut alors entraîner une entrée massive de calcium augmentant davantage la dépolarisation de la membrane (Köhr, 2006; Ozawa et al., 1998). La réponse permise par les récepteurs NMDA est lente et cinétiquement plus étendue que celle induite par les récepteurs AMPA. Elle joue un rôle central dans la plasticité synaptique (Casado et al., 2002; Daoudal and Debanne, 2003; Gielen, 2010; Lüscher and Malenka, 2012).

Les récepteurs Kainate sont des tétramères qui peuvent être constitués de cinq sous unités différentes (GluK1-5). Ils sont activés par le glutamate et par un composé extrait de l'algue rouge *Digenea simplex*, le kainate. Etant aussi des canaux perméables au sodium et au potassium, l'activation de ces récepteurs entraîne les mêmes événements que ceux déclenchés par l'activation des récepteurs AMPA (Ozawa et al., 1998). Les récepteurs Kainate se trouvent au niveau de la membrane postsynaptique comme les autres récepteurs ionotropiques, mais également au niveau présynaptique où ils jouent le rôle d'autorécepteur régulant positivement la transmission glutamatergique (Gielen, 2010; Rodríguez-Moreno and Sihra, 2007).

Enfin, les récepteurs Delta appartiennent à la famille des iGluRs d'après leur séquence en acides aminés. Ils sont constitués de deux sous-unités différentes appelés delta 1 et delta 2 localisées dans des régions différentes du cerveau.

Delta 1 est exprimé dans les cellules ciliées internes du système auditif, les cellules bipolaires et le ganglion rétinien et dans l'organe vestibulaire (Jakobs et al., 2007; Safieddine and Wenthold, 1997; Schmid and Hollmann, 2008). Il est impliqué dans l'audition des hautes

fréquences et dans le maintien de l'homéostasie ionique dans la cochlée basale. Sa délétion entraîne un comportement émotionnel et social anormal chez la souris (Yadav et al., 2012).

Delta 2 quant à lui est essentiellement présent dans les cellules de Purkinje dans le cervelet. La délétion de delta 2 chez les souris engendre une ataxie et une altération de la plasticité synaptique, de la synaptogénèse des cellules de Purkinje, de l'apprentissage moteur et de la coordination (Wang et al., 2003; Yuzaki, 2004). Aucun ligand endogène de ces récepteurs n'est connu à ce jour et les agonistes des autres iGluRs n'activent pas les sous unités Delta.

➤ Les récepteurs métabotropiques

Les récepteurs métabotropiques ou mGluRs appartiennent à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (Nicoletti et al., 2011). Huit sous-types de mGluRs sont identifiés et classés en trois groupes selon leurs homologies de séquence (70% d'homologie dans un groupe, 40% d'homologie intergroupe), leurs pharmacologies, et les voies de transductions auxquelles ils sont associés (Conn and Pin, 1997; Nakanishi, 1992). Les trois groupes sont composés de :

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

D'un point de vue fonctionnel, l'activation de ces récepteurs induit l'intervention de seconds messagers tel que l'AMP-cyclique (AMPC) ou l'inositol-3-phosphate (IP-3) impliqués dans des voies cellulaires différentes. La cinétique d'activation et de propagation du signal est plus lente chez les mGluRs que chez les iGluRs.

Les récepteurs du groupe I sont couplés à la protéine Gq /G11 entraînant l'activation de la phospholipase C (PLC) qui clive le phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP2) en IP3 et en DiAcylGlycérol (DAG). L'IP3 va permettre la libération du calcium du réticulum endoplasmique lisse et le DAG va activer la protéine kinase C (PKC). Les récepteurs des groupes II et III utilisent quant à eux la voie impliquant l'AMPC. En effet, ils sont couplés à la protéine Gi/Go qui inhibe l'adénylate cyclase (AC), enzyme catalysant la réaction d'ATP en AMPC. Ainsi, par cette inhibition, la concentration en AMPC intracellulaire diminue tout comme celle du calcium. (**Tableau 1**) (Ferraguti and Shigemoto, 2006; Kew and Kemp, 2005).

II.2.c.ii) Les transporteurs du glutamate

Il existe deux types de transporteurs du glutamate :

- Les transporteurs des Acides Aminés Excitateurs (EAATs) qui sont des transporteurs localisés sur la membrane plasmique. Ils permettent d'éliminer rapidement le glutamate de la fente synaptique afin de réguler son activité et de prévenir son excitotoxicité
- Les transporteurs vésiculaires du glutamate (VGLUTs) qui permettent l'accumulation du glutamate dans les VS.

➤ Les transporteurs des Acides Aminés Excitateurs (EAATs)

Les transporteurs des Acides Aminés Excitateurs ou EAATs appartiennent à la famille des SLC1 (*SoLute Carrier*). Cinq transporteurs différents ont été identifiés et appelés EAAT1-5. Ils présentent 50 à 60 % d'homologie (Seal and Amara, 1999). Ces transporteurs sont exprimés par les neurones et les cellules gliales et sont des acteurs majeurs de la transmission glutamatergique. En effet, le rôle essentiel de ces transporteurs est l'élimination du glutamate de la fente synaptique qui s'accompagne d'un cotransport d'ions sodium et hydrogène et d'un antiport de potassium (Kanai and Hediger, 2004). A travers la recapture du glutamate, les EAAT contrôlent ainsi la durée et l'étendue du message glutamatergique et permettent de protéger les neurones de l'action excitotoxique du glutamate.

De plus, ces transporteurs ont une localisation différentielle au sein du SNC. Les EAAT1-3 sont les plus abondants. EAAT1 et EAAT2 sont présents dans les astrocytes alors que EAAT3 et EAAT4 sont des transporteurs neuronaux (Furuta et al., 1997; Perego et al., 2000) (**Figure 8**). On retrouve également les EAAT1-3 et -5 dans les tissus périphériques. EAAT5 est aussi présent au niveau des bâtonnets et des cellules bipolaires de la rétine (Eliasof et al., 1998; Gegelashvili and Schousboe, 1998).

➤ Les transporteurs vésiculaires du glutamate (VGLUTs)

Au sein du neurone, le glutamate est internalisé dans des VS à l'aide de transporteurs particuliers, les transporteurs vésiculaires du glutamate nommés VGLUTs identifiés dans les années 2000. Il existe trois sous types de transporteurs : VGLUT1, VGLUT2 et VGLUT3. VGLUT1 et VGLUT2 définissent les neurones glutamatergiques à l'instar de leur homologue VGLUT3 (El Mestikawy et al., 2011).

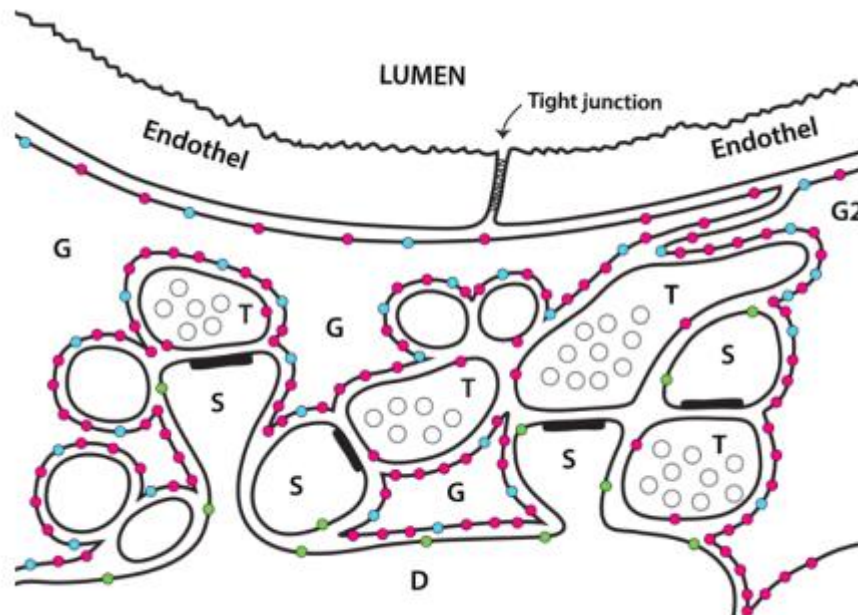


Figure 8 : Schéma de la distribution des transporteurs plasmiques du glutamate (EAATs) autour de synapses et proche d'un vaisseau sanguin dans l'hippocampe.

Quatre terminaisons glutamatergiques (T) sont représentées formant des synapses au niveau d'épines dendritiques (S). Les astrocytes (G) sont autour de ces neurones. EAAT1 (bleu) et EAAT2 (rouge) sont exprimés sur les astrocytes, alors que EAAT3 (vert) est présent sur les neurones. (D'après Zhou et al., 2014)

II.3/ LES TRANSPORTEURS VÉSICULAIRES DU GLUTAMATE

II.3.a) Les différentes familles de transporteurs vésiculaires

La transmission chimique nécessite l'accumulation des NT dans les VS. Cette étape est permise par les transporteurs vésiculaires.

Les transporteurs vésiculaires sont membres d'une famille de protéines membranaires de transport appelée *Solute Carriers* (SLC) composée de 300 protéines organisées en 51 catégories (Hediger et al., 2013). Aujourd'hui, treize transporteurs vésiculaires sont identifiés et classés en trois groupes (SLC17, SLC18, SLC32) d'après leur substrat et leur similarité de séquence (Omote et al., 2011).

Les transporteurs du groupe SLC17 permettent l'accumulation vésiculaire de NT anioniques (Reimer, 2013). Neuf membres ont été identifiés :

- Les gènes SLC17A1-4 codent les transporteurs phosphate sodium-dépendant connus respectivement sous les noms de NPT1, NPT2, NPT3 et NPT4. Ces transporteurs sont

impliqués dans le transport d'anions organiques pour l'élimination rénale des xénobiotiques (Reimer, 2013).

- Le transporteur vésiculaire des acides aminés excitateurs (VEAAT) est codé par le gène SLC17A5 (Miyaji et al., 2008). Il s'agit d'un cotransporteur d'H⁺ et d'acide sialique lysosomal (Miyaji et al., 2008; Verheijen et al., 1999). Il a été également montré qu'il participait au transport du glutamate et de l'aspartate en tant que NT (Miyaji et al., 2011). Toutefois le rôle de l'aspartate comme NT est encore controversé (Herring et al., 2015).
- Les gènes SLC17A6-8 codent les transporteurs vésiculaires du glutamate, les VGLUT1-3 (El Mestikawy et al., 2011a; Takamori et al., 2000).
- Enfin, le transporteur vésiculaire de nucléotide VNUT codé par le gène SLC17A9 permet l'entrée d'ATP dans les vésicules synaptiques car l'ATP est considérée comme un NT de la signalisation purinergique (Nishida et al., 2014; Sawada et al., 2008).

Les membres du groupe SLC18 interviennent dans le transport de NT cationiques comme les monoamines (sérotonine, dopamine, noradrénaline, adrénaline et histamine) et l'acétylcholine (Reimer, 2013). Il existe trois membres au sein de ce groupe :

- Le transporteur vésiculaire de monoamine de type 1, VMAT1, codé par le gène SLC18A1 permet l'accumulation de monoamines. Il est exprimé dans les cellules endocrines périphériques des glandes surrénales.
- Le transporteur vésiculaire de monoamine de type 2 nommé VMAT2 et codé par le gène SLC18A2 intervient également dans le transport des monoamines. Toutefois, sa distribution diffère de celle de VMAT1. En effet, VMAT2 est retrouvé dans les neurones aminergiques du SNC.
- Enfin, un transporteur vésiculaire de l'acétylcholine appelé VACHT est codé par le gène SLC18A3.

Le dernier groupe répertorié est celui des SLC32 (gène SLC32A1) impliqué dans l'accumulation de composés électriquement neutres comme le GABA ou la glycine (Reimer, 2013). Le seul transporteur connu à l'heure actuelle est identifié sous le nom de transporteur vésiculaire d'acides aminés inhibiteurs (VGAT ou VIAAT) (McIntire et al., 1997; Sagné et al., 1997). L'entrée de GABA ou de glycine nécessite un cotransport d'ions Cl⁻ (Juge et al., 2009).

D'autre part, du fait des forces motrices et des modes de régulation propres à ces trois catégories de transporteurs, une autre classification s'est ajoutée. En effet, les transporteurs

SLC17 et SLC18 appartiennent à la super famille des *Major Facilitator Super Families* ou MFS. Cette super famille regroupe tous les transporteurs actifs secondaires, soit plus de 3600 protéines et est répandue dans l'ensemble du vivant (Reddy et al., 2012). Quant aux SLC32, ils sont membres de la super famille des *Amino acid/Polyamine/organocation* ou APC (Wong et al., 2012).

D'un point de vue fonctionnel, les transporteurs vésiculaires sont des transporteurs secondaires. Ces transporteurs sont capables d'accumuler les NT dans les VS en utilisant l'énergie générée par un gradient de proton créé par la pompe ATPase vacuolaire (V-ATPase). L'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP en ADP entraîne l'entrée des ions H^+ dans les VS conduisant à la formation d'un gradient électrochimique ($\Delta\mu_{H^+}$). Le gradient électrochimique créé est composé d'un gradient de pH (ΔpH) dû à l'acidification des VS, et d'un gradient électrique ($\Delta\psi$) lié à l'entrée des charges positives dans la vésicule synaptique. L'activité des transporteurs dépend de ce gradient électrochimique qui peut être modulé par la perméabilité aux ions Cl^- de la vésicule synaptique (**Figure 9**).

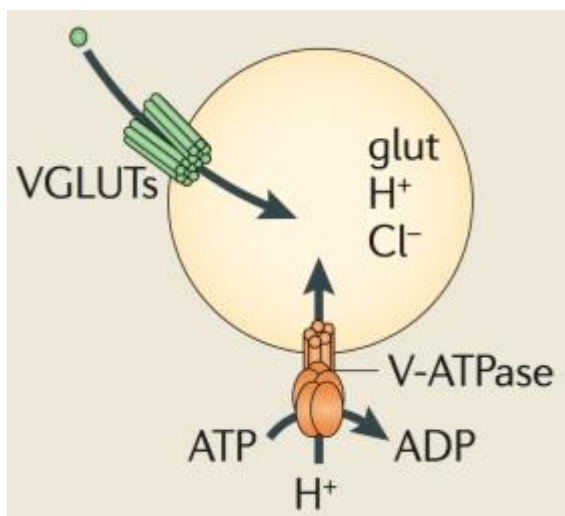


Figure 9 : Représentation schématique d'une vésicule synaptique glutamatergique.

La pompe V-ATPase va permettre l'entrée de protons H^+ grâce à l'hydrolyse de l'ATP en ADP. L'acidification de la vésicule va alors favoriser l'entrée du glutamate dans la vésicule synaptique.

(D'après El Mestikawy, 2011)

Les transporteurs vésiculaires sont considérés comme des acteurs déterminant la quantité de NT accumulés dans les VS. Ainsi, la modification du nombre et de l'activité de ces transporteurs joue un rôle essentiel dans la modulation de la neurotransmission (Daniels et al., 2004, 2011; Edwards, 2007; Moechars et al., 2006; Song et al., 1997; Williams, 1997; Wojcik et al., 2004). Cependant, cette affirmation ne semble pas totalement fondée en ce qui concerne les VGLUTs (Ramet et al., 2017).

II.3.b) La découverte des VGLUTs

Les transporteurs vésiculaires du glutamate appartiennent à la famille SLC17. Ces transporteurs jouent un rôle primordial dans la transmission de l'information excitatrice (Fonnum, 1984). Trois VGLUTs sont identifiés à l'heure actuelle (El Mestikawy et al., 2011).

La première étude réalisée sur ces transporteurs vésiculaires date de 1994. En effet, Ni et ses collaborateurs ont isolé une protéine localisée spécifiquement dans le cerveau partageant une séquence similaire aux transporteurs de phosphate inorganique dépendant du sodium. Cette protéine fut dans un premier temps appelée BNPI pour *brain-specific Na⁺-dependent inorganic phosphate co-transporter* (Ni et al., 1994).

Six ans plus tard, deux études indépendantes ont mis en évidence que le BNPI était en fait un transporteur vésiculaire du glutamate. En effet, la transfection de cette protéine dans des neurones GABAergiques leur conférait la capacité de libérer du glutamate (Takamori et al., 2000). De plus, Bellochio et ses collaborateurs ont rapporté que le BNPI était capable de transporter le glutamate à l'intérieur des VS (Bellochio et al., 1998, 2000). Ces deux études confirment le rôle de BNPI dans le transport vésiculaire du glutamate et le renomment VGLUT1.

Parallèlement, la même année 2000, un autre transporteur de phosphate inorganique dépendant du sodium a été découvert et appelé DNPI (*differentiation-associated Na⁺-dependent inorganic phosphate co-transporter*) (Aihara et al., 2000). En 2001, cinq groupes de recherche différents ont mis en évidence que le DNPI contribuait au transport vésiculaire de glutamate. Le DNPI a alors été renommé VGLUT2 (Bai, 2001; Fremeau et al., 2001; Herzog et al., 2001; Takamori et al., 2001; Varoqui et al., 2002).

Un troisième transporteur vésiculaire du glutamate a été identifié en 2002 et nommé VGLUT3. VGLUT3 partage toutes les caractéristiques structurales et fonctionnelles des deux autres sous-types de VGLUTs (Fremeau et al., 2002; Gras et al., 2002; Schäfer et al., 2002; Takamori et al., 2002). Toutefois, sa distribution au sein du cerveau est surprenante. En effet, alors que VGLUT1 et VGLUT2 sont des marqueurs des neurones glutamatergiques, VGLUT3 est exprimé par des neurones qui utilisent un autre NT que le glutamate (Gras et al., 2002). Cette propriété laissait présager un rôle atypique de VGLUT3 (Gras et al., 2002; Herzog et al., 2001).

II.3.c) La structure des VGLUTs

Les trois VGLUTs présentent un fort degré d'identité de leur séquence protéique, proche de 70% au sein d'une même espèce (Gras et al., 2002). Les régions présentant une forte homologie sont les domaines transmembranaires des VGLUTs (environ 90% d'homologie). En revanche, les régions N- et C- terminales présentent une variation de séquence plus importante (respectivement 17% et 2% d'homologie). Ce sont ces régions terminales qui pourraient conférer aux VGLUTs des propriétés fonctionnelles différentes (Vinatier et al., 2006) (**Figure 10**).

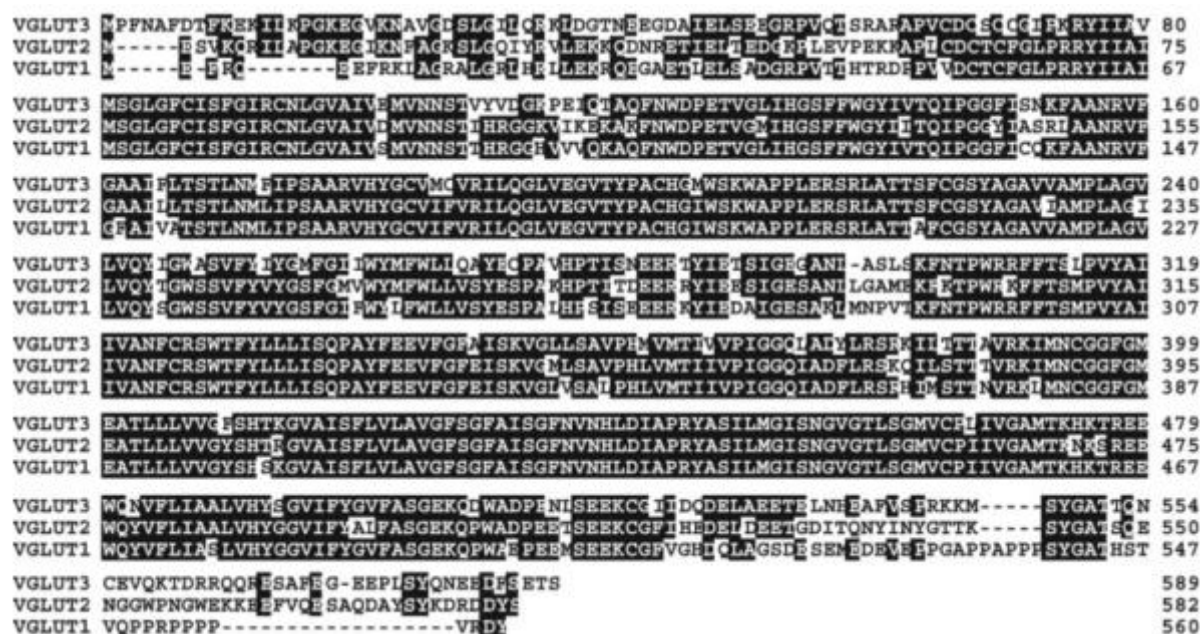


Figure 10 : Aligment des séquences d'acides aminés de VGLUT1, VGLUT2 et VGLUT3 chez le rat.

Les lettres surlignées en noir indiquent les résidus identiques. Les régions centrales sont hautement conservées par rapport aux régions périphériques présentant plus de variations de séquences. (D'après Gras et al., 2002)

Les gènes codant les VGLUTs seraient conservés au cours de l'évolution. En effet, différents isoformes des VGLUTs ont été identifiés dans diverses branches de l'arbre phylogénétique, à savoir chez la drosophile (Daniels et al., 2004), le poisson zèbre (Higashijima et al., 2004a, 2004b), la grenouille (Gleason et al., 2003), ou encore le nématode *Caenorhabditis elegans* (Lee et al., 1999) (**Figure 11**).

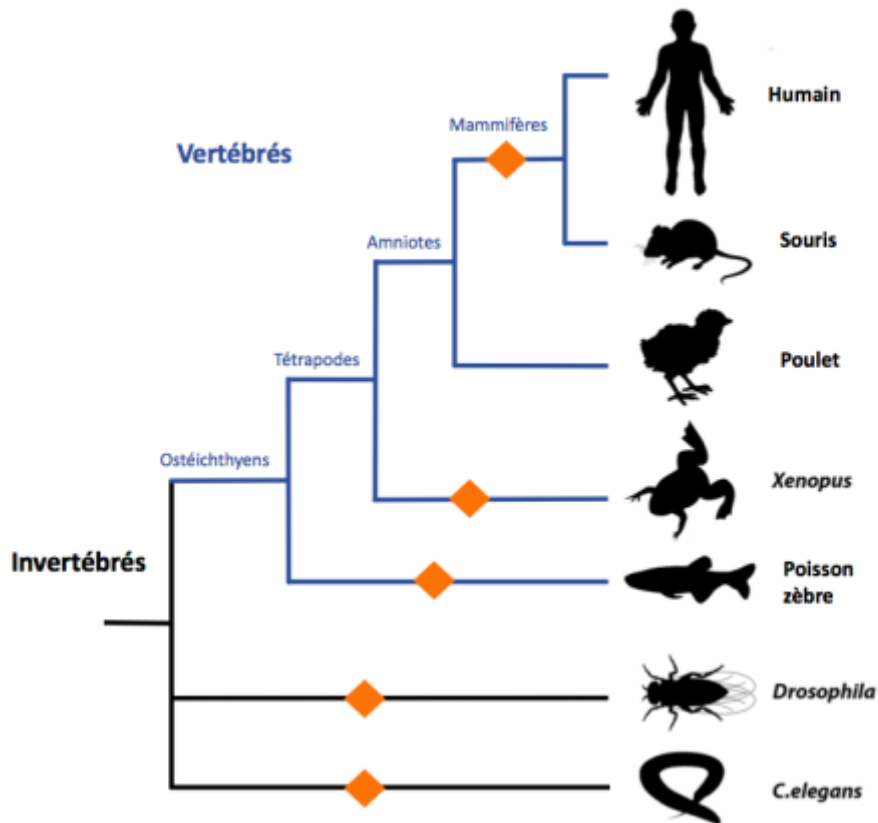


Figure 11: Arbre phylogénétique illustrant la conservation du gène codant les VGLUTs au cours de l'évolution.

Les losanges oranges représentent la présence d'un isoforme des VGLUTS.

La structure tridimensionnelle des VGLUTs est à ce jour mal connue. Toutefois, la structure cristallographique du transporteur du glycerol-3-phosphate (GlpT) de la bactérie *Escherichia Coli*, un lointain orthologue bactérien des VGLUTs, permettrait d'établir un modèle prédictif de la structure 3D des VGLUTs (Huang et al., 2003). D'après l'étude d'Almqvist et ses collaborateurs, les VGLUTs seraient composés de 12 domaines transmembranaires.

Les domaines hydrophobes seraient organisés en deux groupes symétriques de six hélices transmembranaires chacun, reliés par une longue boucle cytoplasmique (Almqvist et al., 2007). Ce modèle putatif conférerait une conformation intra-vésiculaire close, alors que la région intra-cytoplasmique serait accessible à l'eau et à d'autres substrats (**Figure 12**).

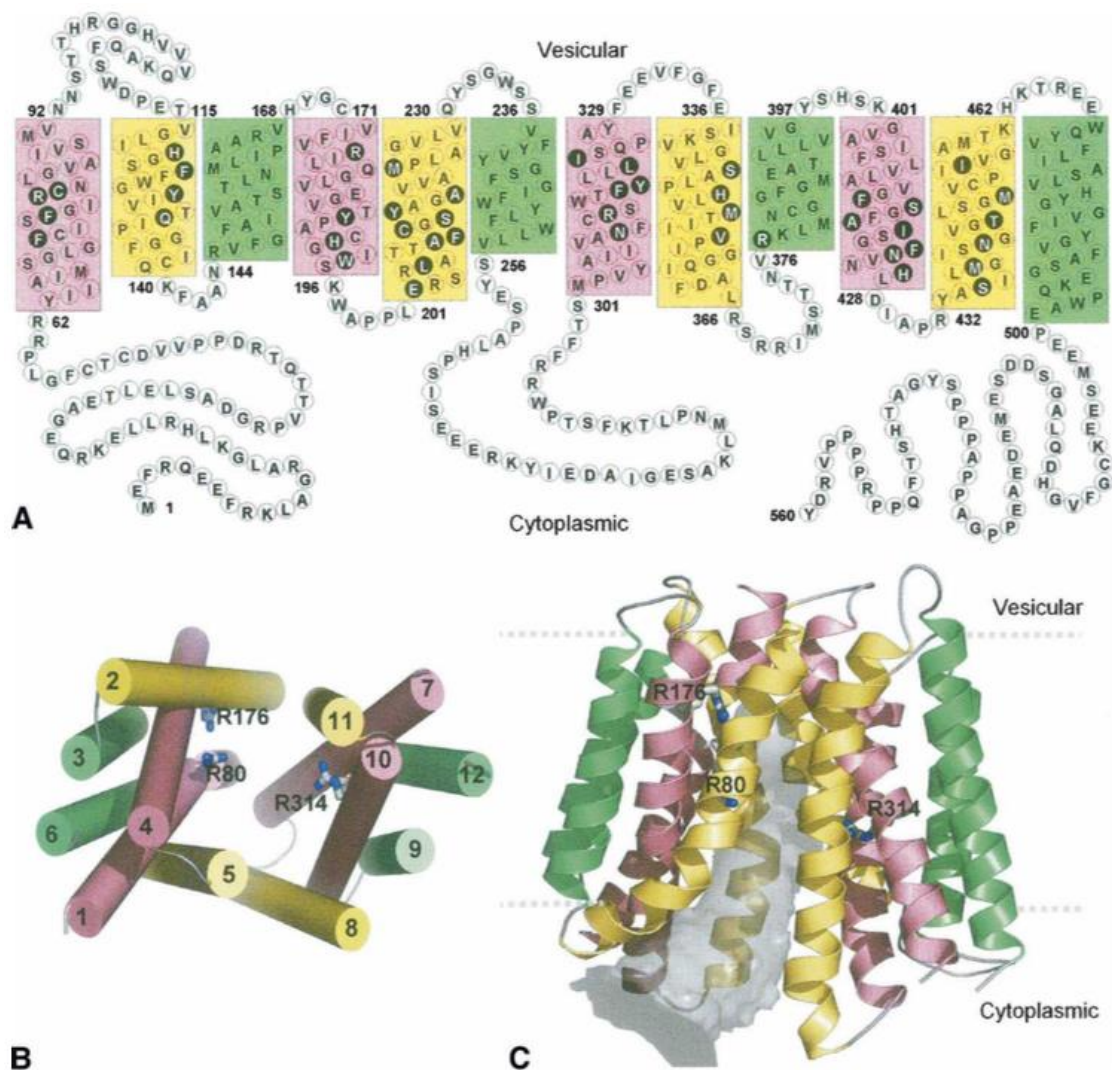


Figure 12 : Modèle 3D de la structure de VGLUT1 humain obtenue par homologie avec GlpT, un transporteur bactérien.

A) Topologie 2D proposée de VGLUT1 avec 12 domaines transmembranaires (colorés). B) Représentation en 3D des hélices transmembranaires depuis le cytoplasme. Les groupes d'hélices 1 à 6 et 7 à 12 seraient disposés de façon symétrique. C) Le pore (volume gris) est ouvert du côté cytoplasmique. (D'après *Almqvist et al., 2007*)

II.3.d) Propriétés biochimiques et pharmacologiques des VGLUTs

Les transporteurs vésiculaires du glutamate présentent des caractéristiques spécifiques pour l'accumulation de glutamate dans les VS.

En effet, ces transporteurs ont une affinité pour le glutamate de l'ordre du millimolaire (K_m 1 à 5 mM) ce qui est relativement faible par rapport à celle d'autres transporteurs comme les EAATs (K_m environ 4-40 μM) (Reimer et al., 2001). Malgré cette faible affinité, les VGLUTs transportent spécifiquement le glutamate. Ils sont incapables de transporter le GABA,

la glutamine, l'aspartate ou tout autre NT. Les VGLUTs sont les seuls membres de la famille des SLC17 à présenter une pareille sélectivité pour leurs substrats.

Comme les autres transporteurs vésiculaires, l'activité des VGLUTs dépend de l'existence du gradient de proton. Toutefois, leur dépendance vis à vis du gradient électrochimique porte essentiellement sur la composante électrique contrairement aux transporteurs VMATs et VACHTs dont l'activité dépend davantage de la différence de pH (Maycox et al., 1988; Naito and Ueda, 1985).

Une autre caractéristique importante concernant le transport de glutamate par les VGLUTs est la dépendance biphasique au chlore extra-vésiculaire. Cette propriété a été mise en évidence à l'aide de préparations de VS ou de membranes contenant des VGLUTs hétérologues (Bellocchio et al., 2000; Maycox et al., 1988; Naito and Ueda, 1985; Bai, 2001). En effet, l'activité des VGLUTs est modulée par la concentration en ions chlore à l'extérieur des VS. Il semblerait que le chlore permette une activation allostérique des VGLUTs lorsqu'il est présent à faible concentration (entre 1 et 4 mM). En revanche, à forte concentration (au-dessus de 10 mM), le chlore inhibe les VGLUTs tout comme lorsqu'il est totalement absent (Miyaji et al., 2011).

Lors de leur découverte, les VGLUTs ont été tout d'abord définis comme des transporteurs de phosphate inorganique dépendant du sodium. Ainsi, d'après certains auteurs, il existerait un double transport faisant intervenir des acteurs différents :

- Le transport du glutamate dépendant du gradient électrique et de la concentration extra-vésiculaire de chlore
- Le transport de phosphate inorganique dépendant des ions sodium.

D'autre part, bien qu'ayant un rôle essentiel dans la transmission glutamatergique, très peu d'agents pharmacologiques ciblent efficacement les VGLUTs et aucun de ceux-ci n'est spécifique d'un sous-type de VGLUT. Cependant, le développement de composés pharmacologiques spécifiques des VGLUTs permettrait de mieux comprendre leurs implications fonctionnelles normales et pathologiques. Parmi ces composés agissant sur l'activité des VGLUTs, on trouve :

➤ Les agents inhibant les VGLUTs :

- Des inhibiteurs compétitifs des VGLUTs qui se lieraient directement au site de transport:

Il existe plusieurs analogues d'acides aminés. Les analogues les plus efficaces sont le (2S,4R)-4-méthylglutamate et le trans-ACPD qui rentrent directement en compétition avec le glutamate, laissant supposer que ces molécules reconnaissent le site de liaison du glutamate sur les VGLUTs (Winter and Ueda, 1993).

Les meilleurs inhibiteurs compétitifs connus des VGLUTs sont des colorants azoïques : le bleu Trypan et le bleu Evans (Fonnum et al., 1998; Roseth et al., 1995). Le *Chicago Blue Sky* agit de la même façon que le bleu Evans, mais il est moins efficace (Roseth et al., 1995).

Le *brillant yellow* bloque le transport vésiculaire de glutamate. Il s'agit d'un inhibiteur compétitif puissant spécifique des VGLUTs (Tamura et al., 2014).

- Il existe également un inhibiteur indirect naturel, le facteur protéique IPF qui peut inhiber la recapture du glutamate et du GABA (Tamura et al., 2001).

➤ Les composés agissant sur le gradient de protons :

Au sein des inhibiteurs non compétitifs, on trouve le rose bengale. Ce composé va se lier à des sites qui ne sont pas les sites actifs sur les VGLUTs pour inhiber leur activité de façon dose dépendante (Bole and Ueda, 2005).

Il existe des inhibiteurs des ATPases vacuolaires tel que le N-éthylmaléimide (NEM), ou la bafilomycine (Bowman et al., 1988).

Des ionophores à protons peuvent également moduler le gradient du proton, comme par exemple le Carbonyl Cyanide M-Chloro-Phényldrazone (CCCP).

Enfin, d'autres composés jouent sur l'entrée de chlore dans les VS tel que le 4,4'-dithiocyanatostilbène-2,2'-disulfonique (DIDS) qui réduit l'activité des VGLUTs (Hartinger and Jahn, 1993).

II.3.e) Distribution anatomique de VGLUT1 et VGLUT2

Les transporteurs vésiculaires du glutamate VGLUT1 et VGLUT2 définissent les neurones glutamatergiques. Ils sont exprimés sur les VS localisées dans les terminaisons synaptiques (Bellocchio et al., 1998; Herzog et al., 2001; Kaneko et al., 2002). Ces deux isoformes ont une distribution quasi complémentaire dans le SNC chez le rongeur. Cependant,

les neurones exprimant VGLUT1 ont leurs soma préférentiellement localisés dans les structures corticales alors que VGLUT2 est essentiellement présent dans les régions sous-corticales.

Dans le SNC, l'ARNm codant pour VGLUT1 est principalement transcrit dans le bulbe olfactif, toutes les couches corticales, l'hippocampe, le subiculum, les couches granulaires du cervelet et la matière grise périaqueducale. Le transcrit VGLUT1 est le seul des deux isoformes majeurs à être transcrit dans le cortex cérébelleux et les cellulaires granulaires du gyrus denté. On le retrouve en quantité plus faible dans certains noyaux du thalamus et le septum latéral. L'ARNm de VGLUT2, quant à lui, est fortement présent dans les régions sous-corticales allant du thalamus à la moelle épinière. On le retrouve également dans les couches corticales IV du cortex pariétal et frontal, les couches IV et VI du cortex temporal, et dans les noyaux ventromédian, arqué et supraoptique de l'hypothalamus. Dans l'amygdale, les noyaux médial et central expriment l'ARNm de VGLUT2. En revanche, dans les noyaux latéral et basolatéral, on ne trouve que l'ARNm de VGLUT1 (Aihara et al., 2000; Fremeau et al., 2001; Herzog et al., 2001; Liguz-Leczna and Skangiel-Kramska, 2007; Ni et al., 1994) (**Figure 13**).

Pour ce qui est de la distribution protéique, VGLUT1 est exprimé dans les bulbes et tubercules olfactifs, le cortex cérébral, l'hippocampe (hormis la couche des cellules pyramidales et granulaires), le caudé-putamen, le noyau accumbens et le septum (Bellocchio et al., 1998; Fremeau et al., 2001; Kaneko et al., 2002). On le retrouve également au niveau du thalamus, des fibres parallèles du cervelet, du noyau pédonculo-pontin et de l'hypothalamus. Il est aussi présent dans le tronc cérébral inférieur et la moelle épinière dorsale et ventrale (Varoqui et al., 2002). La protéine VGLUT2 est exprimée de façon diffuse dans toutes les couches corticales mais on en trouve un niveau très élevé dans les couches I et IV du cortex. Les terminaisons VGLUT2-positives sont aussi observées dans le caudé-putamen, le globus pallidus, le thalamus, les colliculi inférieurs et supérieurs, la substance noire, le tronc cérébral, le bulbe rachidien, la moelle épinière et les fibres grimpantes des cellules de Purkinje. VGLUT2 est également retrouvé dans l'amygdale (Fremeau et al., 2001; Herzog et al., 2001; Kaneko et al., 2002; Landry et al., 2004; Varoqui et al., 2002) (**Figure 14**).

Un phénomène particulier se produit au cours du développement post-natal du cervelet, du cortex et de l'hippocampe chez la souris. En effet, la proportion de VGLUT1 et VGLUT2 s'inverse progressivement, c'est ce que l'on appelle le « *VGLUT2-VGLUT1 switch* » (Boulland et al., 2004; Miyazaki et al., 2003).

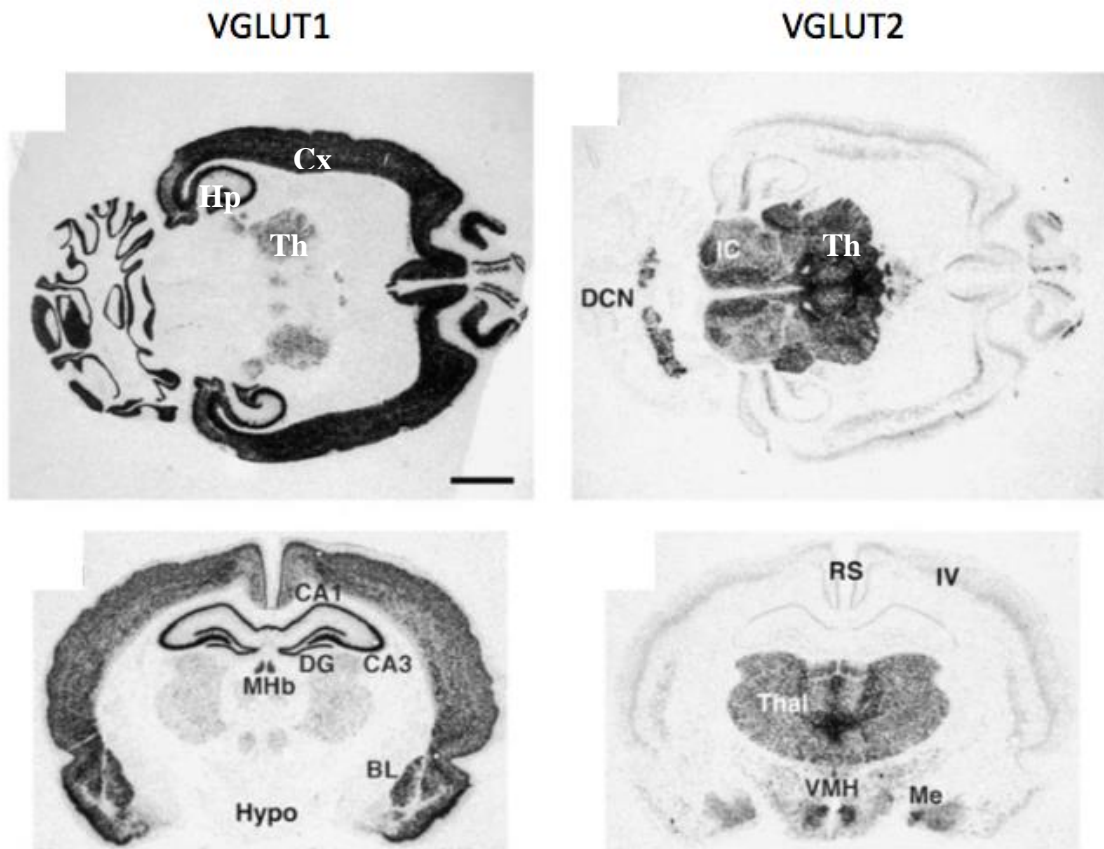


Figure 13 : Distribution des ARNm de VGLUT1 et VGLUT2.

L'ARNm de VGLUT1 est préférentiellement présent dans les régions corticales (cortex (Cx), hippocampe (Hp), cervelet (Cv)) alors que l'ARNm codant pour VGLUT2 est exprimé dans les régions sous-corticales allant du thalamus (Th) au tronc cérébral (DCN = noyau cérébelleux profond). L'ARNm de VGLUT1 est transcrit dans le noyau basolatérale de l'amygdale. (D'après Fremeau et al., 2001)

Selon l'étude de Fremeau et de ses collaborateurs en 2001, VGLUT1 et VGLUT2 ne sont pas exprimés dans des neurones non glutamatergiques (Fremeau et al., 2001). Toutefois, d'autres groupes ont depuis mis en évidence la présence de ces deux isoformes des VGLUTs dans des neurones connus comme étant non glutamatergiques (pour revue El Mestikawy et al., 2011). En effet, VGLUT1 et VIAAT ont été retrouvés exprimés dans un sous ensemble de terminaisons axonales dans le néocortex (Fattorini et al., 2009). Les ARNm de VGLUT1 et VGLUT2 sont co-exprimés dans les motoneurones cholinergiques de la corne dorsale de la moelle épinière (Herzog et al., 2004). L'ARNm de VGLUT2 est également présent dans les neurones noradrénergiques des groupes A1 et A2 et des neurones adrénérgiques des groupes C1, C2 et C3 de la medulla du rat (Stornetta et al., 2002a; Stornetta, 2002b). Enfin, on le retrouve aussi aux stades précoces du développement dans les neurones dopaminergiques mésencéphaliques. Cependant, son expression diminue chez l'adulte (Descarries et al., 2008;

Mendez et al., 2008). Enfin, on trouve VGLUT1 dans les neurones cholinergiques de l'habénula projetant sur le noyau interpédonculaire (Ren et al., 2006).

Différentes études ont mis en évidence la présence de VGLUTs dans les astrocytes et ainsi expliquées l'exocytose de glutamate dans ces cellules (Bezzi et al., 2004; Fremeau et al., 2002; Montana et al., 2004; Ni and Parpura, 2009; Ormel et al., 2012). Toutefois, des études plus récentes ont rapporté que ces transporteurs vésiculaires du glutamate n'étaient pas exprimés dans les astrocytes (Cahoy et al., 2008; Juge et al., 2010; Li et al., 2013a). L'existence des VGLUTs dans les astrocytes reste encore à l'heure actuelle controversée.

Dans le système visuel, VGLUT1 et VGLUT2 sont présents dans différents types cellulaires de la rétine de façon complémentaire. En effet, VGLUT1 est exprimé par les photorécepteurs et les bâtonnets, alors que VGLUT2 est exprimé dans les corps cellulaires des cellules ganglionnaires et des cellules horizontales et dans certains cônes de la rétine de souris (Gong et al., 2006; Johnson et al., 2004; Mimura et al., 2002; Stella et al., 2008; Wässle et al., 2006). Les souris dépourvues totalement de VGLUT1 (souris VGLUT1^{-/-}) présentent une cécité progressive après la naissance (Fremeau et al., 2004). Cela permet de souligner le rôle essentiel de VGLUT1 dans la perception visuelle. Toutefois, certaines fonctions visuelles sont conservées comme le réflexe de contraction des pupilles en réaction à la lumière qui est contrôlé par VGLUT2. VGLUT1 et VGLUT2 jouent ainsi des rôles complémentaires dans la transmission rétinienne (Fremeau et al., 2001; Gong et al., 2006; Johnson et al., 2007).

Dans le système auditif, l'expression de VGLUT1 et VGLUT2 est également complémentaire. On retrouve ces VGLUTs dans le noyau cochléaire (Zeng et al., 2009; Zhou et al., 2007). Les deux VGLUTs sont co-exprimés dans les cellules granulaires du noyau cochléaire ventral, les cellules fusiformes, et la couche profonde du noyau cochléaire dorsal (Fyk-Kolodziej et al., 2011). Il semblerait qu'une colocalisation dans l'olive supérieure soit possible (Billups, 2005; Blaesse et al., 2005).

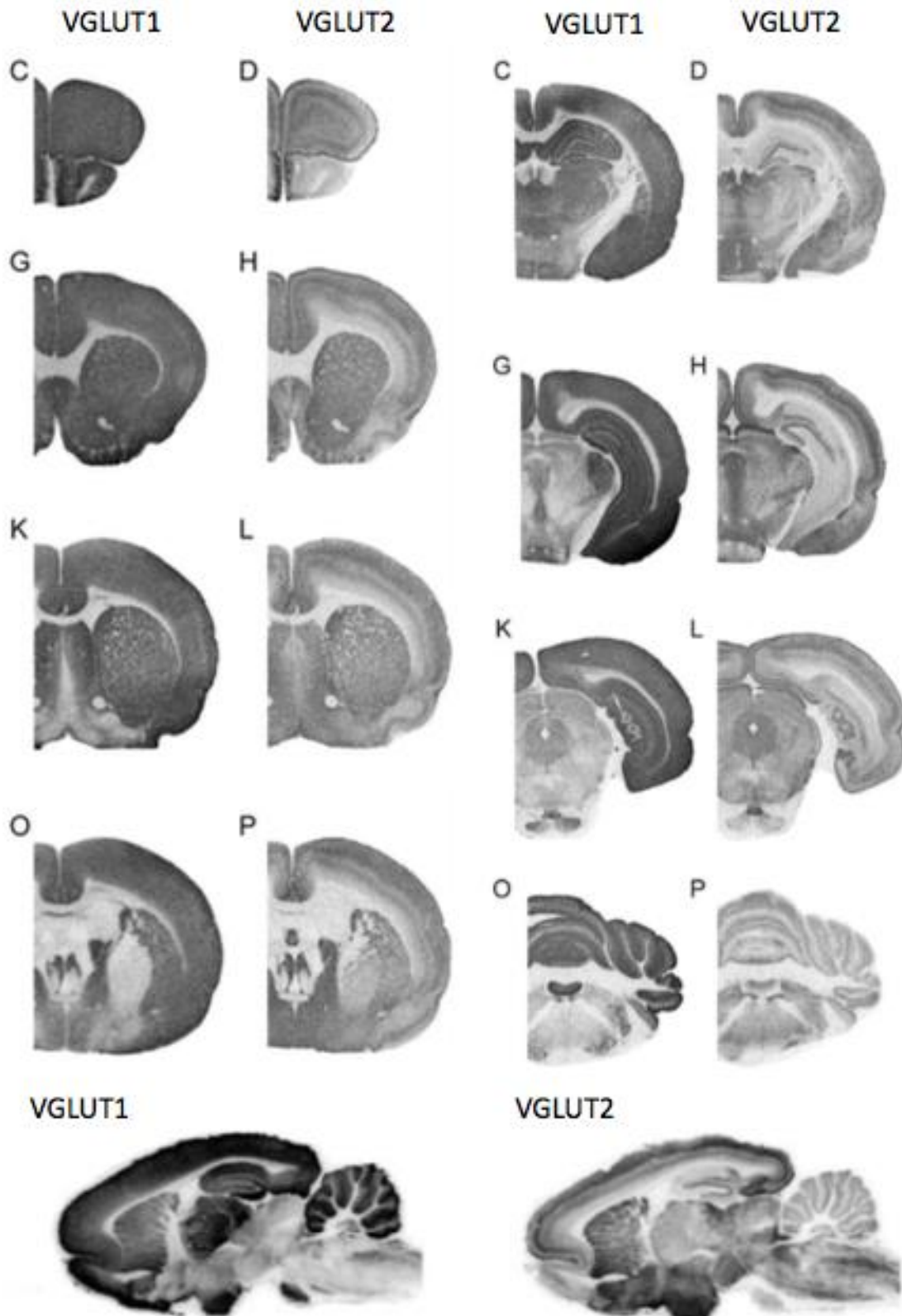


Figure 14: Distribution protéique de VGLUT1 et VGLUT2.

VGLUT1 et VGLUT2 sont détectés par immunoradiographie. L'expression de VGLUT1 et VGLUT2 est diffuse dans l'ensemble du SNC avec des intensités différentes. Dans l'amygdale, VGLUT1 et VGLUT2 sont observés. (D'après Herzog et al., 2001, 2004)

On retrouve VGLUT1 et VGLUT2 dans de nombreux organes périphériques. En effet, ils sont présents dans les cellules alpha des îlots de Langerhans sur les granules sécrétant le glucagon et sur les cellules F (Bai et al., 2003; Hayashi et al., 2003). VGLUT2 est également exprimé dans la poche gastrique, et au niveau des muqueuses et du pylore dans l'estomac (Hayashi et al., 2003). VGLUT1 quant à lui a été identifié dans des vésicules sécrétoires de transcytose présentes dans les ostéoclastes (Morimoto et al., 2006). Une étude a montré que les souris VGLUT1^{-/-} présentaient une ostéoporose (Hinoi et al., 2002; Morimoto et al., 2006). D'autre part, l'expression de VGLUT1-2 a été observée dans les spermatides (intermédiaire de la spermatogénèse) présageant l'existence d'un système glutamergique et par extension la présence de VGLUTs (Hayashi et al., 2003; Redecker et al., 2003).

Au cours du développement, des compensations développementales existent entre VGLUT1 et VGLUT2 appelé le « *VGLUT2-VGLUT1 switch* ». Une équipe a montré que les souris VGLUT1^{-/-} ne survivent que trois semaines post-natal car l'absence de VGLUT1 est compensée en partie par la présence ubiquitaire plus précoce de VGLUT2 (Wojcik et al., 2004). Toutefois, une autre étude a démontré qu'avec des conditions d'élevages adéquates, les souris VGLUT1^{-/-} peuvent survivre au-delà de trois semaines malgré la présence de nombreux troubles physiologiques : un retard global de croissance, un aspect émacié, une cécité et des troubles neurologiques moteurs (Freneau et al., 2004). Ainsi, VGLUT1 ne semble pas indispensable au maintien des fonctions vitales de l'organisme. En revanche, l'absence de VGLUT2 entraîne la mort des souris VGLUT2^{-/-} dès la naissance (Wallén-Mackenzie et al., 2006). En effet, VGLUT2 intervient dans le contrôle de la respiration et du système nerveux autonome, il est donc un acteur majeur de la transmission glutamatergique dans les centres nerveux de régulation autonome de l'organisme (Moechars et al., 2006; Wallén-Mackenzie et al., 2006).

Points Importants :

La Synapse Glutamatergique

- Le Glutamate est :
 - un acteur clé du métabolisme
 - le neurotransmetteur exciteur principal du SNC chez les mammifères

- La synapse glutamatergique est composée :
 - d'un bouton pré-synaptique : Internalisation du Glu dans les VS par les transporteurs vésiculaires du glutamate, les VGLUTs
 - d'une fente synaptique : Libération du Glu
 - d'un élément post-synaptique : Interactions du Glu avec ses récepteurs ionotropiques (AMPA, NMDA et Kainate) et métabotropiques (mGluRs) présents à la surface membranaire.

- La recapture du Glu :
 - se fait par diffusion simple
 - se fait essentiellement par les transporteurs des Acides Aminés Excitateurs, les EAATs des astrocytes environnants
 - permet le « recyclage » du Glu par le cycle glutamine-glutamate.

- Les VGLUTs :
 - sont au nombre de trois : VGLUT1,2 et 3
 - partagent des propriétés structurales, biochimiques, énergétiques et pharmacologiques communes
 - VGLUT1 est principalement exprimé par les neurones corticaux, alors que VGLUT2 est essentiellement sous-cortical
 - VGLUT1 et VGLUT2 définissent les neurones glutamatergiques
 - VGLUT3 est un transporteur vésiculaire du glutamate atypique.

III/ LE TRANSPORTEUR VÉSICULAIRE DU GLUTAMATE 3 : VGLUT3

III.1/ DISTRIBUTION DE VGLUT3

Le troisième transporteur vésiculaire du glutamate identifié est VGLUT3. Il est très proche structurellement des deux autres isoformes VGLUT1 et VGLUT2 (plus de 70% d'homologie) et partage avec eux les mêmes caractéristiques fonctionnelles, biochimiques, énergétiques et pharmacologiques (Fremeau et al., 2002; Gras et al., 2002; Reimer et al., 2001; Takamori et al., 2002).

Contrairement à VGLUT1 et VGLUT2, VGLUT3 est présent dans très peu de neurones. Alors que VGLUT1-2 sont essentiellement exprimés dans les terminaisons présynaptiques, VGLUT3 est observé dans les corps cellulaires et les dendrites proximales de certains neurones mais aussi dans les terminaisons présynaptiques (Gras et al., 2002; Herzog et al., 2004). Cette localisation suggère que VGLUT3 pourrait jouer un rôle autre que celui de transporteur vésiculaire du glutamate. En effet, la mobilité de VGLUT3 vers divers compartiments cellulaires pourrait impliquer le glutamate dans de nouvelles voies de signalisation encore non identifiées (Ramet et al., 2017).

De plus, VGLUT3 a été identifié au niveau des vésicules de synapses excitatrice et inhibitrice (Fasano et al., 2017; Gras et al., 2008). Contrairement à VGLUT1 et VGLUT2 qui s'expriment quelque fois dans les mêmes terminaisons axonales, VGLUT3 est rarement associé à ces deux autres isoformes (Boulland et al., 2004).

L'ARNm de VGLUT3 est présent dans les tubercules olfactifs, le striatum et notamment dans le noyau accumbens, le pallidum ventral et dans les noyaux du raphé (Boulland et al., 2004; Gras et al., 2002; Herzog et al., 2004; Nickerson Poulin et al., 2006). On retrouve également VGLUT3 dans le cortex cérébral et l'hippocampe mais en faible quantité (**Figure 15**). Aucune trace de VGLUT3 n'est observée dans le thalamus, le septum et la substance noire. La présence de VGLUT3 n'avait pas été détectée dans l'amygdale (Herzog et al., 2004; Schäfer et al., 2002).

Pour ce qui est de la distribution protéique (**Figure 15**), VGLUT3 est exprimé dans le bulbe et les tubercules olfactifs, les couches corticales II, V et VI, le septum latéral, le striatum

dorsal et ventral, les couches pyramidales et granulaires de l'hippocampe. La protéine VGLUT3 est également observée dans l'aire tegmentale ventrale, la substance noire compacte, le noyau interpedonculaire et les noyaux du raphé dorsal et médian. Dans l'amygdale, il apparaît dans les noyaux basolatéral et basomédian (Herzog et al., 2004; Schäfer et al., 2002; Tatti et al., 2014).

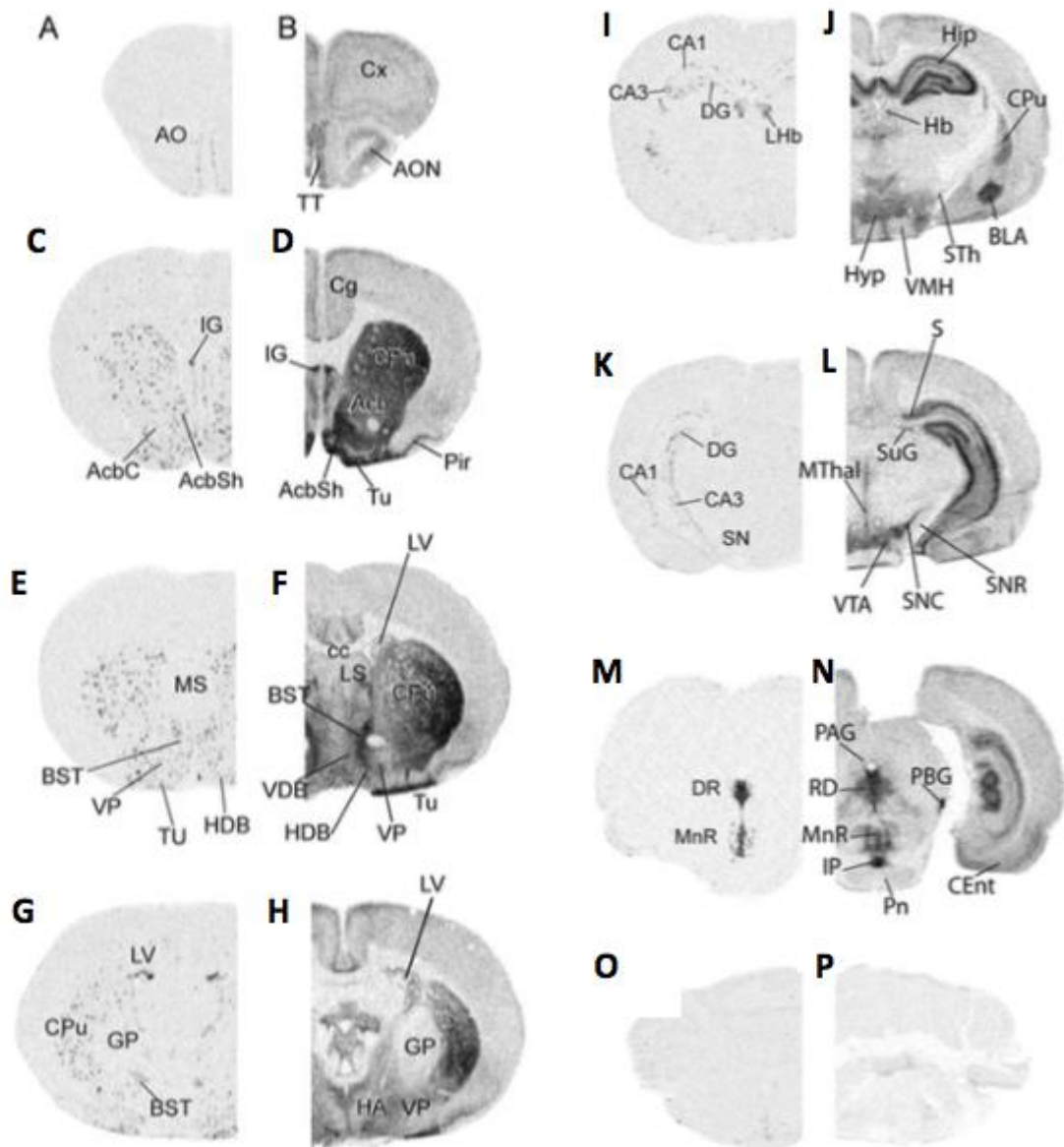


Figure 15 : Distribution de l'ARNm et de la protéine VGLUT3 dans le cerveau de rat.

Visualisation de l'expression du transcrite de VGLUT3 par hybridation *in situ* (A, C, E, G, I, K, M, O) et de la protéine VGLUT3 par immunohistochimie (B, D, F, H, J, L, N, P). (D'après Herzog et al., 2004)

D'après certaines études, VGLUT3 ne serait pas seulement présent dans les neurones du SNC. En effet, sa présence aurait été mise en évidence dans une sous-population d'astrocytes du cervelet et du striatum, et dans les oligodendrocytes (Boulland et al., 2004; Fremeau et al., 2002). Toutefois, ces résultats ne semblent pas admis par l'ensemble de la communauté scientifique. Une majorité d'équipes n'a pas reproduit ces résultats qui seraient dûs à un marquage non spécifique (Gras et al., 2008; Herzog et al., 2004; Schäfer et al., 2002).

Dans le SNC, VGLUT3 serait donc présent dans des cellules neuronales. Toutefois, de façon surprenante, contrairement à VGLUT1 et VGLUT2 qui sont des marqueurs des neurones glutamatergiques, VGLUT3 est présent dans des neurones utilisant d'autres NT que le glutamate. Il est largement exprimé dans les interneurones cholinergiques du striatum, une sous-population d'interneurones GABAergiques du cortex, de l'hippocampe, et de l'amygdale et les neurones sérotoninergiques du raphé (El Mestikawy et al., 2011; Herzog et al., 2004; Omiya et al., 2015; Schäfer et al., 2002) (**Tableau 2**).

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

Tableau 2: Distribution de l'ARNm de VGLUT3 et de sa protéine dans les neurones non-glutamatergiques du SNC.

(Adapté de El Mestikawy et al., 2011)

Ainsi, par sa distribution atypique, VGLUT3 se distingue des deux autres isoformes de transporteurs vésiculaires du glutamate. Cela laisse présager fonctionnellement un rôle particulier de VGLUT3 dans ces sous-populations neuronales impliquant deux NT différents.

III.2/ VGLUT3 DANS LES NEURONES NON-GLUTAMATERGIQUES

III.2.a) VGLUT3 dans les neurones sérotoninergiques

La sérotonine (5-HT) est une amine biogène synthétisée à partir d'un acide aminé, le tryptophane. Elle est présente dans des groupes de neurones dispersés au niveau du tronc cérébral. La 5-HT est un acteur important dans la régulation de nombreuses fonctions cérébrales.

Le système sérotoninergique est composé de neuf groupes de neurones localisés dans différents noyaux du raphé et disposés le long de la ligne médiane du tronc cérébral. Les quatre groupes les plus caudaux projettent vers la moelle épinière et le système nerveux périphérique. Les groupes les plus rostraux, à savoir le raphé dorsal (RD) et le raphé médian (RM) projettent de façon diffuse dans l'ensemble du cerveau jusqu'au bulbe olfactif (Hensler, 2006; Michelsen et al., 2007) (**Figure 16**).

D'un point de vue fonctionnel, le système sérotoninergique projette entre autres sur le système limbique ce qui l'implique dans le contrôle de l'humeur chez l'Homme. Il intervient notamment dans les troubles de type anxieux et dépressif. L'importance de ce système dans ces troubles de l'humeur se manifeste par l'utilisation en thérapeutique d'inhibiteurs spécifiques de la recapture de la 5-HT (SSRI : *Selective Serotonin Reuptake Inhibitor*) qui ciblent son transporteur plasmique (SERT).

Au sein des neurones du raphé, il existe trois types de populations différentes : les neurones purement sérotoninergiques, les neurones exprimant seulement VGLUT3 et les neurones possédant la 5-HT et VGLUT3 (Gras et al., 2002; Nakamura et al., 2004) (**Figure 17**).

L'ARNm de VGLUT3 est exprimé dans environ 30% des neurones sérotoninergiques du raphé (Gras et al., 2002; Hioki et al., 2010; Schäfer et al., 2002). Dans ces neurones 5-HT, VGLUT3 est localisé au niveau des corps cellulaires, des dendrites et des terminaisons

(Amilhon et al., 2010; Commons, 2009; Gras et al., 2002; Jackson et al., 2009; Mintz and Scott, 2006; Soiza-Reilly and Commons, 2011). On retrouve les terminaisons sérotoninergiques de ces neurones exprimant VGLUT3 issues du raphé dans les bulbes olfactifs, le cortex cérébral, l'hippocampe, l'amygdale, l'aire tegmentale ventrale, le plexus supra-épendymaire et la moelle épinière (Amilhon et al., 2010; Oliveira et al., 2003; Schäfer et al., 2002; Shutoh et al., 2008). Il apparaît que ces terminaisons expriment rarement le transporteur plasmique de la 5-HT, SERT (Amilhon et al., 2010; Hioki et al., 2004). De plus, il semble que VGLUT3 ne soit pas présent dans toutes les terminaisons 5-HT de ces neurones mixtes (Amilhon et al., 2010; Fremeau et al., 2002; Gagnon and Parent, 2014; Schäfer et al., 2002). Cela signifierait l'existence de mécanismes complexes d'adressage des différentes VS vers les terminaisons axonales des neurones sérotoninergiques (Gagnon and Parent, 2014).

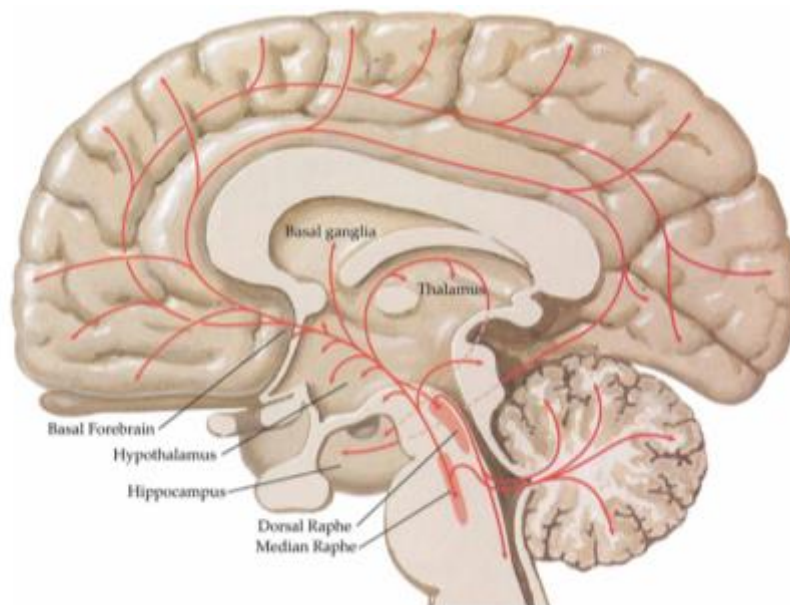


Figure 16: Représentation schématique du système sérotoninergique central chez l'Homme.

Les noyaux rostraux, à savoir le raphé dorsal et le raphé médian projettent de façon diffuse dans l'ensemble du cerveau, du bulbe olfactif au cervelet. Les groupes de neurones caudaux du raphé projettent vers la moelle épinière et le système nerveux périphérique mais ne sont pas représentés ici. (D'après Scarr et al., 2013)

Des études menées au laboratoire par Bénédicte Amilhon ont permis de définir de nouveaux rôles pour VGLUT3 à l'aide des souris n'exprimant plus VGLUT3 (souris VGLUT3^{-/-}). En effet, l'absence de VGLUT3 chez ces souris entraîne l'apparition d'un phénotype de type anxieux. Toutefois, d'autres comportements régulés par la 5-HT telles que l'agressivité et la résignation ne semblent pas être affectées (Amilhon et al., 2010). Ces résultats suggèrent que

VGLUT3 délimite un sous-groupe de neurones 5-HT impliqué dans la régulation de certains troubles de l'humeur.

D'autre part, ces études ont montré que la présence de VGLUT3 facilitait : 1/ la capture de 5-HT par le transporteur vésiculaire des monoamines de type 2 (VMAT2), et 2/ la libération de 5-HT dans l'hippocampe et le cortex cérébral. Ainsi, VGLUT3 joue un rôle dans la co-transmission sérotonine/glutamate par le processus de synergie vésiculaire découvert pour la première fois avec l'acétylcholine et dont nous parlerons en partie III.3 (Amilhon et al., 2010; Gras et al., 2008).

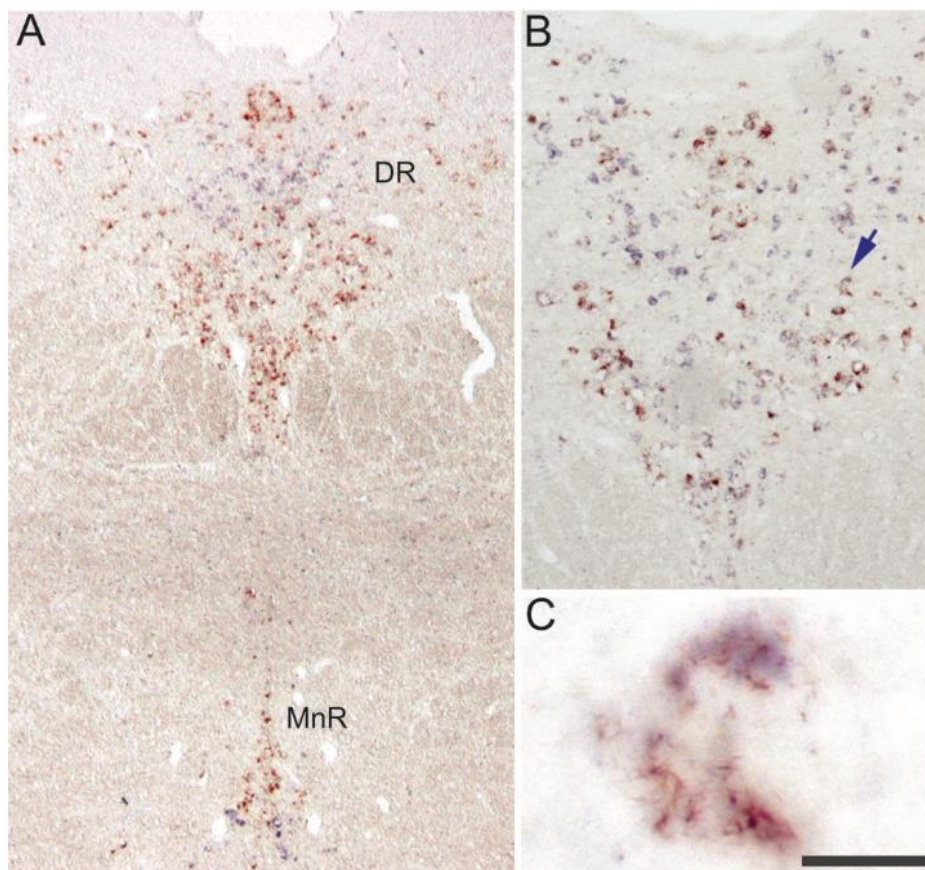


Figure 17 : Co-localisation de VGLUT3 et SERT dans le raphé dorsal et le raphé médian par hybridation *in situ*.

L'ARNm codant pour VGLUT3 est marqué en bleu et celui de SERT en rouge. A) Distribution des transcrits de VGLUT3 et SERT dans les noyaux du raphé : noyau dorsal (DR) et médian (MnR). B) Agrandissement du raphé dorsal. C) Visualisation de la co-localisation VGLUT3-SERT dans des neurones. Echelles : A, 300 μ m. B, 100 μ m. C, 10 μ m. (D'après Gras et al., 2002)

III.2.b) VGLUT3 dans les neurones GABAergiques

Le GABA ou acide γ -aminobutyrique est le principal NT inhibiteur du SNC. Synthétisé à partir du glutamate, ce NT est dans un premier temps activateur au cours du développement embryonnaire, avant de devenir inhibiteur à l'âge adulte (Ben-Ari, 2002).

Le système GABAergique est très hétérogène. Les neurones GABAergiques présentent de fortes diversités morphologiques et électrophysiologiques (pour revue, Petilla Interneuron Nomenclature Group et al., 2008). Au sein de cette famille vaste et complexe, il existe une population d'interneurones GABAergiques dit « en panier » (*basket cells*) localisée dans le cortex et l'hippocampe. Ces interneurones portent leur nom du fait que leurs terminaisons entourent les dendrites proximales et les corps cellulaires des neurones glutamatergiques pyramidaux. Deux groupes ont été identifiés parmi ces interneurones GABAergiques : l'un exprimant la parvalbumine (PV, protéine de liaison au calcium), l'autre exprimant la cholécystokinine (CCK, neuropeptide) (Capogna, 2014; Somogyi et al., 2004; Spampinato et al., 2011).

Il apparaît que VGLUT3 est exprimé dans certains neurones appartenant au système GABAergique. En effet, au cours du développement, VGLUT3 est présent de façon transitoire dans les cellules de Purkinje (neurones GABAergiques du cervelet) (Gras et al., 2005). Il est le seul des trois isoformes de VGLUTs à avoir cette propriété. A l'âge adulte, l'ARNm de VGLUT3 est observé dans des interneurones GABAergiques « en panier » du cortex cérébral et de l'hippocampe (Fremeau et al., 2002; Gras et al., 2002; Herzog et al., 2004; Schäfer et al., 2002; Somogyi et al., 2004). VGLUT3 a également été identifié dans des interneurones GABAergiques de la strie terminale et du noyau médian du corps trapézoïde (Gillespie et al., 2005; Kudo et al., 2012). Au cours de ma thèse, la présence de VGLUT3 a été mise en évidence dans les interneurones GABAergiques de l'amygdale (Omiya et al., 2015).

Au sein de ces neurones, VGLUT3 est localisé au niveau du soma, dans la partie proximale des dendrites et dans les terminaisons axonales (Fremeau et al., 2002; Herzog et al., 2004; Somogyi et al., 2004) (**Figure 18 A-B**).

Plus spécifiquement, VGLUT3 est présent dans la sous-population d'interneurones GABAergiques « en panier » exprimant la CCK dans le cortex cérébral et l'hippocampe

(Fasano et al., 2017; Hioki et al., 2010; Somogyi et al., 2004) (**Figure 18**). Aujourd'hui, la présence de VGLUT3 a également été mise en évidence dans les interneurons GABAergiques CCK-positifs de l'amygdale (Omiya et al., 2015). En effet, VGLUT3 a été retrouvé dans des interneurons GABAergiques exprimant la CCK mais également le récepteur aux cannabinoïdes CB1 dans le noyau basolatérale de l'amygdale. Ces interneurons forment des synapses particulières avec les cellules pyramidales car elles s'invaginent au sein de ces cellules glutamatergiques exprimant le récepteur métabotrope du glutamate mGluR5 (Omiya et al., 2015).

Ainsi, du GABA, de la CCK et du glutamate sont libérés par ces interneurons dans la fente synaptique. Suite à cette libération, le glutamate agirait sur les mGluR5 largement distribués sur la surface membranaire extrasynaptique et somato-dendritique des cellules pyramidales par un mode de transmission volumique. Il pourrait alors moduler les fonctions neuronales et synaptiques (Omiya et al., 2015). Toutefois, son rôle au sein de ces synapses invaginées reste à être établi.

Au niveau de certains neurones GABAergiques VGLUT3-positifs, la libération du glutamate entraîne une réponse glutamatergique du neurone post-synaptique suite à l'activation de récepteurs NMDA (Case and Gillespie, 2011; Noh et al., 2010; Stensrud et al., 2015). D'autre part, il s'avère que d'autres récepteurs du glutamate jouent un rôle dans la transmission de l'information au niveau des synapses GABAergiques. En effet, il a été montré que le récepteur métabotrope mGluR7 est présent au niveau de la terminaison pré-synaptique des interneurons GABAergiques « en panier » (Somogyi et al., 2003). Suite à son activation par le glutamate, ce dernier peut alors inhiber la libération synaptique de GABA et permettre ainsi un rétrocontrôle négatif sur la transmission neuronale (Summa et al., 2013). Cette action a été confirmée par une étude plus récente dans l'hippocampe montrant que la libération du glutamate dans la synapse, possible par la présence de VGLUT3, entraîne l'inhibition de celle du GABA via l'activation des récepteurs métabotropiques mGluRs du groupe III dans les interneurons GABAergiques VGLUT3-positifs (Fasano et al., 2017).

VGLUT3 et VIAAT sont localisés sur les mêmes VS dans le cortex cérébrale et l'hippocampe (Stensrud et al., 2013). Une autre étude de ce même auteur a montré que les terminaisons GABAergiques dépourvues de VGLUT3 possèderaient plus de GABA que celles exprimant VGLUT3 (Stensrud et al., 2015).

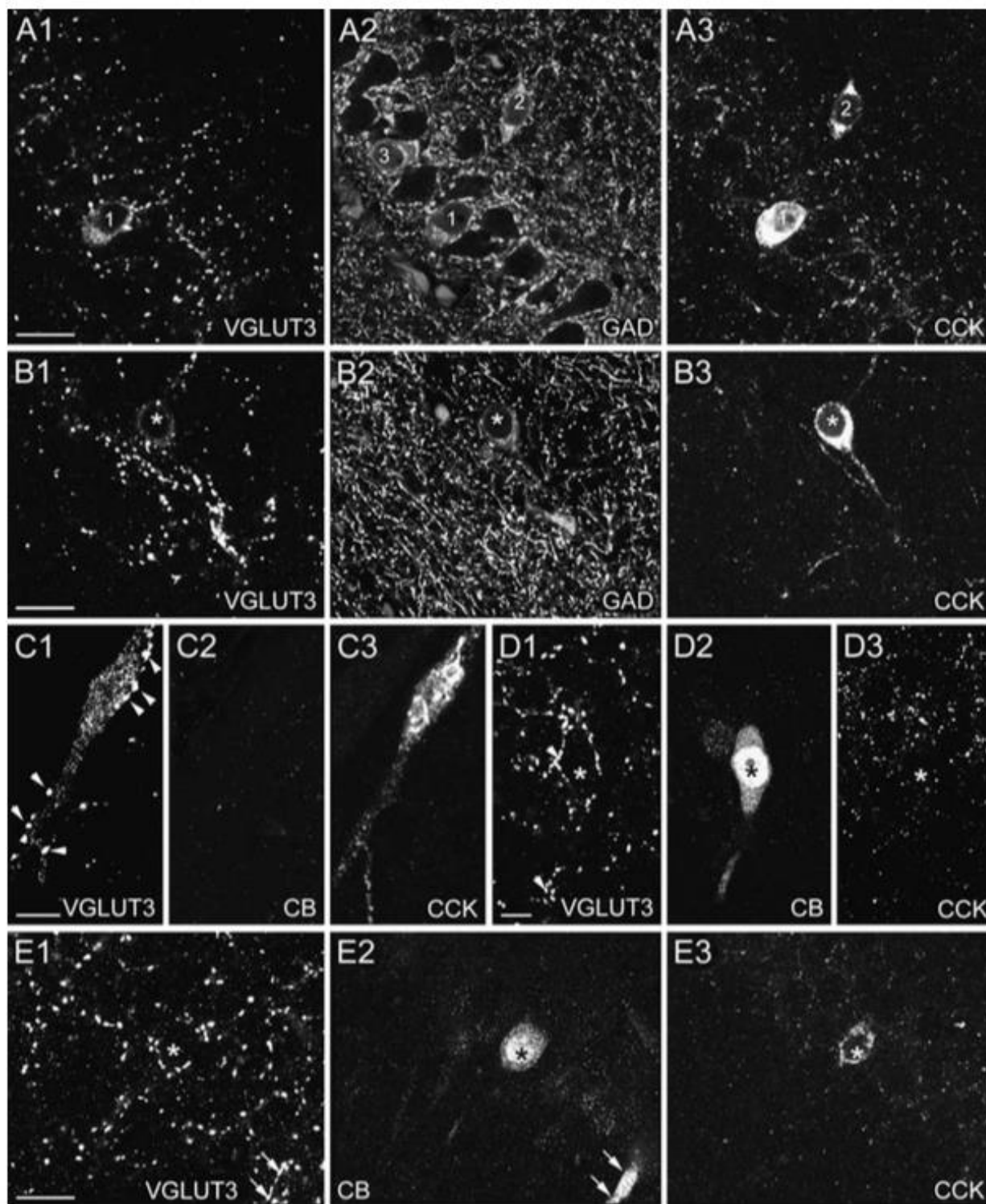


Figure 18 : Localisation de VGLUT3, CCK et GAD ou CB dans l'hippocampe par immunofluorescence.

A) Le soma (1) est marqué par VGLUT3, GAD et CCK ; le soma (2) est marqué seulement par GAD et CCK ; le soma (3) est marqué par GAD. VGLUT3 appartient donc à une sous-population d'interneurones GABAergiques CCK+. B) Le soma est marqué par VGLUT3, GAD, CCK. C) Un soma est marqué par VGLUT3 et CCK, mais pas par CB. D) Des terminaisons VGLUT3 innervent un soma CB+. E) Les terminaisons VGLUT3+ innervent un soma CB et CCK+. Echelles : A, B et E 20 μ m; C et D 10 μ m. (*D'après Somogyi et al., 2004*)

En effet, le glutamate étant le précurseur du GABA, son accumulation dans les VS le rendrait moins disponible pour la synthèse de GABA (Stensrud et al., 2015). Toutefois, ces interprétations sont issues de résultats obtenus uniquement par des techniques d'anatomie. Elles restent donc à être confirmées par d'autres approches fonctionnelles.

III.2.c) VGLUT3 dans les neurones cholinergiques

L'acétylcholine (ACh) est un ester produit à partir de l'acétyl-CoA et de la choline qui joue le rôle de NT dans le SNC.

Le système cholinergique est composé de neurones présents dans les noyaux du prosencéphale (ou cerveau antérieur) et du tronc cérébral. Au sein de cette population cholinergique, certains neurones sont caractérisés par la présence de VGLUT3. En effet, l'ARNm de VGLUT3 est observé dans le striatum dorsal et ventral, et le cerveau antérieur basal. Pour ce qui est de la distribution protéique, VGLUT3 est exprimé dans les corps cellulaires du striatum et du cerveau antérieur basal, et dans les terminaisons du striatum et de l'amygdale (Boulland et al., 2004; El Mestikawy et al., 2011a; Gras et al., 2002; Nickerson Poulin et al., 2006; Schäfer et al., 2002) (**Tableau 2**).

Le striatum est une des structures cérébrales les plus riche en VGLUT3 (**Figure 15**) et possède une organisation structurale et neuronale complexe (Gras et al., 2002; Herzog et al., 2004).

En effet, le striatum qui lui-même est un des noyaux appartenant aux ganglions de la base, est composé de plusieurs noyaux. Au sein de ces noyaux, on trouve un ensemble de neurones plutôt homogène que l'on peut classer en deux catégories selon la présence d'épines sur leurs dendrites (**Figure 19**).

La première population neuronale est composée de neurones possédant des épines sur leur dendrites appelés neurones épineux de taille moyenne (*Medium Spiny Neurons* ou MSNs). Il s'agit de neurones de projections GABAergiques qui représentent 95% des neurones striataux (Kemp and Powell, 1971; Parent et al., 1995). Ce sont les neurones efférents du striatum et ils reçoivent également la majorité des afférences de cette structure.

La deuxième catégorie de neurones est constituée d'interneurones GABAergiques et cholinergiques dépourvus d'épines qui forment un réseau neuronal plus hétérogène.

Au sein des interneurones GABAergiques, différentes sous-populations sont identifiées. En effet, il existe des interneurones exprimant la parvalbumine (PV), d'autres se caractérisent par la présence de somatostatine (SOM), et enfin ceux possédant la calbindine (Calb).

D'autre part, les interneurones cholinergiques qui constituent l'autre population neuronale sont appelés TANs (*Tonically Active neurons*) (Calabresi et al., 2000; Pisani et al., 1997). Bien que ne représentant qu'1 à 2 % de la population neuronale striatale totale, les TANs ont une place clé dans la transmission synaptique liée principalement à deux de leurs caractéristiques : 1/ ils sont la seule source d'acétylcholine du striatum, 2/ VGLUT3 y est retrouvé.

En effet, il a été montré que les TANs sont fortement impliqués dans la régulation de la transmission de l'information nerveuse et la plasticité striatale à long terme à travers leurs récepteurs ionotropiques (muscariniques et nicotiques) (Higley et al., 2009; Sullivan et al., 2008; Wang et al., 2006).

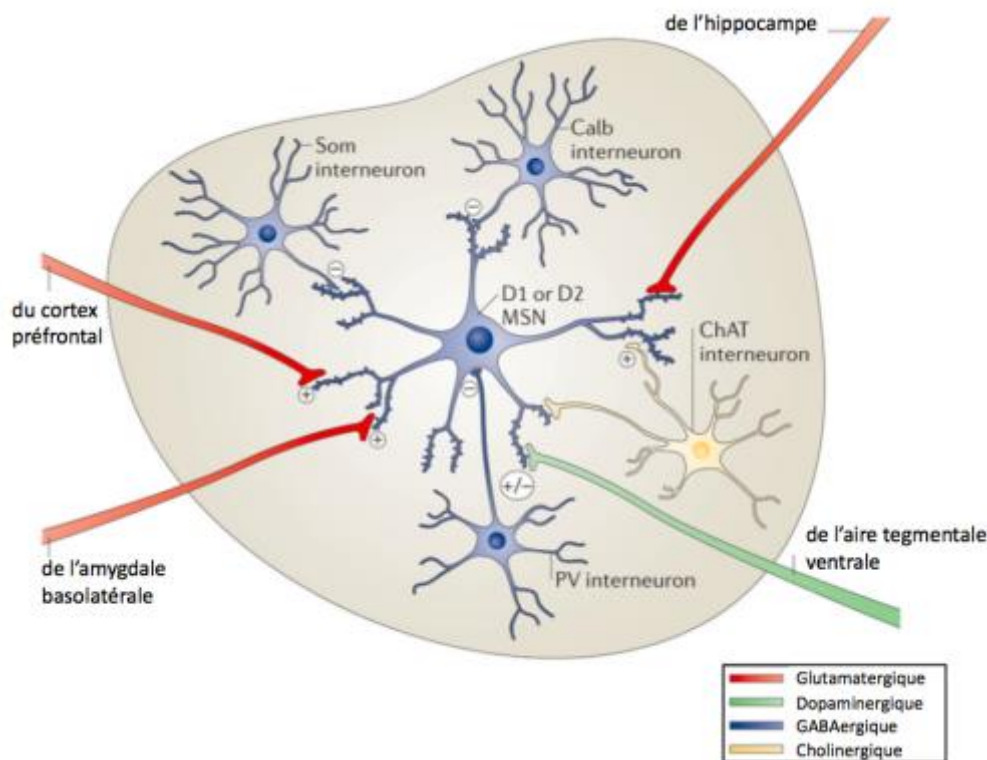


Figure 19: Les différentes populations neuronales du striatum.

Les neurones épineux (MSNs) reçoivent des afférences glutamatergiques du cortex préfrontal, de l'hippocampe et de l'amygdale basolatérale. Ils sont modulés par les interneurones GABAergiques exprimant la parvalbumine (PV), la somatostatine (Som) et la calbindine (Calb), et par les interneurones cholinergiques (ChAT interneurones). (Adapté de Russo et Nestler, 2013)

Par ailleurs, l'ARNm de VGLUT3 est présent dans les soma des TANs du striatum ventral et dorsal, et dans les soma de la partie striatale des tubercules olfactifs (Gras et al., 2002; Nickerson Poulin et al., 2006). D'un point de vue protéique, VGLUT3 est observé dans le corps cellulaire et les dendrites des TANs où il co-localise avec la choline acétyltransférase (ChAT), enzyme permettant la synthèse d'acétylcholine à partir de choline et d'acétyl-CoA. Au niveau des terminaisons, ce sont VGLUT3 et VACHT, le transporteur vésiculaire de l'acétylcholine, qui sont détectés dans les TANs. Ces neurones semblent donc capables de libérer à la fois du glutamate et de l'acétylcholine (**Figure 20**).

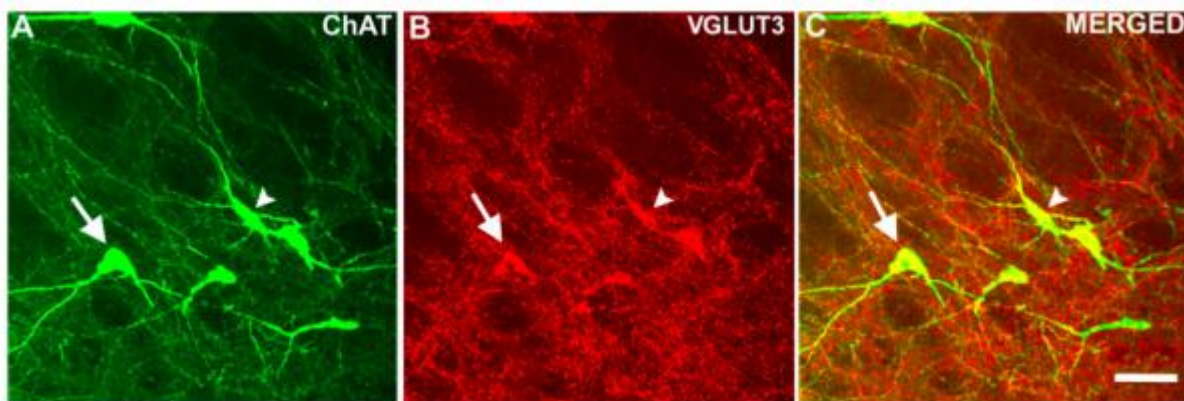


Figure 20: Expression de VGLUT3 dans les interneurons cholinergiques du striatum. Les neurones marqués avec la ChAT (A, en vert) expriment également VGLUT3 (B, en rouge). Echelle : 50 μ m. (D'après Nickerson Poulin et al., 2006)

De plus, l'équipe a montré que VGLUT3 et VACHT sont observés sur les mêmes VS dans les TANs (Gras et al., 2008). Cette co-localisation permet d'augmenter la quantité d'ACh stockée dans les VS et la quantité libérée d'ACh dans la fente synaptique par la présence de VGLUT3 (Gras et al., 2008). De plus, chez les souris présentant une inactivation constitutive de VGLUT3 (souris VGLUT3^{-/-}), un phénotype hypocholinergique a été observé dans le striatum (Gras et al., 2008). VGLUT3 semble donc potentialiser l'effet de VACHT. Ce phénomène a été appelé synergie vésiculaire (El Mestikawy et al., 2011; Gras et al., 2008).

Une autre structure cérébrale exprime à la fois l'acétylcholine et VGLUT3. Il s'agit du cerveau antérieur basal (*basal forebrain*, BF) qui possède une sous-population de neurones cholinergiques VGLUT3 positifs projetant essentiellement dans l'amygdale basolatérale (Nickerson Poulin et al., 2006).

Au sein de l'équipe, les travaux de thèse de Diana Sakae ont permis de mettre en évidence le rôle de VGLUT3 dans la sensibilité à la cocaïne. En effet, il a été montré que les souris VGLUT3^{-/-} présentent une hypersensibilité locomotrice due à la prise de cocaïne. Ce phénotype serait expliqué par l'utilisation du glutamate libéré dans la synapse pour réduire la quantité de dopamine libérée et ainsi inhiber le système de récompense, alors que l'ACh stimulerait le système de récompense (Sakae et al., 2015).

Il a également été montré que l'expression de VGLUT3 dans le noyau accumbens, une région du striatum antérieur, est régulée par les récompenses physiologiques communes (eau, nourriture) et la douleur. Ainsi, l'expression de VGLUT3 est augmentée suite à une administration chronique de sucrose, et diminuée lors d'une douleur chronique chez le rat (Tukey et al., 2013).

VGLUT3 semble ainsi avoir un rôle modulateur dans le traitement des récompenses et de la douleur au sein du striatum, outre son implication dans la régulation de la dépendance aux drogues (Sakae et al., 2015; Tukey et al., 2013).

Par ailleurs, l'étude menée par Christelle Gras dans notre équipe a mis en évidence la présence d'un phénotype hyperlocomoteur chez les souris VGLUT3^{-/-}. En effet, ces souris VGLUT3^{-/-} réalisent plus d'aller-retour que les souris contrôles au cours du début de la phase de nuit dans un test d'actimétrie. Les souris étant nocturnes, cette phase représente le commencement de leur état d'activité. L'hypothèse proposée est que cette hyperlocomotion serait consécutive à la perte de VGLUT3 dans les interneurons cholinergiques VGLUT3 positifs du striatum (Gras et al., 2008).

VGLUT3 semble donc exercer une influence non négligeable dans le réseau striatal, bien que son rôle reste encore partiellement incompris à l'heure actuelle.

III.3/ LA SYNERGIE VÉSICULAIRE

La présence de VGLUT3 dans certains neurones leur confère la capacité de libérer à la fois du glutamate, mais également un autre NT principal. Dans ce contexte, on peut se demander quel est le rôle joué par le glutamate dans les synapses associées, et par extension celui de VGLUT3.

En 2008, notre équipe a mis en évidence que VGLUT3 et VAcHT, le transporteur vésiculaire de l'acétylcholine étaient présents sur les mêmes VS dans le striatum. De plus, en présence de glutamate dans les vésicules possédant VGLUT3, l'accumulation d'ACh radiomarquée au tritium était augmentée de plus de 200% (Gras et al., 2008). Cet effet n'a pas été retrouvé chez les souris VGLUT3^{-/-} qui présentent un phénotype hypochoolinergique. En revanche, cette coopération entre deux transporteurs vésiculaires a été également identifiée dans les neurones sérotoninergiques du raphé possédant VGLUT3 et VMAT2 (Amilhon et al., 2010) (**Figure 21**).

Ainsi, le phénomène permettant l'augmentation de l'accumulation du NT principal dans les VS grâce à la présence de glutamate permise par VGLUT3, et entraînant par conséquent une libération plus importante du NT principal dans la synapse a été nommé « synergie vésiculaire ».

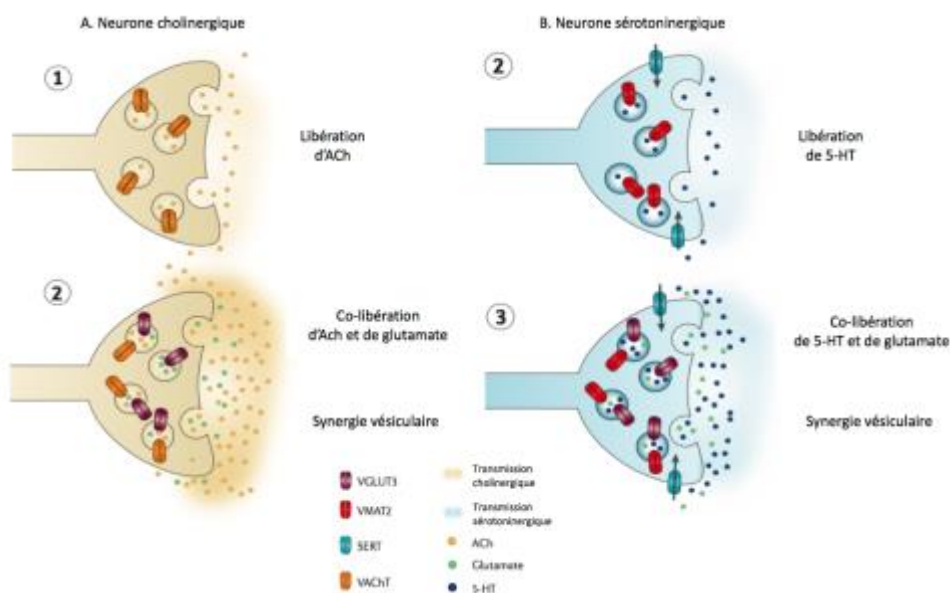


Figure 21: Co-libération de NT et synergie vésiculaire cholinergique (A) et sérotoninergique (B).

La présence de VGLUT3 augmente l'accumulation dans les VS d'acétylcholine (ACh, A2) par VAcHT, ou de sérotonine (5-HT, B2) par VMAT2, et la libération de ces NT et de glutamate dans la fente synaptique. (*Adapté de El Mestikawy et al. 2011*)

Par ailleurs, la synergie vésiculaire a été observée dans les terminaisons 5-HT VGLUT3-positives de l'hippocampe et du cortex prélimbique (Amilhon et al., 2010; Shutoh et al., 2008). Cependant, ces terminaisons n'expriment pas SERT, le transporteur de sérotonine nécessaire à sa recapture dans la fente synaptique (Amilhon et al., 2010; Shutoh et al., 2008). Ainsi, la transmission 5-HT reste efficace malgré le fort signal sérotoninergique délivré par

l'augmentation de la libération de 5-HT due à la présence de VGLUT3 et la diminution de recapture de sérotonine par l'absence de SERT. Cela suggère que l'intensité de cette transmission sérotoninergique varie en fonction des transporteurs présents au niveau synaptique.

Ce phénomène de synergie vésiculaire n'est pas exclusif à VGLUT3 et a été également suggéré pour le deuxième isoforme découvert des VGLUTs, à savoir VGLUT2 dans les neurones dopaminergiques et les interneurons GABAergiques (Hnasko et al., 2010; Zander et al., 2010). De plus, récemment, VGLUT2 et VIAAT ont été observés chez le rat dans les mêmes terminaisons synaptiques de l'aire tegmentale ventrale projetant sur l'habenula latérale, laissant entendre la libération à la fois du glutamate mais également du GABA dans la fente synaptique (Root et al., 2014). A ce jour, nous n'avons pas identifié cette colocalisation chez la souris (données de l'équipe non publiées).

Le mécanisme moléculaire impliqué dans la synergie vésiculaire est partiellement expliqué. En effet, le glutamate va permettre l'augmentation de l'acidification de la vésicule synaptique par son accumulation via VGLUT3 générant une augmentation du gradient de pH (El Mestikawy et al., 2011). Ainsi, VMAT2 et VACHT vont pouvoir transporter une plus forte quantité de NT à l'intérieur de la vésicule par l'utilisation du gradient de protons généré (Amilhon et al., 2010; Gras et al., 2008). En revanche, le rôle des anions (Cl^- et Pi) transportés par VGLUT3 restent inconnus (**Figure 22**).

D'après certaines études, le nombre de VGLUTs présents sur les VS modulerait la quantité de NT principal accumulé et par la suite libéré, jouant sur l'intensité de la réponse post-synaptique résultante (Ishikawa et al., 2002; Wilson et al., 2005; Wojcik et al., 2004). Toutefois, d'autres auteurs suggèrent qu'une seule molécule de VGLUT est nécessaire pour assurer un transport vésiculaire suffisant et la synergie vésiculaire (Daniels et al., 2006; Schenck et al., 2009; Wojcik et al., 2004).

D'autre part, le rôle de VGLUT3 ne semble pas limité à son implication dans la synergie vésiculaire. Des travaux menés au sein de l'équipe ont montré la présence de VGLUT3 dans les cellules ciliées internes de la cochlée permettant la transmission glutamatergique vers les cellules bipolaires du nerf auditif. Par conséquent, les souris n'exprimant plus VGLUT3 (les souris VGLUT3^{-/-}) sont sourdes (Ruel et al., 2008; Seal et al., 2008). L'implication de VGLUT3

a également été mis en évidence dans une pathologie héréditaire de l'audition chez l'Homme (surdité de type DFNA25) par les travaux menés par l'équipe du Pr Puel. En effet, une mutation ponctuelle (pA211V) du gène humain codant VGLUT3 serait à l'origine d'une surdité progressive liée à l'âge (cf *Chapitre III.4.b.ii*), page 61; Ramet et al., 2017; Miot, 2017, en *soumission*).

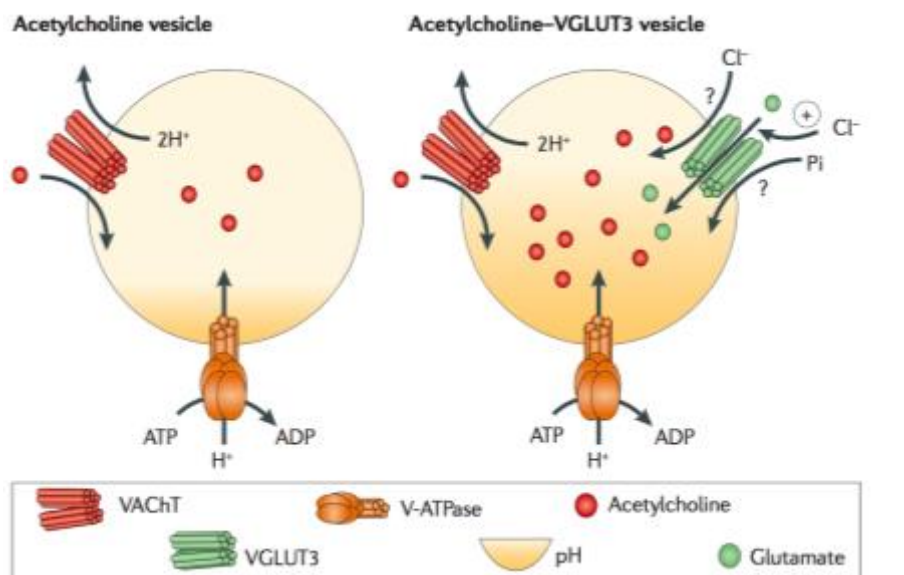


Figure 22 : Mécanisme moléculaire de la synergie v sriculaire.

L'accumulation des NT dans les VS se fait par la création d'un gradient électrochimique ($\Delta\mu_{H^+}$) dépendant de l'activité de la pompe V-ATPase. L'entrée de l'ACh dépend du gradient de pH, alors que la fonction de VGLUT3 dépend du gradient électrique. Pour une molécule d'ACh entrée, deux protons sont expulsés ce qui dissipe rapidement le gradient de pH. Toutefois, la présence de VGLUT3 permettrait une acidification de la vésicule augmentant la quantité de NT accumulés. (*D'après El Mestikawy et al. 2011*)

VGLUT3, à travers sa distribution en dehors du SNC, semblerait participer à la réalisation d'autres fonctions et interviendrait dans diverses pathologies.

III.4/ AUTRE DISTRIBUTION DE VGLUT3

III.4.a) VGLUT3 dans le reste du système nerveux

Dans la moelle épinière, l'ARNm de VGLUT3 est présent dans les cornes dorsales et ventrales, mais aussi dans les ganglions de la racine dorsale (Landry et al., 2004; Oliveira et al., 2003). En termes de distribution protéique, VGLUT3 est exprimé dans la matière grise mais

également dans quelques fibres de la matière blanche spinale. Sa distribution est beaucoup plus restreinte et moins importante que celles de VGLUT1 et VGLUT2 (Landry et al., 2004; Oliveira et al., 2003).

VGLUT3 est aussi présent dans une sous-population de neurones des ganglions de la racine dorsale qui projettent dans la lamina I et dans la couche profonde de la lamina II de la corne dorsale de la moelle épinière (Seal et al., 2009). Des études menées sur les souris VGLUT3^{-/-} ont montré que VGLUT3 est impliqué dans les circuits nociceptifs et notamment les mécanismes d'hypersensibilité suite au trauma, aux blessures nerveuses et aux inflammations (Seal et al., 2009).

D'autre part, VGLUT3 est observé dans les neurones nitroxydergiques du noyau du tractus solitaire et dans les neurones projetant sur le noyau du tractus solitaire par le nerf aortique dépresseur. Dans ces neurones, VGLUT3 est co-localisé avec l'oxyde nitrique synthase neuronale (nNOS) dans la région périsonotique et dans les terminaisons. Etant donné que le noyau du tractus solitaire est impliqué dans le contrôle des réflexes cardiovasculaires et que le nerf aortique dépresseur intervient dans la transmission des informations de pression et de pH sanguins, le glutamate, à travers VGLUT3, ainsi que l'oxyde nitrique (NO) participeraient potentiellement à la régulation des fonctions cardiaques (Lin and Talman, 2005; Lin et al., 2012).

VGLUT3 est également présent dans les neurones 5-HT projetant dans les régions essentielles à la respiration et au contrôle thermogène. Il s'avère que les nouveau-nés des souris VGLUT3^{-/-} présentent des altérations du contrôle respiratoire central et de la thermorégulation en réponse à un stress hypoxique. Cela suggère un nouveau rôle clé de VGLUT3 dans la protection des nouveau-nés en cas d'hypoxie (Miot et al., 2012).

III.4.b) VGLUT3 dans les organes sensoriels

III.4.b.i) VGLUT3 dans le système visuel

Dans la rétine, il existe de nombreux types cellulaires différents dont notamment les photorécepteurs (cônes et bâtonnets), les cellules ganglionnaires, les cellules bipolaires, et les cellules amacrines.

La population de cellules amacrines constituent l'essentiel des interneurons inhibiteurs de la rétine et présente une large diversité morphologique et moléculaire avec plus de 50 types différents de cellules amacrines chez la souris (MacNeil and Masland, 1998; Marc and Liu, 2000; Mosinger et al., 1986; Pourcho and Goebel, 1985). Les cellules amacrines assurent le transfert des signaux entre les cellules bipolaires et les cellules ganglionnaires et sont capables de libérer du GABA ou de la glycine (Masland, 2012; Wässle et al., 2009).

VGLUT3 a été retrouvé dans une sous-population de cellules amacrines dans la couche plexiforme interne chez le rat, la souris, le macaque et le pigeon. Cette découverte mettrait en lumière le premier type de cellules amacrines excitatrices décrits dans la rétine (Atoji and Karim, 2014; Fremerey et al., 2002; Gong et al., 2006; Grimes et al., 2011; Haverkamp and Wässle, 2004; Johnson et al., 2004; Stella et al., 2008).

Cette sous-population VGLUT3-positive constitue seulement 1% de la totalité des cellules amacrines dans la rétine des mammifères. Elles se caractérisent par l'expression de fort taux de glycine, du transporteur plasmique de la glycine, et par la formation de synapses en face desquels sont présents des récepteurs glycinergiques (Haverkamp and Wässle, 2004). En revanche, aucun autre transporteur vésiculaire n'est identifié à l'exception de VGLUT3, que ce soit celui de la glycine, de VIAAT ou d'un autre NT présent dans les cellules amacrines (ACh et/ou dopamine) (Haverkamp and Wässle, 2004).

Récemment une étude a montré que les cellules amacrines VGLUT3-positives sont capables de libérer du glutamate de façon dépendante au calcium (Lee et al., 2014).

Ainsi, ces cellules décrites comme étant seulement inhibitrices pourraient avoir un rôle excitateur.

III.4.b.ii) VGLUT3 dans le système auditif

Le système auditif humain est constitué de trois éléments de nature et de fonctions différentes : l'oreille externe, l'oreille moyenne et l'oreille interne. Le rôle majeur de ce système est la transformation de vibrations acoustiques aériennes captés par l'oreille externe, en messages nerveux dans l'organe interne, intégrables par le SNC (**Figure 23**).

Un des acteurs essentiels dans l'audition se trouve dans l'oreille interne. Il s'agit d'un organe appartenant à la cochlée, l'organe de Corti. Celui-ci est constitué notamment de cellules sensorielles possédant des stéréocils appelées cellules ciliées externes et internes, et de fibres nerveuses des neurones de type I et II du ganglion spiral.

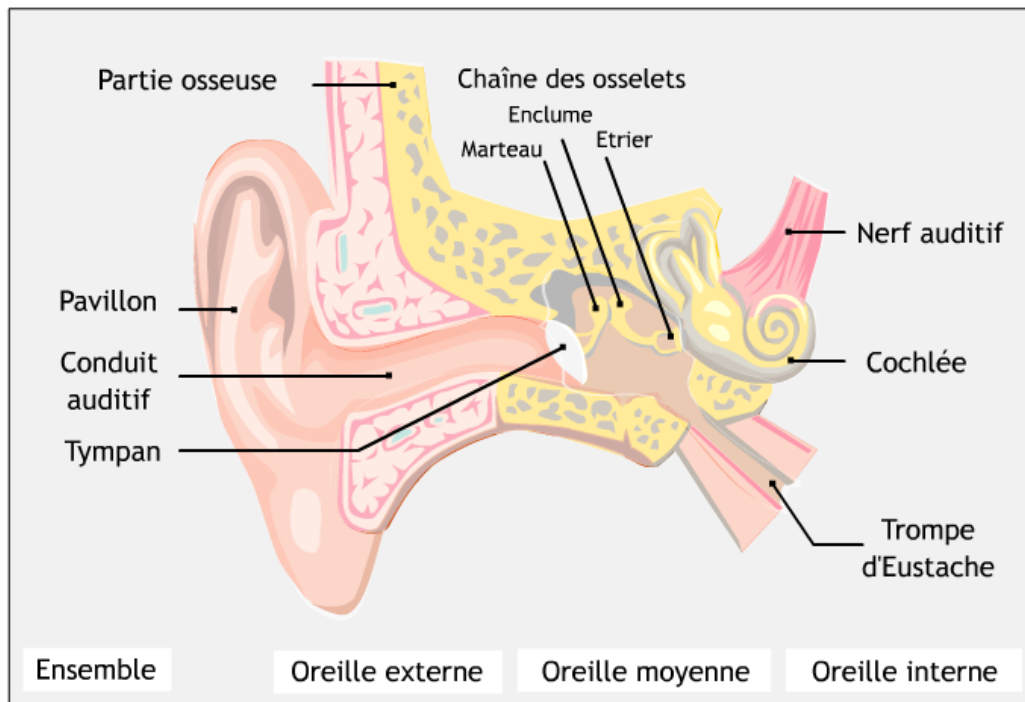


Figure 23: Schéma de l'appareil auditif humain.

L'organisation de l'oreille humaine est représentative de celles de tous les mammifères. L'oreille externe est constituée du pavillon, du conduit auditif externe et de la face externe du tympan pour capter les ondes sonores transmises à l'oreille moyenne. Celle-ci met en relation le tympan avec la fenêtre ovale de la cochlée. Elle comprend la face interne du tympan et les osselets (marteau, enclume, et étrier). L'oreille interne est formée par la cochlée, l'organe de l'audition et les organes de l'équilibre. (D'après www.audition.fr)

Pour pouvoir être transmise au SNC et être intégré comme signal auditif, les vibrations doivent atteindre la cochlée en passant d'abord par l'oreille externe et l'oreille moyenne. Elles vont alors entraîner le mouvement des liquides et des membranes constituant la cochlée. Cela provoque alors l'inclinaison des stéréocils des cellules ciliées induisant l'activation des fibres nerveuses des neurones du ganglion spiral qui transmettent le signal devenu électrochimique au cortex cérébral.

VGLUT3 a été retrouvé dans le système auditif et particulièrement dans l'organe de Corti, organe sensoriel clé de l'audition.

En effet, il apparaît que les synapses à ruban (synapses spécialisées permettant une libération rapide et soutenue de NT) formées entre les cellules ciliées internes et les neurones de type I du ganglion spiral sont glutamatergiques (Eybalin, 1993; Puel, 1995; Ruel et al., 2007).

VGLUT3 est le seul des trois isoformes des VGLUTs présent sur les VS des cellules ciliées internes. En revanche, il n'a jamais été observé dans les cellules ciliées externes (Ruel

et al., 2008; Seal et al., 2008). Selon certaines études, la présence de VGLUT3 semble avoir un rôle essentiel dans la transmission de l'information auditive.

En effet, il a été montré que l'inactivation du gène de VGLUT3 entraîne une surdité profonde chez la souris (Ruel et al., 2008; Seal et al., 2008). Aucune réponse nerveuse n'a été observé suite à une stimulation sonore suggérant un défaut de transmission des voies auditives.

D'autre part, des études menées sur les souris VGLUT3^{-/-} présentant par conséquent une surdité, ont mis en évidence une diminution du nombre de neurones auditifs primaires de type I avec cependant, un processus d'exocytose des VS non perturbé en l'absence de VGLUT3 (Ruel et al., 2008). Ainsi, le défaut de transmission au niveau de la synapse des cellules ciliées internes serait dû à l'absence de libération de glutamate consécutive à l'impossibilité de l'accumulation de glutamate dans les vésicules par l'absence de VGLUT3.

Par ailleurs, chez ces mêmes souris VGLUT3^{-/-}, des changements de morphologie précoces ont été observés. En effet, une réduction progressive du nombre de neurones dans le ganglion spiral ainsi qu'une réduction de la taille du noyau cochléaire ont été rapportés (Seal et al., 2008).

VGLUT3 semble alors jouer un rôle développemental et être essentiel à la libération du glutamate dans les cellules ciliées internes.

De plus, une mutation ponctuelle (pA211V) sur le gène codant VGLUT3 a été identifiée comme étant responsable d'une surdité progressive chez l'Homme (DFNA25)(Ruel et al., 2008). Il s'agit de la première mutation d'un VGLUT associée à une pathologie humaine. La mutation pA221V responsable de la surdité DFNA25 chez l'Homme s'exprime chez la souris par la mutation pA224V sur le gène codant VGLUT3. Chez les souris VGLUT3^{A224V/A224V}, cette mutation entraîne une diminution importante de l'expression de VGLUT3 (70%) dans les terminaisons nerveuses. Toutefois, son action ne semble pas altérée. Cette forte diminution de VGLUT3 s'accompagne d'une réduction du nombre de vésicules VGLUT3 positives à la synapse (Ramet et al., 2017). D'autres études menées au sein de l'équipe ont montré que cette mutation entraîne des altérations morphologiques des cellules ciliées internes. En effet, celles-ci présentent des stéréocils déformés et fusionnés laissant supposer l'incapacité de ces cellules à transmettre les informations acoustiques en message nerveux. VGLUT3 interviendrait également dans l'activation de la mort autophagique de façon indirect via la protéine Becline 1 (Thèse Stéphanie Miot, 2017).

D'un point de vue clinique, ce type de surdité s'apparente à une forme de presbyacousie, c'est-à-dire à une perte d'audition bilatérale et symétrique liée à l'âge et touchant essentiellement les hautes fréquences.

III.4.c) VGLUT3 dans les organes périphériques

VGLUT3 est également présent dans les organes périphériques. En effet, son expression a été retrouvée dans le foie, et le rein à des quantités plus faibles à partir d'analyses de northern blot (Fremeau et al., 2002; Gras et al., 2002). D'autres auteurs mentionnent la présence de VGLUT3 dans le muscle squelettique (Boulland et al., 2004; Wu et al., 2004). Le rôle de VGLUT3 au sein de ces organes pourrait être de transmettre localement les informations glutamatergiques, ou bien de limiter les excès de glutamate cytosolique par sa recapture dans les vésicules.

Points Importants :

Le transporteur vésiculaire du glutamate 3, VGLUT3

- VGLUT3 est présent :
 - dans le corps cellulaire et les terminaisons nerveuses
 - dans des neurones qui expriment un autre neurotransmetteur principal.
- Il existe une co-transmission glutamatergique, via VGLUT3 et :
 - sérotoninergique dans le raphé
 - GABAergique dans le cortex, l'hippocampe et l'amygdale
 - cholinergique dans le striatum et le cerveau antérieur basal.
- Il existe une synergie vésiculaire favorisant l'accumulation des NT dans les VS :
 - des neurones 5-HT exprimant VGLUT3 dans le raphé
 - des interneurones cholinergiques exprimant VGLUT3 dans le striatum.
- VGLUT3 est impliqué dans diverses pathologies :
 - du SNC : les douleurs neurogènes, l'anxiété, l'hyperlocomotion, les addictions
 - du SNP : la surdité progressive DFNA25, l'hypoxie chez les nouveaux-nés.

Au sein du SNC, VGLUT3 est très fortement détectée dans la région basolatérale de l'amygdale (Herzog et al., 2004). Toutefois son rôle dans cette structure profonde du lobe temporal médian particulièrement impliquée dans l'apprentissage et les mémoires émotionnelles (LeDoux, 2003, 2007) n'avait encore jamais été étudié auparavant. Mais avant de rentrer dans le vif du sujet, attardons-nous un peu sur cette structure clé des mémoires émotionnelles.

IV/ L'AMYGDALÉ ET LES MÉMOIRE AVERSIVES

IV.1/ STRUCTURE DU COMPLEXE AMYGDALIEN

IV.1.a) Organisation morphologique et structurelle

Au début du 19^e siècle, Burdach identifie pour la première fois une structure profonde en forme d'amande dans le lobe temporal médian des mammifères qu'il nomma « amygdale » (Burdach, 1819-1822). Ce nom, dérivé du grec ancien, fait référence à la forme en amande du groupe de cellules originellement découvert et connu aujourd'hui sous le nom de complexe basolatérale de l'amygdale (BLA) (**Figure 24**).

En 1867 Meynert amorça la description anatomique et morphologique des cellules appartenant à l'amygdale (Meynert, 1867). Par la suite, de nombreuses structures localisées autour du complexe basolatérale de l'amygdale ont été identifiées et ajoutés à ce dernier afin de constituer le complexe amygdalien que l'on connaît aujourd'hui (Johnston, 1923).

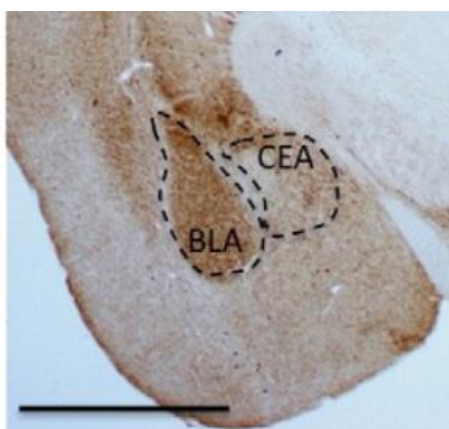


Figure 24 : Représentation de la forme en amande de l'amygdale basolatérale.

Marquage du neuropeptide NPY par immunohistochimie. Image prise par photomicrographie. BLA : Amygdale basolatérale ; CEA : noyau central. Echelle 2 mm. (D'après Tasan et al., 2016)

Le complexe amygdalien est constitué de divers et nombreux noyaux eux-mêmes divisés en sous régions. La distinction de ces noyaux est basée sur leurs propriétés

cytoarchitecture, histochimique et sur les connections qu'ils établissent (Pitkanen, 2000; Krettek and Price, 1978). En effet, il est composé de treize noyaux dont six ont été définis comme étant les noyaux principaux (**Figure 25**).

Ces derniers sont divisés en trois groupes :

- le complexe basolatéral (BLA) constitué du noyau latéral (LA), du noyau basal appelé parfois noyau basolatéral (BA), et du noyau basal accessoire autrement appelé noyau basomédial (BMA)
- le noyau cortical incluant les noyaux corticaux et les noyaux du tractus olfactif latéral
- et le noyau centro-médial comprenant le noyau central (CeA), le noyau médial, et la partie amygdalienne du lit du noyau de la strie terminale (Sah et al., 2003).

D'autres noyaux sont également décrits comme appartenant au complexe amygdalien tel que les masses de cellules intercalées (ICMs), l'aire amygdalo-hippocampique, et l'aire antérieure de l'amygdale (Johnston, 1923; McDONALD, 2003; Sah et al., 2003; Aggleton 2000).

Groupes principaux	Différents noyaux	Sous-divisions nucléaires
Complexe basolatéral	Noyau latéral	Noyaux dorsolatéral, ventrolatéral, et médial
	Noyau basal	Noyaux rostral magnocellulaire, intermédiaire caudé et parvicellulaire
	Noyau basomédial	Groupes magnocellulaire, intermédiaire et parvicellulaire
Noyau cortical	Noyaux corticaux	Noyaux corticaux antérieur et postérieur et cortex périamygdaloïde
	Noyaux du tractus olfactif latéral	Noyau du tractus olfactif latéral, le lit du noyau du tractus olfactif accessoire,
Noyau centro-médial	Noyau central	Noyaux capsulaire, latéral, intermédiaire, et médial
	Noyau médial	Noyaux rostral, central et caudal
	Partie amygdalienne du lit du noyau de la strie terminale	-

Tableau 3 : Classification des noyaux de l'amygdale cérébrale.

Une organisation nucléaire et une sous-nucléaire permet de classer les noyaux de l'amygdale.

Ces différents noyaux se distinguent à un niveau inférieur par leur sous-divisions nucléaires. En effet, chacun de ces noyaux est divisé en sous régions (**Tableau 3**) (Sah et al., 2003).

A l'origine dans la classification, les noyaux du groupe centromédial sont regroupés avec les noyaux corticaux. Toutefois, à l'issue de certaines études initiées par Macdonald en 1998, ces noyaux ont été séparés du groupe cortical au vu des différences histochimiques et développementales observées (McDonald, 1998).

Par ailleurs, et à partir des découvertes sur les connexions entre l'amygdale et les structures environnantes, une nouvelle classification a été proposée. En effet, Alheid et Heimer ainsi que leurs collaborateurs suggèrent que le noyau centromédial doit être élargi caudalement et rostralement au lit du noyau de la strie terminale (*bed nucleus of the stria terminalis*, BNST) et aux régions caudorostrales de la substance innominata (représentant le pallidum ventral) pour former « l'amygdale étendue », ces nouvelles régions faisant partie intégrante du complexe amygdalien (Alheid, 1995, 2003; Alheid and Heimer, 1988).

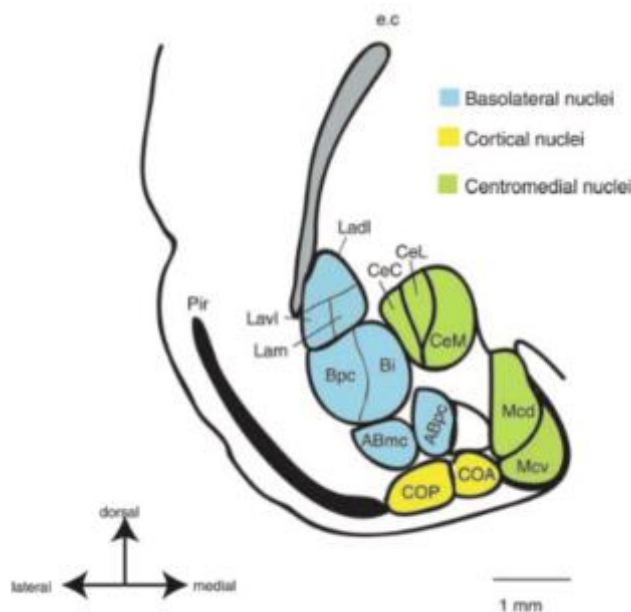


Figure 25 : Noyaux du complexe amygdalien chez le rat.

Les noyaux amygdaliens sont divisés en trois groupes : les aires bleues forment l'amygdale basolatérale, les aires jaunes représentent l'amygdale corticale et les zones vertes correspondent à l'amygdale centromédiale. *ABmc* : *accessory basal magnocellular subdivision* ; *ABpc* : *accessory basal parvocellular subdivision* ; *AHA* : *amygdalohippocampal area* ; *Bi* : *intern basal nucleus* ; *Bpc* : *basal nucleus magnocellular subdivision* ; *CeC* : *capsular subdivision* ; *CeL* : *lateral subdivision* ; *CeM* : *medial subdivision* ; *CoA* : *anterior cortical nucleus* ; *CoP* : *posterior cortical nucleus* ; *e.c.* : *external capsule* ; *I* : *intercalated nuclei* ; *Ladl* : *lateral amygdala medial subdivision* ; *Lam* : *lateral amygdala medial subdivision* ; *Lavl* : *lateral amygdala ventrolateral subdivision* ; *Mev* : *medial amygdala ventral subdivision* ; *Pir* : *piriform cortex*. (D'après Sah et al. 2003)

D'autres auteurs ont remis en question la classification actuelle qu'ils considèrent comme étant un regroupement arbitraire de noyaux structurellement et fonctionnellement hétérogènes. Swanson et Petrovich proposent alors de diviser ces noyaux en quatre systèmes fonctionnels : frontotemporal, autonome, principalement olfactif, et olfactif accessoire (Swanson and Petrovich, 1998).

Le noyau basolatéral, ayant une origine embryologique de type cortical (Johnston, 1923; McDonald, 2003), appartiendrait au système frontotemporal. En effet, il reçoit des afférences provenant de régions similaires morphologiquement et contient des neurones ressemblant aux neurones corticaux.

Le noyau central, possédant lui une origine embryonnaire striatale (Johnston, 1923; McDonald, 2003; Puelles, 2001), contient des cellules morphologiquement similaires au striatum (Puelles, 2001; Swanson and Petrovich, 1998) et établit des connections avec des régions impliquées dans le contrôle autonome. Il appartiendrait ainsi au système autonome (Swanson and Petrovich, 1998).

Enfin, le noyau cortical et le noyau médial ferait respectivement partie du système olfactif principal et du système olfactif accessoire (Sah et al., 2003; Swanson and Petrovich, 1998).

Au niveau cellulaire, étant donné que la région basolatérale a une origine embryologique corticale, de façon similaire au cortex, les cellules principales du noyau basolatérale sont glutamatergiques alors que les interneurons sont GABAergiques (McDonald, 1992).

Il en est de même pour la région centrale d'origine striatale qui, comme les cellules du corps du striatum, présentent des neurones principaux utilisant le GABA comme NT (McDonald and Augustine, 1993; Swanson and Petrovich, 1998).

D'un point de vue évolutif, cette organisation du complexe amygdalien basée sur l'origine embryologique semble conservée dans de nombreuses espèces (reptiles, oiseaux et amphibiens) et est observée chez les tétrapodes (Martínez-García et al., 2002; Medina et al., 2004; Pabba, 2013).

IV.1.b) Organisation cellulaire

Au sein du complexe amygdalien, il apparaît que l'amygdale basolatérale est principalement glutamatergique, alors que le noyau central est exclusivement GABAergique (McDonald 1992; McDonald and Augustine, 1993; Spampanato et al., 2011; Swanson and Petrovich, 1998) (**Figure 26**).

L'**amygdale basolatérale** (BLA) est composée majoritairement de neurones à épines glutamatergiques (environ 80%) et d'une population éparses minoritaire d'interneurones GABAergiques à épines (environ 20%) (McDonald, 1992 ; Spampanato et al., 2011). Cette composition est similaire à celle retrouvée dans le cortex cérébral. Parmi ces neurones, certains se caractérisent par un type de décharge régulier qui entraîne un continuum d'adaptation de fréquence des décharges due à la différence d'expression des conductances potassiques dépendantes du voltage et du Ca²⁺ (Faber and Sah, 2002; Sah et al., 2003). La corticostérone et la noradrénaline réduisent fortement cette adaptation et ainsi permettent l'augmentation d'excitabilité des cellules principales dans des contextes émotionnels (Duvarci and Paré, 2007; Tully et al., 2007).

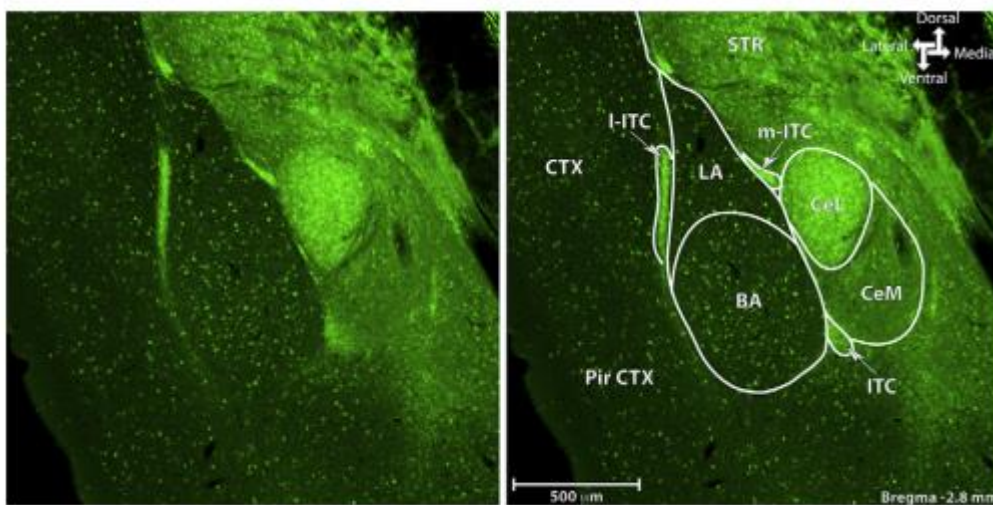


Figure 26 : Distribution des interneurones de l'amygdale.

Expression de la GAD en vert dans les différents noyaux de l'amygdale. LA : noyau latéral ; BA : noyau basal ; CeL : noyau central latéral ; CeM : noyau central médial ; ITC : cellules intercalées. (D'après Spampanato et al., 2011)

Il existe cinq types d'interneurones GABAergiques différents dans la BLA (Mascagni and McDonald, 2003, 2007; McDonald and Betette, 2001; McDonald and Mascagni, 2001, 2002). Ces différents types de neurones régulent les cellules principales de façon différente en raison de leurs afférences et efférences diverses (Bienvenu et al., 2012; Muller et al., 2005, 2006, 2007a; Smith et al., 2000).

Parmi ces cinq types, deux sous-populations se distinguent :

- Les interneurones SOM positifs qui ciblent les dendrites distales des cellules principales et reçoivent des afférences corticales (Muller et al., 2007a; Unal et al., 2014), et
- Les interneurones « en paniers » (*basket cells*). Chez ces derniers, on peut identifier :

1/ Les interneurones PV positifs qui ne sont pas présents de façon homogène dans la BLA et se trouvent principalement dans le noyau basal (Muller et al., 2006). Ils constituent la

plus importante population d'interneurons dans la BLA et reçoivent de fortes afférences des cellules principales mais peu du cortex cérébral (Smith et al., 2000). Ils forment des synapses inhibitrices avec le soma, le segment initial de l'axone et les dendrites proximales des cellules de projection (McDonald and Betette, 2001; Pitkänen and Amaral, 1993; Smith et al., 1998; Sorvari et al., 1995). Ils délivrent des PA de faible durée non adaptatif et certain d'entre eux génèrent des décharges régulières accommodantes (Rainnie et al., 2006; Woodruff and Sah, 2007). Ces interneurons possèdent la plus importante force inhibitrice sur les cellules principales de la BLA (Muller et al., 2005; Woodruff and Sah, 2007).

2/ Les interneurons CCK positifs qui forment des synapses au niveau du soma et des dendrites proximales, mais aussi au niveau axo-axonique (Capogna, 2014; Katona et al., 2001; Vereczki et al., 2016). Ils émettent de larges PA à basse fréquence et des décharges adaptatives (Jasnow et al., 2009; Spampanato et al., 2011).

Les interneurons PV et SOM sont respectivement impliqués dans le feedback et le feedforward inhibiteur. En effet, Wolff et collaborateurs ont mis en évidence que les interneurons exprimant PV sont capables d'inhiber les interneurons SOM positifs entraînant la désinhibition des neurones principaux (Wolff et al., 2014).

Le **noyau central** de l'amygdale composé des sous-régions latérale (CeL) et médiale (CeM) est composé exclusivement de cellules GABAergiques (McDonald, 1992 ; Hall, 1972; Kamal and Tömböl, 1975; McDonald and Augustine, 1993; Paré and Smith, 1993a).

Les neurones du CeM se caractérisent généralement par de larges soma, peu de connexions et présentent une faible densité d'épines dendritiques. Les neurones du CeL ont de petits soma, de nombreuses dendrites primaires qui établissent largement des contacts et supportent une haute densité d'épines, de façon similaire aux cellules principales du striatum.

Les cellules impliquées dans les circuits locaux semblent être en proportion plus faible dans les neurones du CeL que dans la BLA. Il existe trois types de neurones principaux dans le CeL et le CeM : ceux à décharge régulière, ceux à décharge à seuil faible et ceux à décharge lente (Dumont et al., 2002; Lopez de Armentia and Sah, 2004; Martina et al., 1999).

Les **cellules intercalées** (*Intercalated Cell Masses, ICMs*) ne forment pas un noyau compact mais sont répartis en petits groupes denses de cellules. Les ICMs forment des connexions différentes en fonction de leur position. En effet, ils se trouvent dans deux faisceaux de fibres majeurs : la capsule externe qui les borde latéralement, et la capsule interne localisée

entre la BLA et le CeA. Ceux présents dans la capsule externe sont les ICM latéraux (ICM_L) et ceux de la capsule interne les ICM médiaux (ICM_M). Parmi les ICM_M, on distingue ceux localisés dorsalement près du CeL, les ICM_{MD} et ceux localisés ventralement près du CeM, les ICM_{MV}. La très grande majorité de ces neurones sont GABAergiques (McDonald and Augustine, 1993; Nitecka and Ben-Ari, 1987; Paré and Smith, 1993a). Ils ont un petit soma (8-19 microns de diamètres), un arbre dendritique limité aux faisceaux de fibres où est localisé le soma, et une densité d'épines dendritiques relativement élevée (Millhouse, 1986). Ils expriment de forts niveaux d'opioïde μ et des récepteurs à la dopamine de type 1 (Herkenham and Pert, 1982; Jacobsen et al., 2006; Poulin et al., 2008). Ils présentent une décharge régulière, une haute excitabilité intrinsèque et peu d'adaptation de fréquence aux décharges (Geracitano et al., 2007; Marowsky et al., 2005; Royer et al., 2000).

L'intégrité de l'organisation morphologique, structurelle et cellulaire des noyaux amygdaliens semble indispensable pour permettre l'occurrence de processus cognitifs complexes. Ainsi, le complexe amygdalien a été identifié comme jouant un rôle majeur dans la gestion des émotions et des mémoires associées.

IV.2/ FONCTIONS ASSOCIÉES À L'AMYGDALÉ

IV.2.a) La découverte du rôle de l'amygdale dans la peur

Il existe six émotions de base universelles partagées par les hommes mais également par de nombreuses espèces animales : la tristesse, la joie, le dégoût, la surprise, la colère et la peur (Darwin, 1872 ; Ekman, 1992) (**Figure 27**).

La peur est le lien entre le ressenti émotionnel face à un stimulus menaçant et la réponse comportementale qui en découle. Il s'agit d'un état transitoire, adaptatif pour assurer la survie de l'individu. Elle se distingue de l'anxiété qui est un état tonique se référant plus à une humeur qu'à une émotion (Adolphs, 2013).

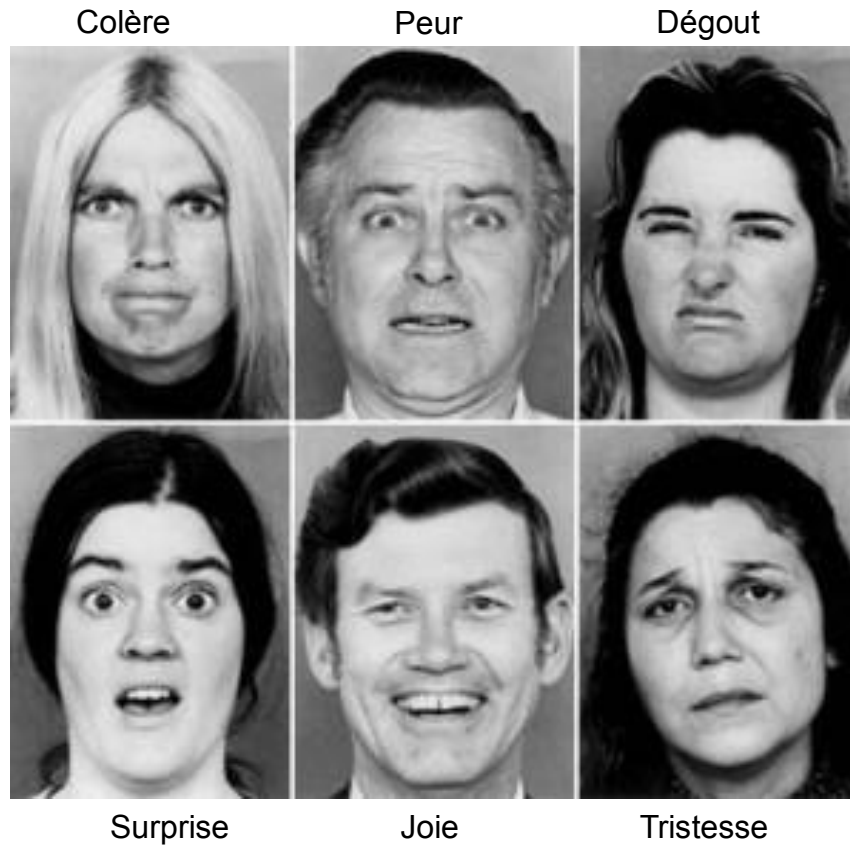


Figure 27 : Les six émotions de base universelles. (D'après Ekman et al., 1992)

Dans le but de déterminer le rôle de la peur lors de la présentation d'un stimulus émotionnel, deux théories majeures et opposées ont été établies. James-Lange affirme que ce sont les modifications physiologiques qui déclenchent l'émotion de peur : « je fuis donc j'ai peur » (James, 1890). La théorie de Cannon-Bard suggère au contraire que l'expérience émotionnelle de la peur suite à la présentation d'un stimulus entraîne l'expression de celle-ci, c'est-à-dire des modifications viscérales, somatiques et comportementales : « j'ai peur donc je fuis » (Cannon et al., 1927).

Une des premières expériences démontrant l'implication de l'amygdale dans les comportements émotionnels de peur remonte à 1888. Brown et Schäfer ont décrit de profondes altérations des réactions émotionnelles suite à des lésions du lobe temporal chez le singe (Brown and Schafer, 1888). En 1937, Klüver et Bucy se sont penchés plus précisément sur cet effet. Ils observent alors que chez le singe, des lésions du lobe temporal médial (région incluant l'amygdale) peuvent entraîner une série de comportements anormaux : absence de colère, de peur, augmentation de l'exploration, agnosie visuelle, hyperoralité, hypersexualité et perte des

interactions sociales, définie sous le terme de syndrome de Klüver et Bucy (Klüver and Bucy, 1937).

Parallèlement à ces travaux, en 1949, MacLean introduit le concept de système limbique et y inclut l'amygdale dans la continuité des recherches de Papez qui ajouta des structures médiales temporales au circuit impliqué dans l'expression émotionnelle (MacLean, 1949; Papez, 1937).

Afin d'être plus spécifique et d'établir plus précisément les régions impliquées dans le phénotype décrit par Klüver et Bucy, Weiskrantz et d'autres auteurs diminuent la taille des lésions dans le lobe temporal et démontrent que l'absence de peur observée chez les singes est due à l'altération de l'amygdale, un groupe de noyaux hétérogènes appartenant au lobe temporal (Weiskrantz, 1956; Zola-Morgan et al., 1991).

D'autre part, une autre étude confirme également que des lésions excitotoxiques sélectives de l'amygdale entraînent une diminution du comportement de peur comme observé par Klüver et Bucy (Meunier et al., 1999).

Cette absence de comportement de peur suite à des lésions de l'amygdale est retrouvée dans de nombreuses espèces de mammifères et notamment chez les rats, les chats, les lapins, les chiens et les humains (Goddard, 1964).

IV.2.b) L'amygdale dans les processus d'apprentissage et de mémoires de peur

En 1927, Ivan Petrovich Pavlov développe une forme simple d'apprentissage associatif que l'on appellera conditionnement pavlovien ou conditionnement classique (Pavlov, 1927).

Ce processus d'apprentissage a largement été utilisé afin de développer les connaissances sur les circuits et les mécanismes neuronaux d'une grande variété de systèmes comportementaux au sein de différentes espèces (F B Krasne and Glanzman, 1995; Holland and Gallagher, 1999; Thompson and Krupa, 1994).

Une des formes du conditionnement Pavlovien adaptée à l'étude des processus d'apprentissage aversif est le conditionnement de peur (ou *Fear Conditioning* - FC).

Ce conditionnement fait intervenir une forme d'apprentissage permettant d'associer certains stimuli de l'environnement à un évènement aversif. Au cours de l'évolution, cet apprentissage s'est installé afin de favoriser la survie des individus face à des menaces présentes ou futures

de l'environnement. Il s'agit d'une composante essentielle des systèmes comportementaux de défense chez de nombreux mammifères (Fanselow, 1994).

La peur conditionnée est un phénomène pouvant être étudié chez différentes espèces et notamment chez le rongeur à travers un test comportemental. Il s'agit d'un apprentissage associatif de type pavlovien entre un stimulus neutre (SN) généralement un signal sonore ou lumineux, et un stimulus aversif (inconditionné, SI) sous forme de choc électrique. La seule présentation du SI déclenche une réponse comportementale de peur dite inconditionnée. La présentation simultanée du SI et du SN va permettre à ce dernier d'acquérir une valeur prédictive quant à la survenue du choc. Suite à cette association, le SN devient un stimulus conditionné (SC) capable de déclencher une réponse de peur dite conditionnée. Chez le rongeur, cette réponse de peur est exprimée par le *freezing*. Ce comportement de *freezing* est défini comme une immobilisation totale du rongeur (absence de mouvement, excepté les mouvements respiratoires). Pour que cette association SC-SI ait lieu, il faut que leurs présentations suivent : 1/ la loi de contingence, c'est-à-dire que SC soit prédictif de l'occurrence du SI, et 2/ la loi de contiguïté où le délai entre les deux stimuli permet d'avoir une association optimale (LeDoux, 2003).

Chez l'Homme, le conditionnement de peur pavlovien a été utilisé afin de démontrer qu'une phobie pouvait apparaître suite à l'association d'un stimulus neutre avec un stimulus aversif. Cet apprentissage a été décrit dans l'expérience de John Watson et Rosalie Rayner en 1920. Au cours de cette expérience, Watson et Rayner ont pour objectif de conditionner à la peur Albert B., un enfant âgé de 9 mois, à un rat blanc en l'associant à un son aversif et fort. En effet, avant que l'association entre le rat et le son ait lieu, Albert n'est pas effrayé par le rat à qui il n'accorde aucune valence aversive mais montre plutôt une forme de curiosité. Ensuite, de façon attendue, le bruit fort généré par Watson en frappant avec un marteau sur une barre en acier suspendue, a déclenché une forte réponse de peur de la part d'Albert. Suite à ce bruit, Albert a été violemment surpris et s'est mis à pleurer. Après, plusieurs présentations du rat associé à ce bruit, Albert a appris à avoir peur du rat. En effet, après chaque présentation du rat, Albert se mit à pleurer et chercha à fuir l'animal (Watson and Rayner, 1920). Cette expérience illustre bien l'acquisition de la peur conditionnée, bien que ce type de procédure soit contestable d'un point de vue éthique (**Figure 28**).

Par ailleurs, les premières études sur l'implication de l'amygdale dans les apprentissages liés à la peur ont commencé avec des tâches expérimentales instrumentales d'évitement au cours desquelles les animaux doivent éviter le stimulus aversif par l'adoption d'une réponse comportementale appropriée (King, 1558; Fonberg, 1965; Horvath, 1963; Robinson, 1965).

D'autres utilisations du conditionnement de peur pavlovien se sont ajoutées par la suite afin d'étudier l'amygdale dans les comportements émotionnels. En effet, les Blanchards ont démontré le rôle direct de l'amygdale dans l'acquisition de la peur conditionnée contextuelle. En effet, suite à l'apprentissage associant des stimuli environnementaux à l'occurrence d'un évènement aversif, à savoir un choc électrique aux pattes, les rats présentant des lésions au niveau de l'amygdale ne montrent pas de *freezing* et jouent avec leurs prédateurs naturels, comme le chat ou le serpent, sans être effrayés (Blanchard and Blanchard, 1972).



Figure 28 : Expérience de Watson et Rayner – « Little Albert »

Apprentissage de la peur conditionnée chez un enfant âgé de 9 mois, le petit Albert entre un stimulus conditionné, un rat blanc et un stimulus aversif sous la forme d'un son violent.

(D'après Watson and Rayner, 1920)

Il semble que l'amygdale ait également un rôle important dans la peur conditionnée chez l'Homme (Davidson and Irwin, 1999). Outre l'expérience du petit Albert en 1920, de nombreuses études ont été menées mettant en lumière son implication essentielle dans la peur, notamment celle faisant intervenir des patients présentant des altérations de l'amygdale incapables de reconnaître des expressions faciales de peur (Adolphs et al., 1995, 1999; Young et al., 1995). Des lésions de l'amygdale chez l'Homme entraîne également une réduction globale des réponses émotionnelles (Aggleton, 1992). De plus, la stimulation électrique directe de l'amygdale induit des réponses comportementales de peur avec les phénomènes sensoriels et viscéraux associés (Halgren et al., 1978).

Ainsi, les mécanismes neuronaux de peur conditionnée semblent manifester une homologie à travers plusieurs espèces de mammifères (Janak and Tye, 2015).

IV.2.c) Autres fonctions

La régulation et la modulation des émotions sont permises par de nombreuses structures. Il apparaît que l'amygdale est fortement impliquée dans une large variété de fonctions émotionnelles.

En effet, l'amygdale intervient dans les états émotionnels associés aux comportements sociaux tel que les comportements agressifs, maternel, et sexuel, mais aussi les comportements alimentaires (nourriture et boisson) (Tye and Janak, 2007; Tye et al., 2008; Uwano et al., 1995). L'expérience de Klüver et Bucy témoigne de l'implication de l'amygdale notamment dans les comportements sociaux (voir plus haut).

D'autre part, l'amygdale est une structure clé dans les mémoires émotionnelles aversives mais également appétitives (LeDoux, 2003; Leung et al., 2016). En effet, elle est impliquée dans les processus d'apprentissage récompensant notamment utilisés pour motiver et renforcer les comportements comme dans l'addiction aux drogues (Rademacher et al., 2015).

L'amygdale, par son implication dans les processus émotionnels, est donc naturellement associée à des troubles psychiatriques dont notamment les troubles anxieux tel que le trouble de stress post-traumatique ou TSPT, ou encore la dépression, la schizophrénie et l'autisme.

Par ailleurs, l'amygdale cérébrale intervient dans la régulation et la modulation de diverses fonctions cognitives chez l'Homme et notamment dans l'attention, la perception et la mémoire explicite (LeDoux, 2007).

L'amygdale s'active lorsque l'on a peur, mais également lorsque l'on pense à un évènement effrayant ou bien même lorsque l'on regarde des visages exprimant la peur. Ces données suggèrent un rôle de l'amygdale dans les informations implicites et dans la mémoire inconsciente.

IV.3/ APPRENTISSAGE ET MÉMOIRES ÉMOTIONNELS

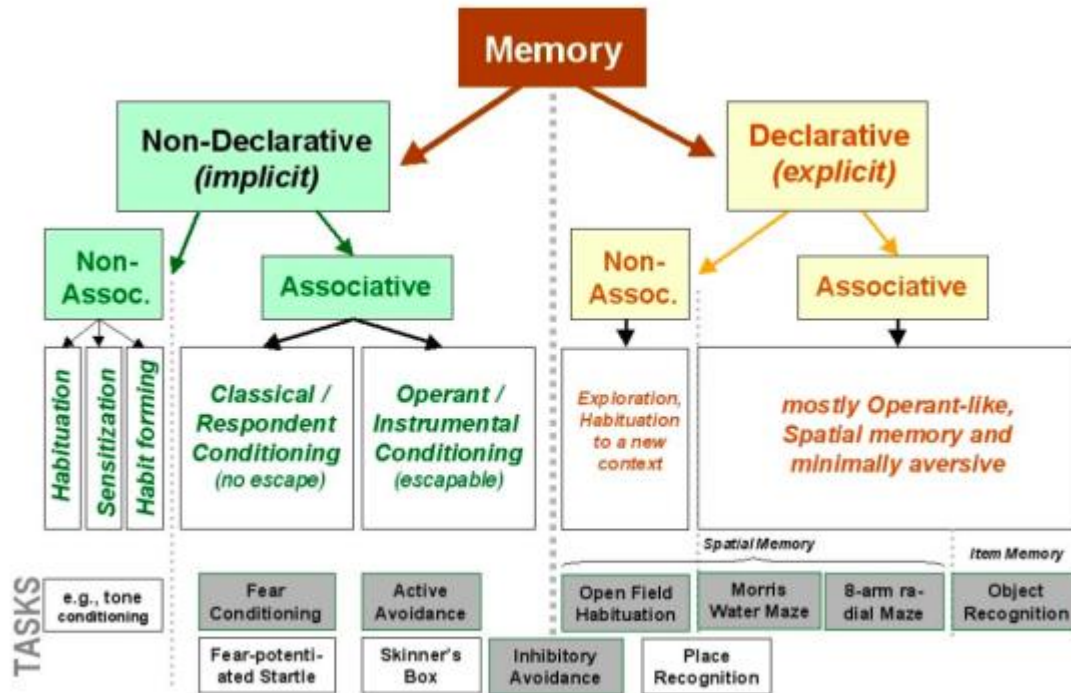
IV.3.a) Différents types d'apprentissage et de mémoire

L'apprentissage est un processus conservé au cours de l'évolution permettant à chaque individu d'acquérir de nouvelles habilités essentielles à sa survie (Adolphs, 2013; Herry and Johansen, 2014). En effet, notre cerveau adopte une stratégie d'apprentissage continuels afin de nous donner la possibilité d'acquérir une compétence clé : l'adaptation de notre comportement aux changements de l'environnement par le maintien en mémoire des expériences vécues (Maren, 2003).

Il existe plusieurs types de mémoire capables de stocker des informations provenant de notre environnement et classés selon différents critères : 1/ leur fonction : mémoire de travail ou mémoire référence, 2/ leur contenu : mémoire déclarative (ou explicite) ou mémoire non-déclarative (ou implicite), 3/ leur durée dans le temps : mémoire à court-terme ou mémoire à long-terme, 4/ leur nature : mémoires associative ou non-associative, 5/ et enfin leur motivation : mémoires appétitive ou aversive (Quillfeldt, 2006).

Parmi ces mémoires, on retrouve la mémoire déclarative (ou explicite) qui se compose entre autres de la mémoire des faits et connaissances, appelée mémoire sémantique, et de la mémoire des évènements personnels vécus nommée mémoire épisodique. La mémoire non-déclarative (ou implicite) quant à elle, se réfère aux habilités motrices (mémoire procédurale) et sensorielles (**Figure 29**).

Ces mémoires peuvent être subdivisées en deux groupes de natures distinctes : 1/ la mémoire associative qui consiste à associer des stimuli avec des réponses, ou bien deux stimuli entre eux, et 2/ la mémoire non-associative comprenant des stimuli indépendants.



26abr2006 © JAQ

Figure 29 : Classification des différents types de mémoires et les quelques tâches comportementales associées.

Aucune notion temporelle n'est représentée dans cette classification. (D'après Quillfeldt, 2006)

Au sein des mémoires associatives, on distingue le conditionnement classique (ou Pavlovien) et le conditionnement opérant (ou instrumental). Ils peuvent être de nature différente, à savoir appétitive ou aversive.

Dans le conditionnement classique, les contingences entre les stimuli et les réponses sont arrangées et contrôlées par l'expérimentateur de sorte à ce que l'association soit inévitable pour l'animal (Pavlov, 1927). Pour le conditionnement opérant, l'environnement est aménagé pour permettre certaines réponses de l'animal afin d'observer des comportements attendus tel que l'évitement d'un stimulus aversif comme un choc électrique, ou la prise de nourriture (Skinner, 1937).

Pour étudier ces mémoires associatives, des tests comportementaux ont été élaborés et adaptés chez des modèles animaux. On retrouve notamment l'analyse des mémoires aversives à travers de nombreuses tâches comportementales, telles les tests d'évitement ou le conditionnement de peur.

Le test d'évitement passif fait intervenir un apprentissage permettant l'inhibition d'une réponse afin d'éviter un stimulus aversif comme un choc électrique. Celui d'évitement actif lui permet d'éviter un stimulus aversif par une action volontaire d'évitement. Ces deux tests appartiennent à la famille des tests de conditionnements opérants.

Le test de conditionnement classique, ou conditionnement de peur consiste à apprendre à l'animal que certains stimuli de l'environnement sont prédictifs d'un événement aversif.

IV.3.b) Les mémoires aversives par le conditionnement de peur

En 1900, Müller et Pilzecker ont proposé un modèle permettant d'expliquer la formation de la mémoire. Il s'agit de la *Théorie de la Consolidation de la Mémoire* présentant deux étapes principales : la formation et le rappel (*recall*) de la mémoire (**Figure 30**).

Au sein de l'étape de formation, il existe deux phases : 1/ l'acquisition, qui correspond à la phase d'apprentissage, et 2/ la consolidation, qui est la phase durant laquelle la trace mnésique labile va être modifiée pour pouvoir être physiquement stockée à long terme.

La phase de rappel prend place durant la réexposition au contexte d'apprentissage avec ou sans délivrance de stimuli. Il s'agit du seul moyen de s'assurer que la mémoire s'est réellement formée et stockée.

Lors du **conditionnement de peur**, l'animal évoluant dans un environnement donné, va pouvoir associer différents stimuli de cet environnement. Plus le nombre de présentations des associations SC-SI sera important, plus l'acquisition de cette association sera forte. Immédiatement après le conditionnement, et pendant plusieurs heures, la trace mnésique est labile, sensible aux interférences. En d'autres termes, des perturbations de son environnement peuvent modifier la trace mnésique originale (Dudai, 2004; Izquierdo, 1989; Izquierdo et al., 1999, 2002; McGaugh, 1966).

Le switch entre les mémoires à court (sensible aux interférences) et à long-terme s'opère par l'intervention d'acteurs impliqués dans l'expression de gènes et la synthèse protéique. En effet, une étude a montré que l'actinomycine D, un inhibiteur de la synthèse d'ARNm n'a aucun effet sur la potentialisation des synapses du CA1 et du gyrus denté trois heures après la stimulation tétanique. En revanche un effet inhibiteur apparaît au bout de cinq heures (Frey et al., 1996). Cela suggère qu'il existe une modification de l'expression des gènes entre ces deux périodes, nécessaire à la formation de la mémoire à long-terme. De plus, il s'avère que

l'anisomycine ou le PD98059 qui sont des inhibiteurs de synthèse protéique, empêchent la formation des mémoires à long-terme contextuelle et élémentaire dans le contexte de peur conditionnée, mais ne perturbent pas la mémoire à court-terme (Schafe et al., 1999). Le passage de cette mémoire labile à cette mémoire stable à long-terme illustre classiquement le phénomène de consolidation mnésique.



Figure 30 : Représentation de la *Théorie de la consolidation de la mémoire de Müller et Pilzecker en 1900.* (D'après Quillfeldt, 2006)

Une fois la mémoire consolidée, celle-ci peut tout de même subir de nouvelles modifications. En effet, à chaque rappel, la mémoire repasse par un stade où elle est de nouveau labile et donc malléable. On parle alors de reconsolidation mnésique.

Dans le contexte de conditionnement de peur, l'association d'un stimulus discret, tel un son ou une lumière, au choc électrique concomitant, correspond à ce qui a été dénommée apprentissage élémentaire. Cette mémoire élémentaire peut être évaluée lorsque l'animal est introduit dans un nouvel environnement et que le stimulus discret lui est présenté. Toutefois, une association plus complexe peut également avoir lieu. En effet, l'animal va pouvoir associer non seulement le stimulus discret mais également l'environnement dans lequel il reçoit le choc électrique, en d'autres termes le contexte. Cette association est testée lorsque l'animal est réexposé à l'environnement original sans présentation de stimuli. Les réponses comportementales de peur observées reflètent alors la mémoire contextuelle formée.

L'**extinction de peur** est un phénomène utilisé en thérapie dans le contexte des troubles anxieux chez l'humain tel que le trouble de stress post-traumatique (TSPT) ou les phobies.

Il s'agit d'une forme d'apprentissage au cours de laquelle s'opère une diminution des réponses conditionnées de peur précédemment acquises consécutive à la présentation non-renforçante du SC précédemment associé avec un stimulus aversif inconditionné. Le stimulus conditionné ne représente plus une menace après avoir été associé à un évènement aversif et est

associé à un contexte particulier sécurisant (Duvarci and Pare, 2014). Cette diminution progressive de réponses conditionnées de peur correspond à l'apprentissage d'extinction.

Cet apprentissage permet la formation d'une nouvelle mémoire inhibitrice qui entre en compétition avec la mémoire initiale de peur pour contrôler les réponses comportementales (Bouton et al., 2006; Myers and Davis, 2007). Le phénomène d'extinction se caractérise par trois phénomènes majeurs :

- Les réponses de peur peuvent être réactivées après une longue période suite à l'extinction. Ce processus est appelé restitution spontanée de peur (*spontaneous fear recovery*) (Brooks and Bouton, 1993)
- les réponses de peur conditionnée peuvent être restaurées par présentation du SI seul dans le contexte où l'apprentissage d'extinction a eu lieu. C'est le rétablissement (*fear reinstatement*) (Rescorla and Heth, 1975)
- l'extinction est contexte-dépendant de telle sorte que les réponses de peur réapparaissent si le SC est présenté dans le contexte original du conditionnement qui est différent de celui où a eu lieu l'apprentissage d'extinction. Il s'agit de la réactivation de la peur (*fear renewal*) (Bouton, 2002, 2004).

Les mémoires de peur et d'extinction co-existent dans les circuits neuronaux impliqués et peuvent se manifester indépendamment. Elles font intervenir un large réseau incluant entre autres l'amygdale, le cortex préfrontal médian, et l'hippocampe (Herry et al., 2010; Maren et al., 2013; Milad and Quirk, 2012; Pape and Pare, 2010).

IV.4/ LE RÉSEAU AMYGDALIEN DANS L'APPRENTISSAGE ASSOCIATIF AVERSIF

L'amygdale établit de fortes connexions à l'intérieur et aussi entre ses différents noyaux, mais également avec d'autres régions permettant la réalisation de ses diverses fonctions, notamment son rôle dans l'apprentissage de la peur conditionnée. Elle reçoit des informations provenant d'une grande variété d'afférences, et permet de déclencher les réponses comportementales et physiologiques appropriées.

IV.4.a) Les connexions extra-amygdale

IV.4.a.i) Les afférences du complexe amygdalien

Différentes régions projettent vers l'amygdale afin de permettre la transmission des informations, notamment sensorielles sous différentes modalités (olfactives, auditives et visuelles) (LeDoux, 2007) (**Figure 31**).

Dans le contexte de peur conditionnée, plusieurs modalités sensorielles peuvent être utilisées comme SC (auditif, visuel ou olfactif) au sein des mammifères (Domjan, 2006). Le transfert des informations des stimuli discret et aversif s'opère vers l'amygdale à travers différentes voies parallèles : 1/ la voie directe sous-corticale (pré-thalamique), 2/ la voie passant par le thalamus dorsal, 3/ et celle empruntant le cortex cérébral, principalement par les aires corticales associatives (LeDoux et al., 1990a, 1990b; Linke et al., 2000; McDonald, 1998; Turner and Herkenham, 1991).

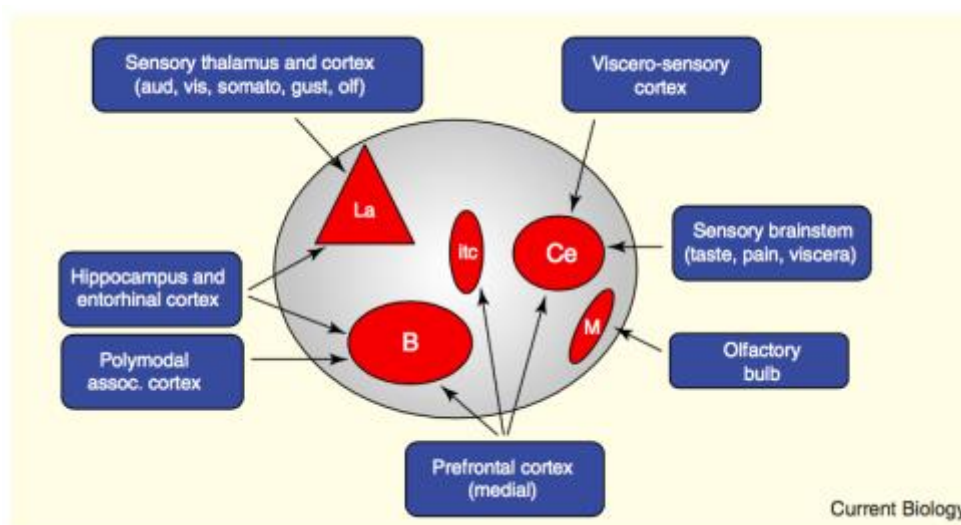


Figure 31: Schéma des afférences de l'amygdale cérébrale provenant de diverses régions cérébrales.

La : noyau latérale, B : noyau basal, itc : cellules intercalées, Ce : noyau central, et M : noyau médial. (D'après LeDoux, 2007)

Initialement, le noyau latéral de l'amygdale reçoit les informations auditives et somatosensorielles provenant des afférences thalamiques et corticales (LeDoux, 2007). Il est ainsi le site de convergence des afférences traitant les deux types de stimuli conditionné et inconditionné ce qui lui confère un rôle clé dans la plasticité synaptique (Maren, 2003; Romanski and LeDoux, 1993; Romanski et al., 1993). Il est le premier acteur intervenant dans

la transmission de l'information du stimulus discret jusqu'au noyau du CeA permettant l'expression comportementale de la peur.

Toutefois, la transmission des informations provenant des divers systèmes sensoriels n'utilise pas le noyau latéral comme seule entrée. En effet, bien que les afférences associatives corticales établissent des synapses principalement au niveau de la LA, les voies thalamiques et sous thalamiques projettent sur le CeA et le noyau basal (LeDoux et al., 1985; Linke et al., 2000; McDonald, 1998; Turner and Herkenham, 1991). De plus, une voie majeure nociceptive provenant de la moelle épinière et du noyau sensoriel trijumeau arrive au CeL par le noyau parabrachial pontique et contourne complètement le LA (Bernard and Besson, 1990; Bernard et al., 1993; Neugebauer et al., 2009).

Ainsi, il apparaît que le LA, le BA et le CeA sont nécessaires pour intégrer les informations relatives à l'association des stimuli discret et aversif au cours du conditionnement de peur.

Suite à l'entrée de ces informations et au conditionnement, une potentialisation des synapses apparaîtrait permettant aux neurones de la LA de déclencher le comportement de peur par le recrutement des cellules effectrices du CeM. En effet, des enregistrements intra- et extracellulaires ont mis en évidence une augmentation des réponses des neurones de la LA induite par la présentation du SC suite au conditionnement de peur (Collins and Paré, 2000; Goosens et al., 2003; Quirk et al., 1995; Repa et al., 2001; Rogan et al., 1997; Rosenkranz and Grace, 2002a).

Toutefois, relativement peu de neurones du LA (environ 20%) répondent fortement au SC malgré qu'un grand nombre d'entre elle reçoivent les afférences nécessaires (Han et al., 2007). Il existe ainsi des neurones particuliers possédant une forte excitabilité intrinsèque et recrutés préférentiellement pour permettre la mémoire de peur (Han et al., 2007, 2009; Kim et al., 2013). Il s'avère que des neurones exprimant le facteur de transcription CREB activé montrent une augmentation de leur excitabilité et sont préférentiellement recrutés pour permettre la formation de la trace mnésique (Han et al., 2007, 2009; Viosca et al., 2009; Zhou et al., 2009). Cependant, malgré les modifications de l'expression de CREB dans la LA, la proportion de neurones recrutés pour former la trace mnésique n'est pas modifiée (Han et al., 2007).

Cela suggère que même si la haute excitabilité intrinsèque influence les neurones principaux de la LA à devenir plastique, le nombre de cellules plastiques final est limité par les interactions synaptiques.

D'autre part, de nombreuses études ont mis en avant que la transmission GABAergique régule le conditionnement de peur et la plasticité synaptique (Ehrlich et al., 2009; Paré et al., 2003). Les neurones principaux de la LA sont sous le contrôle inhibiteur de circuits locaux impliquant notamment les cellules intercalées localisées latéralement (ICML), mais également d'autres interneurons au sein du noyau lui-même. Il a été montré que lorsque l'inhibition GABAergique est réduite, la plasticité synaptique est augmentée dans les neurones du LA (Bissière et al., 2003; Shaban et al., 2006; Shin et al., 2006; Watanabe et al., 1995). Inversement, l'activation des récepteurs GABA-A dans le LA altère l'acquisition de la peur conditionnée (Muller et al., 1997; Wilensky et al., 1999). De plus, le conditionnement de peur est associé à une réduction des niveaux de GABA dans la BLA et de l'ARNm des enzymes synthétisant le GABA (Bergado-Acosta et al., 2008; Heldt and Ressler, 2007; Pape and Stork, 2003; Stork et al., 2002).

Ces résultats suggèrent que la désinhibition des cellules principales de la LA est un facteur important dans l'acquisition du conditionnement de peur.

Les neurones GABAergiques sont des cibles importantes des neuromodulateurs comme la dopamine (DA), la noradrénaline (NE), la sérotonine, le peptide libérant la gastrine (GRP) et les endocannabinoïdes (Bissière et al., 2003; Marowsky et al., 2005; Marsicano et al., 2002; Rainnie, 1999; Shumyatsky et al., 2002; Stutzmann and LeDoux, 1999; Tully et al., 2007). Par exemple, suite à l'apprentissage aversif, des neurones de l'aire tegmentale ventrale et du locus coeruleus sont activés libérant respectivement de la DA et de la NE dans la LA (Brischoux et al., 2009; Chiang and Aston-Jones, 1993). La DA et la NE suppriment le feedforward inhibiteur des neurones principaux de la LA à travers l'inhibition à la fois des interneurons et des cellules intercalées latérales (Bissière et al., 2003; Marowsky et al., 2005; Tully et al., 2007). D'autres études allant dans le même sens ont montré que l'activation des récepteurs à la NE et à la DA dans l'amygdale est impliquée dans l'acquisition de la peur conditionnée et que la sérotonine et la GRP excitent les interneurons inhibiteurs (Bush et al., 2010; Greba et al., 2001; Guarraci et al., 1999; Nader and LeDoux, 1999; Shumyatsky et al., 2002; Stutzmann and LeDoux, 1999).

Ainsi, il semble que la DA et la NE favorisent la plasticité synaptique dans la LA par la désinhibition des cellules principales, facilitant l'acquisition de la peur conditionnée (Bissière et al., 2003; Tully et al., 2007).

Les endocannabinoïdes jouent également un rôle important dans la transmission synaptique dans la LA. Par exemple, une étude a montré qu'un agoniste des récepteurs aux cannabinoïdes entraîne une diminution des courants postsynaptiques médiés par les récepteurs

GABA_A et AMPA, conduisant à une réduction de la transmission GABAergique et glutamatergique dans la LA. Le système endocannabinoïde modulerait donc la transmission inhibitrice et excitatrice dans la LA (Azad et al., 2003).

Ainsi, les différents acteurs participant au contrôle des circuits locaux d'inhibition des neurones principaux de la LA semble influencer la plasticité synaptique permettant de moduler l'acquisition de la peur conditionnée.

IV.4.a.i) Les efférences du complexe amygdalien

Outre le fait que l'amygdale reçoit de nombreuses informations à traiter, elle intervient dans la sortie de l'expression de réponses comportementales différentes à travers la grande diversité de structures cérébrales sur lesquelles elle projette (**Figure 32**).

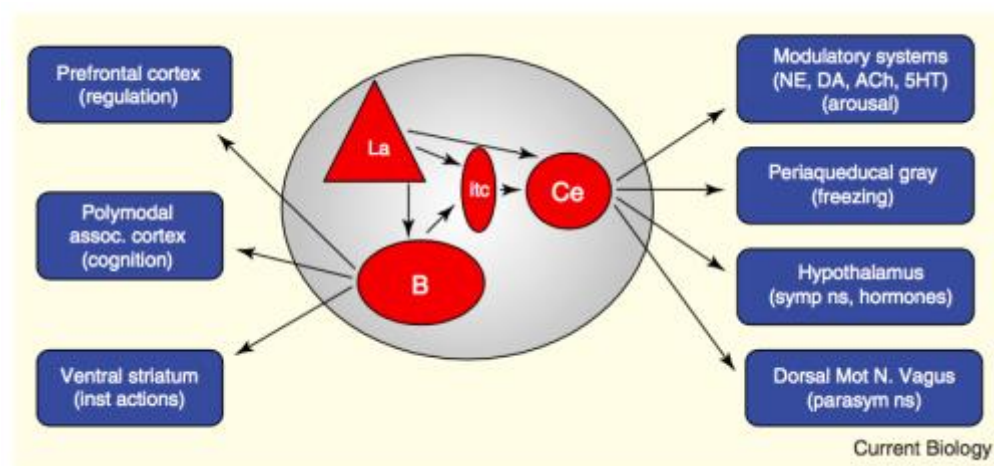


Figure 32: Schéma des efférences de l'amygdale cérébrale vers diverses régions cérébrales.

La : noyau latérale, B : noyau basal, itc : cellules intercalées, Ce : noyau central, et M : noyau médial.
(D'après LeDoux, 2007)

Dans le contexte du conditionnement de peur, les cibles de projections de l'amygdale sont diverses selon les noyaux engagés (Pitkanen, 2000).

Le noyau clé permettant l'expression comportementale de peur est le CeA. Ce dernier émet de nombreuses projections vers les noyaux du tronc cérébral qui génèrent les réponses comportementales et viscérales liées au conditionnement de peur, incluant la substance grise périaqueducule (*periaqueductal gray* - PAG), le noyau parabrachial, le noyau solitaire et le complexe vagal dorsal (DVC) (Hopkins and Holstege, 1978). De plus, il s'avère qu'une forte

corrélation existe entre la réponse des neurones du CeM consécutive à la présentation du SC et les niveaux d'expression de peur (Ciocchi et al., 2010; Duvarci et al., 2011). Par exemple, pendant l'apprentissage d'extinction, la décharge des neurones du CeM et les réponses de peur diminuent parallèlement (Duvarci et al., 2011).

Quant à la BLA, elle projette principalement vers le striatum, le thalamus et le cortex cérébral. De nombreuses régions corticales sont ciblées par l'amygdale dont notamment le cortex préfrontal médian (CPFm) qui joue un rôle essentiel dans la régulation de la peur conditionnée (Sotres-Bayon and Quirk, 2010). D'autre part, la BLA est fortement connectée de façon réciproque avec l'hippocampe ventrale. Ces connexions sont impliquées dans la peur contextuelle et l'anxiété (Felix-Ortiz et al., 2013; Narayanan et al., 2007) (cf *Chapitre IV.4.c.i*, page 96).

D'autres projections de l'amygdale interviennent dans le conditionnement de peur dont celles vers le BNST et vers divers noyaux hypothalamiques (Pitkanen, 2000; Dong et al., 2001). L'amygdale peut également influencer indirectement l'excitabilité du prosencéphale dans sa globalité via ses projections vers des groupes de cellules neuromodulatrices (libérant de l'ACh, de la NA, ou de la DA) du BF et du tronc cérébral (Steriade and Paré, 2007).

IV.4.b) Les connexions intra-amygdale

IV.4.b.i) Organisation de la connectivité des noyaux du réseau amygdalien

L'amygdale cérébrale établit des connexions relativement fortes à l'intérieur de chacun de ses noyaux mais également entre ces différents éléments afin de créer un réseau permettant la réalisation de ses fonctions.

Si l'on regarde tout d'abord les connexions intranucléaires, au sein de la BLA, les cellules principales forment de nombreuses synapses excitatrices *en passant* à l'aide de leur multiples collatérales axonales (environ 100-200/mm d'axone) (Smith and Paré, 1994). De plus, il existe une hétérogénéité spatiale des connexions formées par les cellules principales entre elle et avec les interneurones. Les cellules principales forment localement des synapses avec les interneurones à proximité, et avec d'autres cellules principales à plus grande distance (Samson and Paré, 2006; Samson et al., 2003). Cette organisation du réseau amygdalien

préserve localement des excitations abusives et permet des interactions associatives avec les cellules principales de régions plus lointaines recevant d'autres types d'informations.

Etant donné que le CeA est exclusivement GABAergique, la communication dans ce noyau est réalisée via des synapses inhibitrices (Spampanato et al., 2011). Des études de traçage ont montré que les neurones du CeL projettent vers le CeM, cependant la réciproque n'a pas été mise en évidence (Jolkkonen and Pitkänen, 1998; Petrovich and Swanson, 1997). Parmi les neurones du CeL, on distingue ceux exprimant le récepteur à l'ocytocine et la PKC δ mais pas la somatostatine et ceux n'exprimant pas le récepteur à l'ocytocine mais possédant la somatostatine (Haubensak et al., 2010; Li et al., 2013b). En effet, les neurones du CeL exprimant les récepteurs à l'ocytocine forment des synapses avec les cellules du CeM qui projettent dans le PAG alors que ceux n'exprimant pas le récepteur à l'ocytocine établissent des connexions avec les cellules du CeM projetant dans le complexe vagal dorsal (Viviani et al., 2011).

Au sein de chaque cluster de cellules intercalées, les neurones forment individuellement des synapses avec d'autres cellules intercalées, toutefois la réciprocity de ces connexions est rare (Geracitano et al., 2007, 2012). De plus, ces interactions neuronales se font préférentiellement selon la position des neurones cibles. En effet, les clusters de cellules intercalées dorso-latéralement sont connectés avec les cellules du CeL alors que ceux localisés ventro-médialement sont connectés au CeM (Royer et al., 1999, 2000).

Si l'on se penche maintenant sur les connexions établies entre les différents noyaux, on remarque que celles-ci sont nombreuses et leurs cibles diverses (**Figure 33, voies 1-11**). Au sein de la BLA, les projections sont principalement dorso-ventrales, c'est-à-dire du noyau latéral vers le noyau basal (**voie 2**) et le noyau basomédial (Brown and Schafer, 1888; Krettek and Price, 1978; Pitkänen et al., 1997; Smith and Paré, 1994). Les noyaux du complexe basolatéral projettent vers le CeA : le noyau latéral projette uniquement vers le CeL (**voie 3**) alors que la BA projette à la fois vers le CeL (**voie 11**) et le CeM (**voie 4**) (Krettek and Price, 1978; Paré et al., 1995; Pitkänen et al., 1997). Toutefois ces projections ne sont pas réciproques. Les projections du CeM s'orientent vers les neurones effecteurs de la peur du tronc cérébral et sont plus fortes que celles provenant du CeL (**voie 10**) (Hopkins and Holstege, 1978; Petrovich and Swanson, 1997). Cette connexion différentielle est essentielle dans les mécanismes intra-amygdale de la peur conditionnée (Duvarci and Pare, 2014).

Les neurones principaux de la BLA forment aussi des synapses glutamatergiques avec les cellules intercalées (Jüngling et al., 2008; Royer et al., 1999). Ces connexions se font selon l'organisation spatiale des neurones : la LA établit des connexions avec les cellules intercalées localisés dorsalement (ICM_{MD} ; **voie 5**) alors que la BA va former des contacts avec celles localisées ventralement (ICM_{MV} ; **voie 6**). Les cellules intercalées projettent ensuite vers la région du CeA adjacente à elles (**voies 7 et 8**) générant un feedforward inhibiteur (Geracitano et al., 2007; Paré and Smith, 1993b; Royer et al., 1999, 2000). Contrairement aux neurones intercalés dans la capsule interne, ceux localisés dans la capsule externe (ICM_L) ne projettent pas vers le CeA mais vers la BLA (**voie 9**) (Marowsky et al., 2005).

Les neurones principaux de la BLA influencent ainsi de deux façons les neurones du CeA : 1/ directement par leurs projections glutamatergiques, 2/ et indirectement par l'excitation des cellules intercalées qui régulent négativement les neurones du CeA.

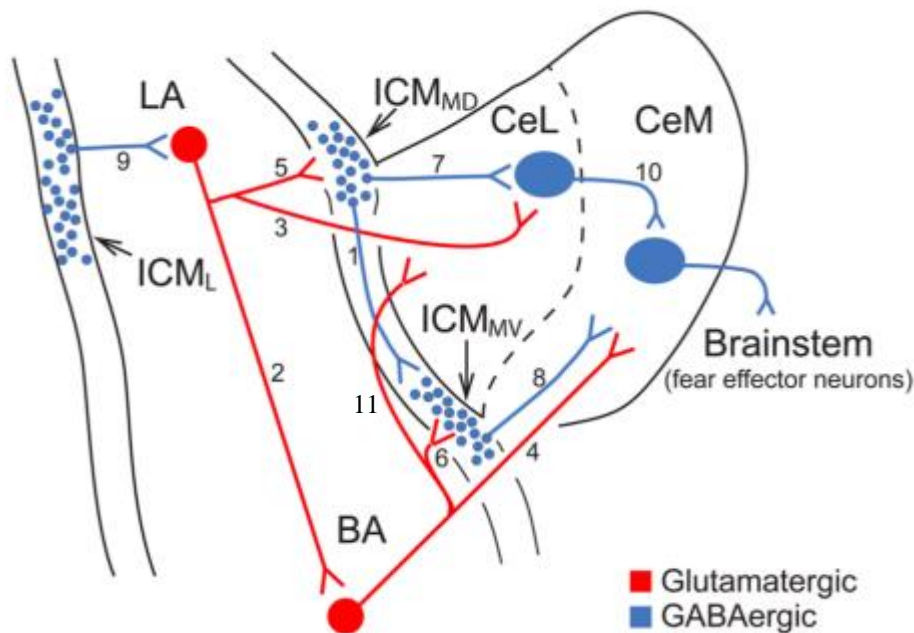


Figure 33: Représentation schématique de la connectivité établie entre les différents noyaux de l'amygdale.

Des connexions glutamatergiques (en rouge) et GABAergiques (en bleu) parcourent les noyaux de l'amygdale, préférentiellement de l'amygdale basolatérale vers le noyau central pour permettre les réponses comportementales de peur. Les voies 1 à 11 représentent chacune un type de connexion neurone-spécifique. LA : noyau latéral ; BA : noyau basal ; ICM_L : cellules intercalées latérales ; ICM_{MD} : cellules intercalées médio-dorsales ; ICM_{MV} : cellules intercalées médio-ventrales ; CeL : noyau central latérale ; CeM : noyau central médian. (D'après Pare et Duvarci 2014)

IV.4.b.ii) Le réseau amygdalien dans le contexte de peur conditionnée

Dans le cadre des mémoires aversives, il est proposé que le rappel de la peur conditionnée soit régulé par la modification de l'efficacité relative des circuits amygdaliens à travers ses voies direct et/ou indirecte (**Figure 34 A**).

➤ Implication de la voie directe glutamatergique à travers le noyau basal :

De nombreuses études se sont penchées sur l'implication du noyau basal dans la transmission des réponses provenant du noyau latéral suite à la présentation du stimulus conditionné à travers ces projections glutamatergiques.

Il a été montré que l'activation optogénétique des neurones du CeM entraîne une réponse comportementale de peur alors que leur inactivation altère cette réponse (Ciocchi et al., 2010). Des réponses excitatrices des neurones du CeM ont également été observées en réponse à la présentation du SC permettant d'attribuer un rôle aux afférences glutamatergiques provenant du noyau basal. De plus, par sa localisation, le noyau basal semble être l'intermédiaire idéal pour moduler cette fonction de transmission en recevant les efférences du noyau latéral et en projetant sur le CeM (Krettek and Price, 1978; Paré et al., 1995; Pitkänen et al., 1997; Smith and Paré, 1994).

D'autre part, des lésions du noyau basal avant le conditionnement n'entraînent aucun effet sur le conditionnement de peur (Amorapanth et al., 2000; Goosens and Maren, 2001; Nader et al., 2001). En revanche, des lésions de ce même noyau après le conditionnement abolissent les réponses de peur conditionnée (Anglada-Figueroa and Quirk, 2005).

Cela suggère que le noyau basal intervient dans la transmission des informations du SC du noyau latéral vers le noyau central. Toutefois, si le noyau basal est lésé, le conditionnement peut avoir lieu et la transmission des informations du stimulus conditionné empruntera alors une autre route pour arriver au noyau central.

Par ailleurs, les neurones du noyau basal développent des réponses au SC plus fortes après le conditionnement (Amano et al., 2011; Herry et al., 2008). Son inactivation diminue les réponses conditionnées de peur (Amano 2011).

Le dernier argument mettant en avant l'implication du noyau basal dans cette transmission est la durée des réponses de peur suite à la présentation du stimulus conditionné.

En effet alors que les réponses sont persistantes par le noyau basal celles du noyau latéral sont transitoires (Amano et al., 2011; Quirk et al., 1995; Repa et al., 2001).

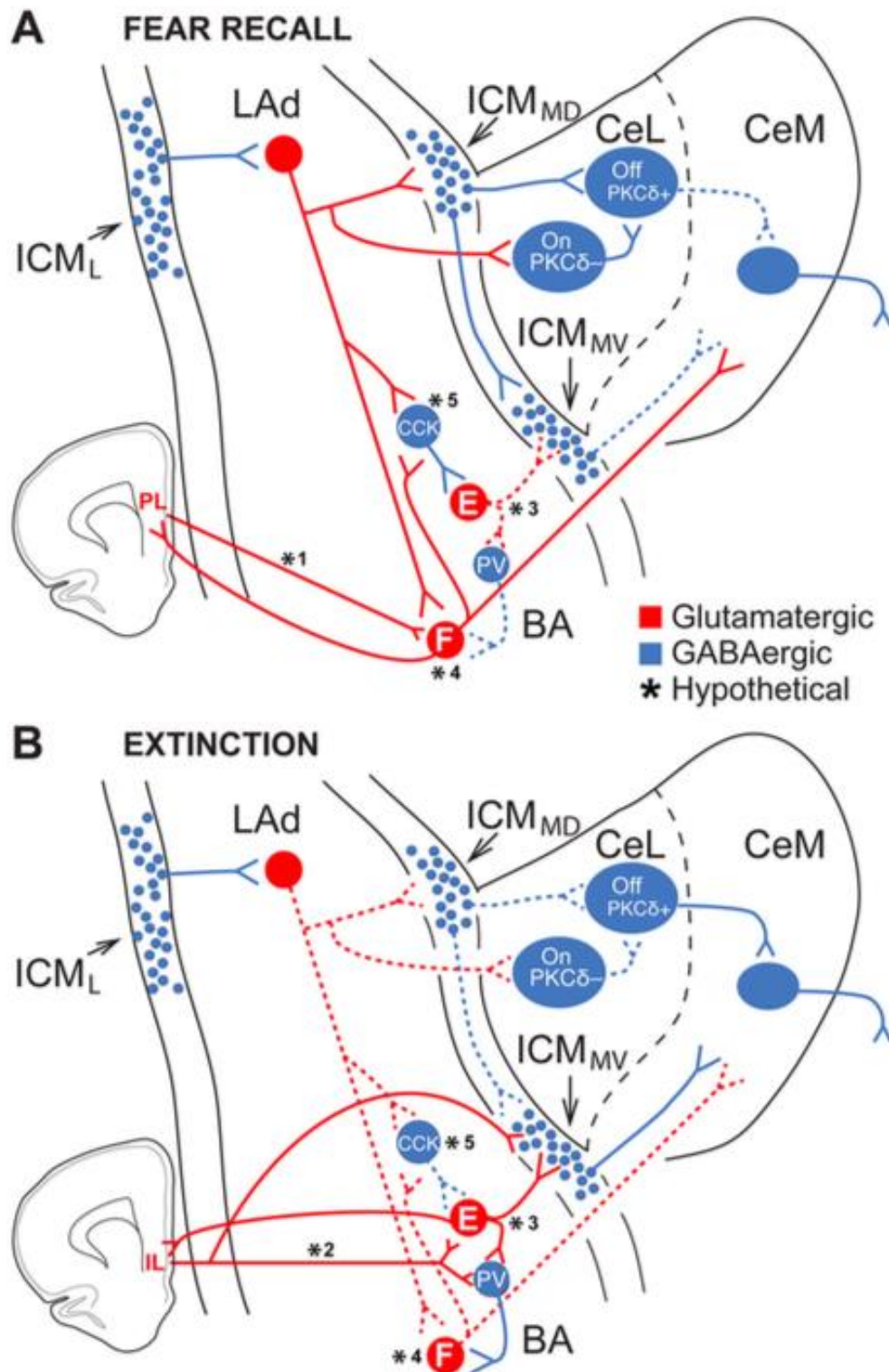
➤ Implication de la voie indirecte à travers les neurones du CeA :

Initialement, le noyau central était considéré comme une sortie passive de l'amygdale permettant l'expression de peur (Samson et al., 2005). Cependant, des études ont montré que le CeA est nécessaire à la fois à l'acquisition et à l'expression du conditionnement de peur (Goossens and Maren, 2003; Wilensky et al., 2006). En effet, le rôle des deux sous-régions du noyau central a été mis en évidence : alors que l'inactivation des neurones du CeL altèrent l'acquisition de peur conditionnée, celle des neurones du CeM perturbent l'expression de peur (Ciocchi et al., 2010).

Au sein du CeL, trois populations de neurones sont différenciées : les neurones CeL-Off exprimant la PKC δ et les récepteurs à l'ocytocine, les neurones CeL-On ne possédant ni la PKC δ ni les récepteurs à l'ocytocine, et les neurones exprimant SOM.

Une étude a mis en évidence que la libération d'ocytocine dans le CeL atténue les réponses de peur par l'activation des cellules CeL-Off suggérant une inhibition des cellules du CeM (Ciocchi et al., 2010; Haubensak et al., 2010; Knobloch et al., 2012). D'autre part, l'excitation des cellules CeL-On entraînent l'inhibition des neurones CeL-Off conduisant à la désinhibition des neurones du CeM (Ciocchi et al., 2010; Haubensak et al., 2010). Les neurones CeL-Off semblent donc inhiber directement les cellules du CeM.

L'inactivation des neurones SOM positifs du CeL perturbe l'acquisition de peur conditionnée alors que son activation optogénétique déclenche le comportement de peur. Le conditionnement potentialiserait les synapses du noyau latéral vers les neurones SOM positifs contrairement aux neurones SOM négatifs. Cela suggère une compétition entre les inhibitions mutuelles de ces deux types de sous-populations de neurones du CeL dans le conditionnement de peur (Li et al., 2013b). Toutefois, bien que les cellules SOM négatives appartiennent à la famille des cellules CeL-Off, les neurones SOM positifs n'ont pas été définis comme étant les neurones CeL-On. En effet, contrairement aux cellules CeL-On, les cellules SOM positifs ne projettent pas vers le CeM (Ciocchi et al., 2010; Haubensak et al., 2010; Li et al., 2013b).



D'autres afférences inhibitrices que celles provenant du CeL peuvent intervenir sur le CeA. En effet, l'inactivation du CeL n'affecte pas l'expression de peur (Ciocchi et al., 2010) suggérant l'implication d'autres populations neuronales pour la transmission des informations, et notamment celle des ICMs recevant des projections du complexe basolatéral. Suite à la présentation du SC, une activation glutamatergique des neurones ICM_{MD} est observée entraînant l'inhibition des cellules ICM_{MV} et des cellules CeL-Off permettant une désinhibition du CeM (**Figure 34 A**) (Duvarci and Pare, 2014). Une étude appuie cette idée en observant une augmentation de l'expression d'un gène à activation précoce (*immediate-early gene* Zif268) dans les cellules ICM_{MD} et non dans les cellules ICM_{MV} suite à la présentation du SC (Busti et al., 2011).

Ainsi, au cours du rappel, de multiples circuits parallèles de désinhibition co-existeraient dans l'amygdale et leurs interactions dynamiques détermineraient l'expression de la peur (Duvarci and Pare, 2014).

IV.4.b.iii) Le réseau amygdalien dans le contexte d'extinction de peur

Selon leur position, les neurones du noyau latéral ont des rôles différents dans l'acquisition de l'extinction. En effet, la région dorsale du noyau latéral (LAd) qui est le principal site des afférences thalamiques du SC, montre une rapide diminution des réponses au cours de l'extinction (Repa et al., 2001). La réduction rapide des réponses du LAd s'accompagne d'une dépotentialisation des afférences thalamiques (Kim et al., 2007). En revanche, les neurones de la région ventrale du noyau latéral (LAv) montre une persistance des réponses (Armony et al., 1998; Quirk et al., 1997; Repa et al., 2001).

Ainsi, même si l'apprentissage d'extinction n'efface pas les associations SC-SI, il cause une réorganisation de la mémoire de peur où les neurones de la LAv contribuent à maintenir l'association SC-SI originale.

Selon certaines études, l'inactivation de la BA perturbe l'extinction. L'apprentissage d'extinction devrait alors provoquer des modifications de la réponse des neurones de la BA (Amano et al., 2011; Herry et al., 2008; Livneh and Paz, 2012a; Sierra-Mercado et al., 2011). Ainsi, trois principaux types de neurones dans le noyau basal montrant des différences de réponses au SC ont été mis en évidence à partir d'études électrophysiologiques :

- les cellules de peur (*fear cells*) développent des réponses excitatrices au SC suite au conditionnement de peur, mais perdent ces réponses suite à l'apprentissage d'extinction. Ces cellules répondent de la même façon que les neurones du CeM pour ce qui est des réponses au SC à savoir, une diminution du niveau d'expression de la peur avec l'extinction et un retour pendant le *fear renewal*.
- les cellules d'extinction (*extinction cells*) répondent à la présentation du SC uniquement suite à l'apprentissage d'extinction,
- les neurones résistant à l'extinction (*extinction-resistant neurons*) qui répondent au SC pendant le conditionnement et continue à répondre après l'apprentissage d'extinction. Ces neurones pourraient être impliqués dans la maintenance de l'association SC-SI après l'extinction (Amano et al., 2011; Duvarci and Pare, 2014; Herry et al., 2008).

L'existence de ces neurones de peur et d'extinction suggère que différents circuits coexistent dans l'amygdale pour moduler la peur et l'extinction et switcher entre ces deux processus (Herry et al., 2008).

Des études ont montré que les niveaux d'ARNm des récepteurs GABA_A ainsi que le nombre de ces récepteurs exprimés à la surface des neurones dans la BLA augmente après un apprentissage d'extinction (Chhatwal et al., 2005a; Heldt and Ressler, 2007). Les taux d'ARNm de la GAD67 (enzyme de synthèse du GABA) augmentent aussi, alors que ceux de transporteur du GABA, GAT1 diminuent dans la BLA (Heldt and Ressler, 2007). Une autre étude a mis en évidence que des souris avec une déficience de la GAD65 montrent une altération de l'extinction (Sangha et al., 2009). De plus, la fréquence et l'amplitude des courants postsynaptiques miniatures inhibiteurs (mIPSCs) augmentent dans les neurones principaux de la BLA après l'extinction (Lin et al., 2009).

L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'extinction est associée à une augmentation de l'inhibition GABAergique dans la BLA.

L'inhibition GABAergique intra-BA au cours de l'extinction fait également intervenir le système endocannabinoïde (Lafenêtre et al., 2007; Lutz, 2007). En effet, l'apprentissage d'extinction entraîne une augmentation des niveaux d'endocannabinoïdes dans la BLA. Il a été montré que des souris montrant des déficiences pour le récepteur aux cannabinoïdes de type 1 (les souris CB1^{-/-}) présentent une résistance à l'extinction (Marsicano et al., 2002). L'administration systémique ou intra-BLA d'antagonistes du récepteur CB1 perturbe aussi

l'extinction (Chhatwal et al., 2005b; Marsicano et al., 2002; Roche et al., 2007). Il apparaît également que les endocannabinoïdes moduleraient l'extinction à travers la régulation de l'activité des kinases et phosphatases dans les structures cérébrales impliquées dans la peur conditionnée (Cannich et al., 2004). Au niveau cellulaire, les endocannabinoïdes entraînent une dépression à long terme de la transmission GABAergique par l'activation des récepteurs CB1 et diminuent l'inhibition GABAergique des neurones principaux de la BLA (Katona et al., 2001; Marsicano et al., 2002).

Ces résultats sont en désaccord avec la notion d'augmentation globale de l'inhibition GABAergique dans la BLA au cours de l'extinction. Le switch entre l'extinction et la peur semblerait alors dû à un recrutement de différents sous-population GABAergiques dans la BLA. En effet, les récepteurs CB1 sont localisés au niveau des terminaisons axonales d'une sous-population d'interneurones exprimant la cholecystokinine (CCK) (Katona et al., 2001; Omiya et al., 2015; Somogyi et al., 2004).

Cela suggère que les interneurones CCK-CB1 seraient préférentiellement connectés aux neurones d'extinction pour permettre leur désinhibition suite à l'activation des récepteurs CB1 pendant l'extinction (**Figure 34 B**).

D'autre part, une étude a mis en avant que les synapses formées par les interneurones PV positifs et CCK positifs présentent des plasticités différentielles au cours de l'extinction en fonction de leurs contacts avec les cellules de peur (*fear cells*) ou celles actives durant l'expression de la peur et de l'extinction (*extinction-resistant cells*) (**Figure 34 B**) (Trouche et al., 2013). Les interneurones PV positifs seraient activés par les afférences provenant des neurones de l'extinction afin d'inhiber les neurones de peur. Les interneurones CB1 positifs seraient quant à eux présents autour des somas des neurones de peur durant l'extinction permettant leur désinhibition afin de les maintenir actif (Trouche et al., 2013).

Le rôle des interneurones exprimant le récepteur CB1 dans les circuits d'inhibition reste donc encore mal compris et nécessiterait d'être approfondi.

Pendant l'apprentissage d'extinction, la décharge des neurones du CeM et les réponses de peur déclenchées par le SC diminuent parallèlement (Duvarci et al., 2011). Bien que l'extinction n'efface pas la première association entre les deux stimuli, cette réduction est causée par l'activation des circuits inhibiteurs qui suppriment la décharge des neurones du CeM induite par le SC et par conséquent, diminuent l'expression de peur (Duvarci and Pare, 2014).

L'existence de neurones d'extinction et de résistance à l'extinction appuie également l'idée de l'existence de circuit d'inhibition empêchant l'activation des cellules du CeM par

l'intervention des neurones de la BA (**Figure 34 B**). En effet, on observe une augmentation de l'expression de deux gènes à activation précoce (*immediate-early gene* Zif268 et *c-fos*) dans l'ICM_{MV} et non dans le ICM_{MD} (Busti et al., 2011; Knapska and Maren, 2009). L'apprentissage d'extinction entraîne une potentialisation des afférences de la BA vers l'ICM_{MV} entraînant une augmentation du feedforward inhibition des neurones du CeM (Amano et al., 2010). Cette potentialisation fait intervenir les neurones de la région infralimbique (IL) du CPFm qui montrent des décharges à haute fréquence immédiatement après l'apprentissage d'extinction (Amano et al., 2010; Burgos-Robles et al., 2007) et qui envoient des projections glutamatergiques denses aux cellules de l'ICM_{MV} (Cassell and Wright, 1986; McDonald et al., 1996).

Ainsi, au cours de l'extinction, il semble que la diminution de réponse au SC des neurones du LAd entraîne une diminution du recrutement des cellules ICM_{MD} et par conséquent une désinhibition des neurones de l'ICM_{MV}. Cette effet, couplé à la convergence des afférences de la BA et du IL sur les neurones ICM_{MV} conduit à une potentialisation des synapses. Un feedforward inhibiteur plus important s'exerce sur les neurones du CeM par les neurones ICM_{MV}, induisant une diminution de l'expression de peur (Duvarci and Pare, 2014). Toutefois, les connexions entre les neurones de peur, d'extinction et les interneurons de la BA ne sont pas encore définies ce qui laisse une part d'ombre sur les mécanismes sous-jacents des circuits inhibiteurs.

IV.4.c) Autres régions impliquées dans le réseau amygdalien

IV.4.c.i) Le réseau Amygdale-Cortex préfrontal-Hippocampe

Le conditionnement de peur est médié par un réseau large incluant l'amygdale, le CPFm et l'hippocampe (Herry et al., 2010; Maren et al., 2013; Milad and Quirk, 2012; Pape and Pare, 2010). Les différences de fonctions des circuits de peur et d'extinction précédemment décrits pourraient être partiellement dues aux projections spécifiques établis.

L'hippocampe intervient dans la mise en place de la mémoire contextuelle. De nombreuses études ont montré que des lésions de cette structure perturbe la formation de la mémoire contextuelle de peur conditionnée (par exemple McEchron et al., 1998). Il s'avère que des modifications de l'expression protéique s'opèrent dans les neurones et les oligodendrocytes du gyrus denté suite au conditionnement contextuel de peur (Houyoux et al., 2017). Des acteurs

extérieurs ont également été identifiés comme participant à la modulation de l'action de l'hippocampe dans la peur conditionnée. En effet, une étude a montré que la prise chronique et modérée d'éthanol chez les souris entraîne une augmentation de l'activité de la voie impliquant le BDNF dans l'hippocampe conduisant à une diminution de la mémoire contextuelle (Stragier et al., 2015).

Alors que l'hippocampe dorsal (HPC_D) est impliquée dans l'association et le stockage des différents stimuli olfactifs, auditifs, tactiles et visuels du contexte dans lequel a lieu le conditionnement (Goosens, 2011; Liu et al., 2012; Rudy et al., 2004), les activations de l'hippocampe ventral (HPC_V) et de la BLA semblent nécessaires à l'expression de la peur contextuelle et interviendraient dans l'anxiété (Anagnostaras et al., 2001; Muller et al., 1997; Pentkowski et al., 2006; Felix-Ortiz et al., 2013).

Des connexions directes et réciproques entre le HPC_V et la BLA ont été établies morphologiquement et fonctionnellement (Bienvenu et al., 2012; Hübner et al., 2014; Pitkänen et al., 2000). Toutefois, celles reliant le HPC_D et la BLA se réaliseraient par le recrutement d'aires parahippocampiques (McDonald and Mott, 2017).

De nombreuses études se sont intéressées au rôle de l'HPC_V dans la peur conditionnée. En effet, il a été montré que l'inactivation de l'HPC_V par un agoniste des récepteurs GABA_A, le muscimol, entraîne une diminution des niveaux de *freezing* dans le contexte de peur conditionnée ainsi qu'une facilitation de l'extinction (Sierra-Mercado et al., 2011). Cette diminution des réponses de peur conditionnée serait due à une réduction de l'excitation des neurones de la BLA par les projections de l'hippocampe ventrale. De plus, une étude a mis en évidence qu'une heure après l'apprentissage d'extinction, une augmentation des taux de BDNF est observée dans un premier temps dans le HPC_V, puis par la suite dans la BLA. L'augmentation de BDNF dans le HPC_V entraîne l'augmentation de la décharge des neurones de l'IL suggérant des connexions directes entre la région IL du CPFm et le HPC_V favorisant l'extinction de peur (Rosas-Vidal et al., 2014).

Il s'avère que des travaux ont mis en évidence que les projections vers le CPFm provenant de la BA et de l'HPC_V influencent fortement l'expression de peur et son inhibition (Herry and Johansen, 2014). Afin de mieux comprendre les connexions établies entre ces structures, une étude s'est intéressée aux effets de l'inactivation du noyau basal et de l'hippocampe ventral sur les neurones du CPFm. L'inactivation du noyau basal par le muscimol diminue les décharges spontanées des neurones excitateurs du CPFm (et notamment dans la

région prélimbique (PL) du CPFm) suite à la présentation du SC, mais n'a pas d'effet sur les interneurons inhibiteurs (Sotres-Bayon et al., 2012). A l'inverse, l'inactivation de l'hippocampe ventral n'a pas d'effet sur les neurones excitateurs, mais agit sur les décharges des interneurons inhibiteurs du PL en les diminuant spontanément (Sotres-Bayon et al., 2012). L'activité des neurones excitateurs du PL est augmentée suite à l'inactivation de l'hippocampe ventrale après présentation du son (Sotres-Bayon et al., 2012).

Ainsi, il semble que les projections des neurones de la BA font synapse avec les neurones excitateurs du PL et que les neurones de projection de l'hippocampe ventrale contactent directement les neurones inhibiteurs du PL. Toutefois, les connexions entre ces structures et notamment celles de l'hippocampe ventral avec les interneurons du CPFm ne sont pas encore bien établies.

Dans le contexte de peur conditionnée, afin de sélectionner les réponses comportementales appropriées, l'activité neuronale est modulée par différentes projections vers deux sous-régions du CPFm : 1/ le PL qui contrôle l'expression de peur, et 2/ l'IL qui régule l'inhibition de la peur et l'extinction.

Il a été montré que les neurones de peur de la BA projetant dans le PL sont actifs durant l'expression de peur, alors que les neurones d'extinctions projetant dans l'IL sont recrutés pendant l'inhibition de la peur (Senn et al., 2014). Par des approches électrophysiologiques, cette même étude a montré que l'inhibition des projections du BA vers le PL pendant l'extinction facilite l'inhibition de la peur, et que celle des neurones de la BA projetant sur l'IL pendant l'extinction favorise l'expression de la peur (Senn et al., 2014).

Une balance d'activité semble exister pour moduler les neurones projetant dans le PL et l'IL afin de déterminer l'expression et l'inhibition des comportements de peur pour promouvoir la plasticité des synapses de la BA sur les neurones du PL et de l'IL.

IV.4.c.ii) Les mécanismes préfrontaux-amygdalien de peur conditionnée

Deux principaux mécanismes coexisteraient dans les réseaux préfrontal-amygdale pour permettre l'expression du comportement de peur conditionnée :

- 1/ la synchronisation de l'activité de décharge et/ou du potentiel de champ local, et
- 2/ la formation d'assemblées neuronales synchronisées temporairement.

La synchronisation neuronale de l'activité de décharge et/ou du potentiel de champ local ainsi que l'activité oscillatoire entre les circuits du CPFm et de la BA en contact avec les neurones efférents du CeM, pourraient augmenter la force synaptique. En effet, l'oscillation coordonnée de l'activité neuronale à travers les aires cérébrales représente une forme de synchronie neuronale qui peut augmenter la force synaptique à travers l'activation coïncidente pré- et postsynaptique et la convergence simultanée de multiples afférences (Buzsáki and Draguhn, 2004; Markram et al., 1997; Pape and Pare, 2010).

La synchronie neuronale peut ainsi coordonner et augmenter l'effet des signaux afférents provenant du CPFm et renforcer la transmission des informations vers le BA puis vers le CeA pour générer les réponses de peur.

Pour illustrer ce mécanisme, une étude a effectué des analyses corrélationnelles entre des paires de neurones enregistrés dans le cortex cingulaire antérieur dorsal (dACC) chez le primate (un analogue du PL chez le rongeur) et la BA révélant une augmentation de la corrélation entre l'activité des décharges du dACC et de la BA pendant la phase d'acquisition de la tâche laissant présager une expression de peur à long terme (Livneh and Paz, 2012b).

Le deuxième mécanisme d'expression de la peur est le codage temporel qui se réfère à des groupes locaux de neurones qui peuvent coopérer et se synchroniser, formant ainsi des assemblées de cellules neuronales fonctionnelles temporaires et coordonnées en réponse au développement des oscillations neuronales (Herry and Johansen, 2014). Avec ce mécanisme, les neurones bloqués dans une des différentes phases de l'oscillation seront activés séquentiellement pour permettre l'expression de peur. Une étude a montré que le couplage des oscillations CPFm-BA serait important au cours de l'apprentissage de peur discriminant (Likhtik et al., 2014). En effet, chez des animaux entraînés à dissocier des stimuli aversif et sécurisant, les LFP du CPFm et du BA se synchronisent en ondes theta (4-12Hz). En revanche, des animaux affichant une généralisation à la peur face à un stimulus sécurisant ne montrent pas d'augmentation de la synchronisation LFP.

Une autre étude a montré l'importance de ces assemblées neuronales dans le cortex préfrontal médio-dorsal (CPFmd) dans le contrôle temporaire des comportements de peur. Il s'avère qu'au cours de l'expression du *freezing*, l'apparition des oscillations 4Hz coïncident avec l'activation d'assemblées neuronales dans la phase ascendante de ces oscillations. L'inhibition optogénétique du CPFmd pendant la phase ascendante des oscillations bloque les réponses comportementales de peur alors que l'inhibition du CPFmd dans la phase descendante favorise les comportements de peur (Dejean et al., 2016). Cela met en évidence l'importance

des oscillations dans les circuits du CPFm et de la BLA pour la sélection des comportements appropriés (Herry and Johansen, 2014).

Les assemblées cellulaires dans le CPFm sont constituées de différents type de neurones excitateurs et d'interneurones inhibiteurs (Petilla Interneuron Nomenclature Group et al., 2008). Dans l'hippocampe, les interneurones PV positifs et SOM positifs fournissent respectivement une inhibition périsomatique et dendritique aux neurones principaux et régulent différemment les séquences de décharges des neurones pyramidaux (Lovett-Barron et al., 2012). Au sein du cortex préfrontal, une étude a mis en évidence une classe de neurones préfrontaux inhibiteurs contrôlant l'activité des neurones de projections préfrontaux vers la BA au sein d'un microcircuit de désinhibition pour réguler l'expression de peur (Courtin et al., 2014). Les interneurones PV positifs sont l'élément central de ce circuit, et sont inhibés de façon phasique au cours des présentations de SC. Cette inhibition produit une désinhibition des neurones pyramidaux du CPFmd (**Figure 35**). D'autre part, l'inactivation optogénétique des interneurones préfrontaux PV positifs augmente le comportement de peur, alors que leur activation diminue ces réponses. L'inhibition des interneurones PV positifs suite à la présentation du SC est reliée à la réinitialisation des oscillations theta, un mécanisme neuronal qui synchronise les neurones de projections préfrontaux.

Les interneurones PV positifs modulent donc deux mécanismes complémentaires (désinhibition et synchronisation) pour coordonner et augmenter l'activité des neurones de projections pour permettre l'expression de peur (Courtin et al., 2014).

Ainsi, il existe des types distincts d'interneurones locaux inhibiteurs qui régulent l'activité des neurones corticaux impliqués dans le contrôle des comportements de peur par la promotion de la synchronisation neuronale (Herry and Johansen, 2014).

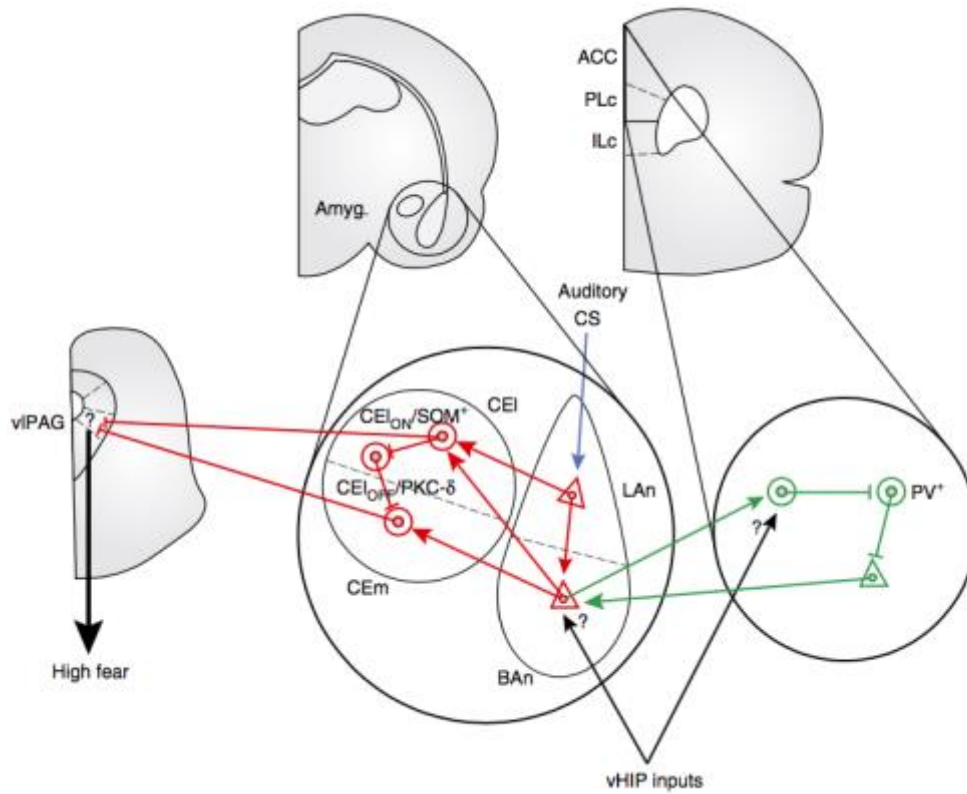


Figure 35: Schéma des populations neuronales impliquées dans la synchronisation.

Les interneurones PV+ coordonnent et augmentent l'activité des neurones principaux afin de permettre l'expression de peur par des mécanismes de désinhibition et de synchronisation neuronale. (D'après Herry et Johansen 2014).

Points Importants :

L'Amygdale et les Mémoires Aversives

- L'amygdale est constituée de 6 noyaux principaux :
 - le complexe basolatéral : le noyau latéral, le noyau basal, et le noyau basomédial
 - le noyau cortical
 - le noyau médial
 - le noyau central.

- La BLA est principalement glutamatergique alors que le CeA est exclusivement GABAergique.

- Les LA, BA et CeA sont nécessaires à l'intégration des informations relatives à l'association des stimuli SC-SI au cours de l'acquisition de la peur conditionnée.

- La désinhibition des cellules principales de la LA favorise la plasticité synaptique et l'acquisition de peur conditionnée.

- Le CeA est nécessaire à l'expression comportementale de la peur.

- Au cours du rappel et de l'extinction de la peur conditionnée, l'expression comportementale de peur est régulée par :
 - des sous-populations neuronales distinctes dans la BLA:
 - ◇ les neurones de peur
 - ◇ les neurones d'extinction
 - ◇ les circuits d'inhibition impliquant une grande diversité d'interneurones
 - des régions cérébrales appartenant au réseau amygdalien de la peur :
 - ◇ la région infralimbique du CPFm, qui favorise l'extinction de la peur
 - ◇ la région prélimbique du CPFm, qui favorise l'expression de peur
 - ◇ l'HPC_V, qui module ces processus.

- Deux principaux mécanismes coexisteraient pour permettre l'expression du comportement de peur conditionnée :
 - la synchronisation de l'activité de décharge et/ou du potentiel de champ local,
 - et la formation d'assemblées neuronales synchronisées temporairement.

V/ LE TROUBLE DE STRESS POST-TRAUMATIQUE (TSPT)

V.1/ QU'EST-CE QUE LE TROUBLE DE STRESS POST-TRAUMATIQUE ?

Les troubles de types anxieux et en particulier les troubles de régulation de la peur tel que les phobies, les troubles paniques et le trouble de stress post-traumatique (TSPT) se caractérisent par un symptôme majeur, la sur-généralisation de la peur.

D'un point de vue sociétal, la peur irrationnelle est un obstacle majeur au succès, à la productivité et provoque de dramatiques effets sur la qualité de vie des individus en souffrant. Bien que l'apprentissage de la peur soit un mécanisme de réponse avantageux d'un point de vue évolutif, lorsque la peur se généralise et est sous perte de contrôle, ce mécanisme devient improductif et dangereux (Mahan and Ressler, 2012; Parsons and Ressler, 2013).

D'après le DSM V, le TSPT est un trouble anxieux qui peut se développer après une expérience traumatisante comme des violences domestiques, des désastres naturels ou des traumatismes liés à la guerre. Il se manifeste lorsque la peur apprise due à un événement traumatisant se généralise à des situations qui devrait normalement être considéré comme sécurisantes entraînant des comportements non appropriés.

Trois types de symptômes caractérisent le TSPT : 1/ la reviviscence, 2/ l'évitement, et 3/ l'hypervigilance.

Le symptôme de reviviscence comprend les flashbacks, les cauchemars et les pensées effrayantes en rapport avec le traumatisme, qui peuvent s'accompagner de symptômes physiques tels que des maux de têtes, des douleurs et autres symptômes de somatisation.

Celui d'évitement inclut le fait d'éviter de se rappeler de l'évènement traumatique et de se sentir émotionnellement paralysé, le développement de pertes d'intérêt pour des activités autrefois considérées comme plaisantes et des déficits de mémoire et d'apprentissage. Ces symptômes peuvent entraîner de profonds changements dans la routine des personnes atteintes.

Enfin, les symptômes d'hypervigilance se manifestent par le fait d'être facilement surpris, se sentir tendu, avoir des difficultés à dormir et/ou avoir des excès de colère.

Les souvenirs de l'évènement traumatique déclenchent généralement les symptômes de reviviscence et d'évitement, alors que les symptômes d'hypervigilance semblent présent de façon continuel (Disorders. American Psychiatric Association, 1994; Davidson et al., 2004;

Gillespie et al., 2009; Hoge et al., 2007; Milliken et al., 2007; Wilcox et al., 2009).

Il existe une variabilité dans la prévalence et la sévérité du TSPT (Milliken et al., 2007). En effet, 5 à 30 % des victimes de traumatisme développent le TSPT, alors que d'autres personnes ayant subis la même expérience apparaissent résilients et ne montrent aucun symptôme (Davidson et al., 2004; Gillespie et al., 2009; Milliken et al., 2007). D'autre part, les personnes atteintes de TSPT présentent de larges variations d'intensité de leurs symptômes et du type de symptômes (Davidson et al., 2004; Dickie et al., 2008; Gillespie et al., 2009; Hoge et al., 2007; Lanius et al., 2006; Milliken et al., 2007; Wilcox et al., 2009). En effet, il apparaît que le traumatisme est nécessaire mais non suffisant pour le déclenchement du TSPT. Une grande variété de facteurs influence le risque de développer un TSPT tel que les prédispositions génétiques, l'environnement social et les expériences personnelles durant l'enfance (Binder et al., 2008; Bradley et al., 2008; Green et al., 2010; Jovanovic and Ressler, 2010).

La comorbidité du TSPT avec d'autres troubles psychiatriques tels que la dépression, les addictions et autres troubles anxieux perturbe et complique le traitement de ces pathologies (MD et al., 2013; Nickerson et al., 2017; Vujanovic and Schnurr, 2017).

L'étude de la résilience chez certains individus à travers ces différents facteurs pourraient permettre de cibler de nouveaux traitements et développer la prévention du TSPT chez les victimes de traumatisme prédisposées à développer ce genre de trouble.

V.2/ LE TSPT DANS LE RÉSEAU AMYGDALIEN

Le TSPT implique de nombreuses structures cérébrales appartenant au système limbique chez les humains et les animaux (Heimer and Van Hoesen, 2006), et notamment celles présentées dans le cadre de l'étude de la mémoire émotionnelle : l'amygdale, l'hippocampe et le cortex préfrontal.

Les sujets atteints de TSPT ne répondent pas de la même façon au conditionnement de peur que les victimes de traumatismes sans TSPT. En effet, ils présentent une augmentation de la sensibilisation au stress (Ehlers et al., 2010; Griffin, 2008; McLaughlin et al., 2010), une sur-généralisation des associations de peur (Pole et al., 2009; Suendermann et al., 2010), une altération de l'extinction des associations SC-SI et une incapacité à éteindre les mémoires

aversives (Blecher et al., 2007; Milad et al., 2008; Wessa and Flor, 2007). Ces réponses altérées de peur pourraient être expliquées par des souvenirs intrusifs déclenchant les symptômes du TSPT (Jovanovic et al., 2009; Yehuda and LeDoux, 2007). Ils montrent également une réduction de l'activité du cortex préfrontal et de l'hippocampe, résultant probablement d'une hyper-réponse de l'amygdale au stimulus de peur (Etkin and Wager, 2007).

Étant donné que le circuit neuronal est conservé au cours de l'évolution et présent chez de nombreux vertébrés, l'étude de la peur conditionnée peut être utilisée afin de mieux comprendre les réponses de peur associées au TSPT (Belzung and Philippot, 2007; Lang et al., 2000) chez d'autres modèles animaux.

La voie impliquant un facteur neurotrophique, le BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) associé à son récepteur à la tyrosine kinase B, TrkB est un exemple de système intervenant dans les troubles anxieux chez l'Homme et le modèle de peur conditionnée chez les rongeurs, ainsi que dans la plasticité synaptique. Des études en neuro-imagerie humaine et sur des modèles animaux suggèrent que les mécanismes du TSPT seraient liés à une plasticité synaptique aberrante. Cela fait de la voie impliquant le BDNF une cible pour l'étude du TSPT (Francati et al., 2007; Lanius et al., 2006; Pape and Pare, 2010).

Chez l'Homme, il existerait un lien entre le polymorphisme d'un seul nucléotide au sein du gène codant le BDNF transformant une valine en méthionine en position 66 (Val66Met) et des désordres psychiatriques tels que la dépression et la schizophrénie (Gonul et al., 2011; Zhang et al., 2006). Cette mutation altère la stabilité et la libération du BDNF (Egan et al., 2003) entraînant une perturbation de son signal, mais également des fonctions mnésiques (Egan et al., 2003; Gonul et al., 2011; van Wingen et al., 2010). Cette mutation du BDNF (Met/Met) entraîne une résistance à l'extinction associée à une augmentation de l'activité de l'amygdale et du CPFm au cours de la formation de la mémoire (Hajcak et al., 2009; Lonsdorf et al., 2010; Soliman et al., 2010; van Wingen et al., 2010)

La mutation humanisée du BDNF chez la souris knock-in entraîne une altération de la plasticité synaptique dépendant du récepteur NMDA dans l'hippocampe (Ninan et al., 2010). Des études électrophysiologiques ont également montré que le seuil d'induction de la LTP dans les neurones principaux de l'amygdale dépend du niveau de dopamine dans le milieu extracellulaire et de l'activation synergique des récepteurs post-synaptiques D1 et TrkB (Ou and Gean, 2006). Ces résultats suggèrent que le BDNF aurait un rôle dans la formation de la LTP dans les structures clés impliquées dans le TSPT.

D'autre part, cette mutation entraîne une augmentation de l'anxiété, une résistance à l'extinction après le conditionnement de peur corrélée à l'altération de l'activation de l'amygdale, du CPF et de l'hippocampe (Soliman et al., 2010; Yu et al., 2009; Chen et al., 2006; Li et al., 2010). De plus, l'inhibition du signal du BDNF entraîne une déficience dans l'acquisition et la consolidation de la peur conditionnée (Rattiner et al., 2004) et dans la consolidation de l'extinction (Chhatwal et al., 2006). Les souris hétérozygotes pour la mutation du gène codant le BDNF (les souris BDNF^{+/-}) présentent une déficience du conditionnement de peur contextuelle. Un sauvetage partiel de l'expression contextuelle de peur est réalisé par l'infusion de BDNF par canule dans l'hippocampe (Liu et al., 2004).

Les souris n'exprimant plus le BDNF spécifiquement dans l'hippocampe ne montrent pas de perturbation de l'acquisition de peur, cependant une diminution de l'extinction dans le conditionnement de peur est observée (Heldt et al., 2007). La plasticité hippocampique est donc nécessaire pour une extinction contexte-dépendant.

Des délétions de BDNF dans le PL entraînent une altération de la consolidation de la peur acquise mais pas de l'extinction (Choi et al., 2010a). Par ailleurs, l'infusion de BDNF dans l'IL entraîne une diminution de l'expression de peur (Peters et al., 2010). Des rats avec une extinction altérée montrent moins de BDNF dans l'IL et l'infusion de BDNF dans l'IL inhibe le processus d'extinction. Le BDNF a des rôles différents dans le PL et l'IL. En effet, le BDNF est nécessaire dans le PL pour la formation de la mémoire de peur et son expression, alors que dans l'IL, il est nécessaire à l'inhibition ou à l'extinction de la peur (Mahan and Ressler, 2012).

Le BDNF semble donc jouer un rôle dans les processus de peur et d'extinction à travers sa présence dans l'amygdale, le CPF et l'hippocampe, suggérant une implication dans le TSPT.

Chez le rongeur, d'autres modèles sont plus communément utilisés pour étudier le TSPT. Ils sont basés sur des procédures de stress. Les trois types principaux sont : 1) le stress psychosocial par la présence du prédateur, basé sur la menace de survie (Park et al., 2001; Zoladz et al., 2012), 2) le stress lié à l'odeur du prédateur (Cohen et al., 2012), 3) un stress prolongé unique (Liberzon et al., 1997).

D'autres modèles existent avec notamment les paradigmes empêchant l'évitement du choc électrique (Louvar et al., 2005; Maier, 2001), les traumatismes de noyade (Richter-Levin, 1998), et la peur conditionnée.

En effet, le conditionnement de peur permet d'étudier les bases neurales de l'apprentissage et de la mémoire émotionnelle associative afin de mieux comprendre ses dysfonctionnements dans le cadre du TSPT. Dans ce modèle, les animaux montrent de fortes

réponses de peur au SC et au contexte du conditionnement, une généralisation des réponses de peur à des stimuli neutres, ou bien restreintes au SC, une sensibilisation de la réponse de peur, et un déficit d'extinction (Kohda et al., 2007; Pitman et al., 2012; Wang et al., 2008). L'ensemble de ces comportements se caractérisent par des réponses de peur fortes et persistante, et correspondrait ainsi au versant hypermnésique du TSPT.

Pour rappel, d'après le DSM-IV et le DSM-V, les mémoires associées au TSPT se caractérisent par deux phénomènes principaux : 1) une hypermnésie par la reviviscence des événements traumatiques, avec notamment la persistance des souvenirs intrusifs, et 2) une amnésie de certains éléments clés appartenant au contexte traumatique, associée au processus d'évitement.

L'hypermnésie due au TSPT est une mémoire de peur inadaptée et décontextualisée. Les réponses de peur sont déclenchées suite à la présentation de stimuli discrets non prédictif d'un stimulus aversif dans des contextes non menaçants. Elle s'accompagne d'une distorsion dissociative de la perception du temps et de l'espace dans laquelle a eu lieu le traumatisme (Brewin, 2001; Ehlers and Clark, 2000). L'amnésie quant à elle, correspond à un déficit de contextualisation, et est associée au déclenchement de réponses de peur suite à la présentation d'éléments non prédictifs du SI dans l'environnement traumatique (Brewin and Holmes, 2003; Kolk, 1994; Myers, 1915).

Tout comme l'ensemble des autres modèles du TSPT, la composante amnésique dans la peur conditionnée reste peu explorée (Desmedt et al., 2015). Pour y remédier, un nouveau modèle de TSPT a alors été proposé (Kaouane et al., 2012).

Au cours du conditionnement de peur, un stimulus discret non associé au SI de sorte qu'il ne soit pas prédictif de celui-ci est présenté. L'élément qui sera alors prédictif du SI est l'environnement dans lequel aura lieu la délivrance du choc.

A ce paradigme est ajoutée une injection de corticostérone (CORT) dans l'hippocampe après le conditionnement. La CORT est la principale hormone de stress chez les rongeurs favorisant la consolidation des mémoires adaptatives de peur, ou perturbant la fonction de l'hippocampe dans la mémoire contextuelle en fonction de l'intensité du stress. En effet, lorsque le stress est faible (intensité faible du choc électrique), la CORT entraînent des réponses conditionnées de peur dans le contexte du conditionnement. En revanche, lorsque le stress est important (intensité forte du choc électrique), on observe l'apparition d'une mémoire de type-TSPT avec une réponse de peur au stimulus discret non prédictif d'une menace et une diminution de la réponse au contexte du conditionnement. La CORT perturbe alors l'activité neuronale du circuit hippocampo-amygdalien (Desmedt et al., 2015; Kaouane et al., 2012).

Dans ce dernier cas, on remarque que l'animal présente une amnésie contextuelle et réagit à des éléments du contexte traumatique non associé directement à l'évènement traumatisant, à savoir le choc électrique.

V.3/ LES TRAITEMENTS DU TSPT

Les traitements du TSPT se font essentiellement à travers deux voies thérapeutiques : 1/ la psychothérapie par la réexposition, et 2/ des traitements pharmacologiques.

➤ Le traitement psychologique par la réexposition :

Une des stratégies de traitement les plus efficaces pour les troubles relatifs à la peur est la thérapie d'exposition au cours de laquelle l'objet, le contexte ou la mémoire véhiculant la valence émotionnelle de peur est présentée de façon répétée ou rappelée jusqu'à ce que la peur soit inhibée. Bien que la psychothérapie soit un traitement très souvent prescrit et efficace, les mécanismes sous-jacents sont encore mal compris (Bowers and Ressler, 2015).

➤ Les traitements pharmacologiques :

Le développement de la D-cycloserine (DCS), un agoniste partiel du NMDA est utilisé pour moduler la signalisation glutamatergique. La DCS a été montré comme facilitant l'apprentissage d'extinction chez les animaux et les humains. Il renverserait la réduction de récepteurs AMPA qui s'observe normalement à la synapse dans l'amygdale latérale après l'apprentissage de la peur (Mokin et al., 2007). Il est utilisé dans beaucoup de thérapies comportementales pour une grande variété de troubles de type anxieux comme les troubles compulsifs obsessionnels. Les effets du DCS comme traitement pour le TSPT doivent être cependant poursuivis.

Les NT jouent un rôle important dans la modulation de la plasticité synaptique et du conditionnement de peur ce qui en font des cibles incontournables pour le traitement du TSPT (Mahan and Ressler, 2012):

- Les antidépresseurs sont les traitements pharmacologiques les plus courants pour le TSPT. Ils peuvent être utilisés seuls ou associés à une psychothérapie (Choi et al., 2010b; Hetrick et al., 2010). Les résultats de l'utilisation seul des antidépresseurs sont décevants. On ne peut pas

conclure pour l'association avec la psychothérapie car il n'y a pas assez d'études à ce jour (Choi et al., 2010b; Hetrick et al., 2010). Deux études relatives aux processus aversifs suggèrent que l'antidépresseur fluoxétine (SSRI) augmente la plasticité synaptique et l'extinction de peur à travers le BDNF dans l'amygdale et l'hippocampe de la souris (Karpova et al., 2011). La deuxième étude montre que les souris avec la mutation (Met/Met) du BDNF ont des déficiences d'augmentation de la plasticité synaptique de l'hippocampe suite à la prise de fluoxétine (Bath et al., 2012).

- La seconde classe d'agents utilisés pour traiter ces troubles est celle des benzodiazepines (par exemple clonazepam, alprazolam ou lorazepam) qui agissent en activant l'activité des récepteurs GABA_A. En effet, l'augmentation de la transmission inhibitrice dans l'amygdale et le BNST montre une diminution des réponses de peur. Toutefois, tout comme les antidépresseurs, leur action est limitée et peuvent entraîner une tolérance potentielle et une prise abusive (Parsons and Ressler, 2013).

D'autre part, un autre agent est capable de moduler l'action des récepteurs GABA_A, l'allopregnanolone (nommé ALLO). En effet, un analogue de l'allopregnanolone serait une alternative thérapeutique aux traitements utilisant les antidépresseurs pour le TSPT. Certaines formes de TSPT entraînent un changement des sous unités du récepteur au GABA_A ce qui peut entraîner une résistance aux benzodiazépines. D'autre part le TSPT se caractérise par une diminution du niveau d'ALLO. Une étude a montré que l'augmentation des niveaux d'ALLO permettrait de réduire les comportements de type TSPT chez des souris (Pinna and Rasmusson, 2014).

- Le système endocannabinoïde est impliqué dans l'anxiété et les processus d'extinction de peur conditionnée. Des résultats ont montré des interactions entre les récepteurs au CB1 et la voie BDNF/TrkB. En effet, il a été suggéré que les endocannabinoïdes sont libérés en tant que messagers rétrogrades induits par l'activation post-synaptique des TrkB (Lemtiri-Chlieh and Levine, 2010). D'autre part, l'incubation de BDNF augmente l'expression du récepteur au CB1 et une augmentation de la sensibilité des récepteurs CB1 aux endocannabinoïdes agonistes dans des cultures de cellules cérébelleuses (Maison et al., 2009). Toutefois, les études réalisées in vivo sont sommaires. En effet, une étude faite sur des souris-KO pour le récepteur CB1 montre une diminution du niveau basal de BDNF dans l'hippocampe (Aso et al., 2008). Cela suggère que des interactions existent et pourrait être importantes dans les processus de conditionnement de peur (Andero and Ressler, 2012).

La combinaison de ces deux types de traitements est une voie thérapeutique supplémentaire du TSPT. En effet, l'utilisation de la thérapie comportementale peut être couplée à de nouveaux traitements pharmacologiques tel que le propranolol. Cette méthode consiste à modifier la mémoire associée aux événements traumatiques au cours de sa reconsolidation par l'administration de composés pharmacologiques. En effet, suite au rappel des souvenirs traumatiques lors de la thérapie d'exposition, la mémoire de ces événements entre dans une phase malléable qui peut être modulée par des agents chimiques. Le propranolol est un de ces agents capable de diminuer les réponses émotionnelles associées aux traumatismes. Ainsi, les patients souffrant de TSPT présenteraient une diminution de leurs comportements de peur au cours du traitement (Gardner and Griffiths, 2014).

Points Importants :

Le Trouble de Stress Post-Traumatique (TSPT)

- Les trois principaux symptômes du TSPT sont :
 - la reviviscence
 - l'évitement
 - et l'hypervigilance.
- Le traumatisme est nécessaire mais non suffisant au déclenchement du TSPT qui fait intervenir d'autres facteurs tels que :
 - les prédispositions génétiques
 - l'environnement social
 - les expériences personnelles durant l'enfance
 - la comorbidité avec d'autres troubles psychiatriques.
- Chez l'Homme et la souris, la mutation (pVal66Met) du gène codant le BDNF entraîne une résistance à l'extinction et altère l'activité de l'amygdale, du CPF et de l'hippocampe, suggérant un rôle dans le TSPT.
- Les modèles animaux de TSPT :
 - sont basés sur des procédures de stress
 - étudient principalement l'hypermnésie associée aux comportements de peur
 - évoluent avec l'apparition de nouveaux paradigmes étudiant l'amnésie observée dans le TSPT.
- Les traitements thérapeutiques sont de nature :
 - psychologique par la ré-exposition
 - pharmacologique par l'administration de D-cyclosérine, d'antidépresseurs ou de benzodiazépines
 - mixte avec l'association d'une thérapie comportementale à un traitement pharmacologique tel que le propranolol.

PROBLÉMATIQUE

Le trouble de stress post-traumatique (TSPT) est un trouble de type anxieux se déclenchant généralement suite à une expérience traumatisante. Il se caractérise par une sur-généralisation de la peur et une incapacité à éteindre les mémoires aversives (Blechert et al., 2007; Milad et al., 2008; Wessa and Flor, 2007; Pole et al., 2009; Suendermann et al., 2010). Des structures cérébrales telles que le cortex préfrontal, l'hippocampe ou encore l'amygdale, appartenant au réseau impliqué dans l'apprentissage et les mémoires émotionnelles voient leur fonctionnement particulièrement altéré dans le TSPT (Etkin and Wager, 2007). Etant donné que ce circuit est extrêmement bien conservé au cours de l'évolution chez les vertébrés, l'étude de la mise en place et du maintien des mémoires émotionnelles chez des modèles murins, nous permet de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents mis en jeu dans ce trouble anxieux (Belzung and Philippot, 2007; Lang et al., 2000).

Chez le rongeur, la peur conditionnée est étudiée à l'aide d'un conditionnement de type pavlovien au cours duquel un stimulus neutre (SN) généralement un signal sonore ou lumineux, va être associé à un stimulus aversif (inconditionné, SI) sous forme de choc électrique. Suite à cette association, le SN devient un stimulus conditionné (SC) capable de déclencher une réponse de peur dite conditionnée. L'association SC-SI est présentée comme étant dépendante de l'amygdale, alors que l'association plus complexe au contexte nécessite le recrutement supplémentaire de l'hippocampe. Cela permet de considérer et d'intégrer l'ensemble des phénomènes apparaissant au cours de la peur conditionnée au sein d'un réseau riche et complexe.

Dans l'amygdale, le complexe basolatéral est principalement glutamatergique, alors que le noyau central est exclusivement GABAergique (Spampanato et al., 2011). Notre équipe a identifié une forte expression du transporteur vésiculaire du glutamate VGLUT3 dans l'amygdale basolatérale (Herzog et al., 2004). Ce transporteur permet comme tous les transporteurs vésiculaires l'internalisation dans les VS du NT, ici le glutamate. Il existe trois types de VGLUTs. VGLUT1 (principalement cortical) et VGLUT2 (plutôt sous cortical) définissent les neurones glutamatergiques. En revanche, le troisième transporteur identifié, VGLUT3 est atypique de par sa distribution et ses fonctions. En effet, il est présent dans des sous-populations neuronales qui utilisent un autre NT principal que le glutamate tel que les interneurones cholinergiques du striatum, certains interneurones GABAergiques du cortex et de l'hippocampe et des neurones sérotoninergiques du raphé (Gras et al., 2002). Au sein de ces neurones, VGLUT3 permet d'accumuler du glutamate dans les VS ce qui potentialise le

chargement du NT principal dans ces vésicules. Ce phénomène est appelé synergie vésiculaire (El Mestikawy et al., 2011).

Mon travail de thèse a consisté dans un premier temps à réaliser la caractérisation anatomique de VGLUT3 dans l'amygdale basolatérale à travers la détermination de la nature des neurones et des terminaisons VGLUT3 positives. Une fois l'identification des différentes populations neuronales exprimant VGLUT3 réalisée, je me suis attelée à identifier le rôle de VGLUT3 dans les mémoires aversives associées à la peur conditionnée. Pour ce faire, j'ai couplé des approches génétiques à des stratégies virales afin d'invalider VGLUT3 spécifiquement dans certaines régions.

Ce travail nous permettra de mieux comprendre le fonctionnement et le rôle de VGLUT3 dans le SNC, la genèse et le maintien des mémoires émotionnelles et d'explorer son éventuelle implication dans des troubles de l'anxiété tel le trouble de stress post-traumatique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES GÉNÉRALES

I/ ANIMAUX

L'ensemble des expériences menées dans ce projet et l'utilisation des souris sont conformes à la Directive du conseil des communautés européennes pour la protection et l'usage des animaux de laboratoires (86/809/EEC) avec l'accord du Ministère de l'Agriculture et de la Forêt, service vétérinaire de la santé et de la protection animale (autorisation #01482.01 du comité d'éthique Darwin #5). Tous les efforts ont été réalisés afin de réduire le nombre d'animaux utilisés dans cette étude et de permettre leur bien-être. L'ensemble des souris utilisées pour ce projet sont stabulées dans une pièce à température et hygrométrie contrôlée (21°C +/-2°C ; 40% d'humidité) avec un cycle jour/nuit de 12/12h (7h30-19h30). La nourriture et l'eau sont fournies *ad libitum*.

L'ensemble des expériences comportementales, des quantifications et des analyses a été fait à l'aveugle. Les animaux sont exclus des résultats expérimentaux seulement s'ils sont détectés par le test outlier (Grubb's test-GraphPad Prism Software, La Jolla, CA, USA).

II/ LES DIFFÉRENTES LIGNÉES GÉNÉTIQUES

II.1/ LA LIGNÉE VGLUT3 ^{-/-}

Les souris VGLUT3 ^{-/-} présentant une inactivation constitutive de VGLUT3 ont été générées par l'Institut Clinique de la Souris (Illkirch, France, [http:// www-mci.u-strasbg.fr/](http://www-mci.u-strasbg.fr/)) par recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires (129/Sv). L'exon 2 du gène Vglut3 est remplacé par une cassette résistante à la néomycine flanquée Frt (NEO) qui empêche la transcription du gène codant VGLUT3 (Gras, 2008). Ces souris ont été backcrossées sur 10 générations avec des souris C57BL6/N.

Les souris sont génotypées par l'analyse PCR de la taille de séquence d'ADN avec les primers de PCR suivants :

Bande	Taille	Séquence
+/+	278 bp	(P1) 5'-GTG TGA CAT GAA GCC TGG ACT GTT C-3' (P3) 5'-AGC AGA CTG AAG CGT CTC CAT GGT G-3'
-/-	604bp	(P2) 5'-GAA GGG TGA GAA CAG AGT ACC TAC-3' (P3) 5'-AGC AGA CTG AAG CGT CTC CAT GGT G-3'

II.2/ LA LIGNÉE VGLUT3^{flox/flox}

Les souris VGLUT3^{flox/flox} ont été générées par l'Institut Clinique de la souris (ICS). La séquence ciblée est l'exon 2 du gène codant VGLUT3. Celle-ci est délimitée par des sites LoxP qui en présence d'un enzyme particulier, la CRE recombinase permettent l'excision de la séquence ciblée (**Figure 36**). Ainsi, le système CRE-LOX permet de réaliser une inactivation conditionnelle inductible ciblée du gène d'intérêt codant VGLUT3 empêchant ainsi la transcription de l'ARNm fonctionnel et par conséquent la traduction de la protéine VGLUT3 fonctionnelle.

La cassette FRT-Neo-FRT contient la néomycine. Elle est utilisée pour sélectionner les plasmides bactériens ayant intégré avec succès les sites LoxP.

Les souris sont génotypées par l'analyse PCR de la taille de séquence d'ADN avec les primers de PCR suivants :

- (cP1) 5'-TTGTGAAAAAGCAAACAGAGCCATTC-3' et
- (cP2) 5'-TGTCTGAGCCATCACTTTCTCTGGAAA-3'.

L'allèle mutant et l'allèle sauvage (+/+) donnent respectivement des bandes à 383bp et 277bp.

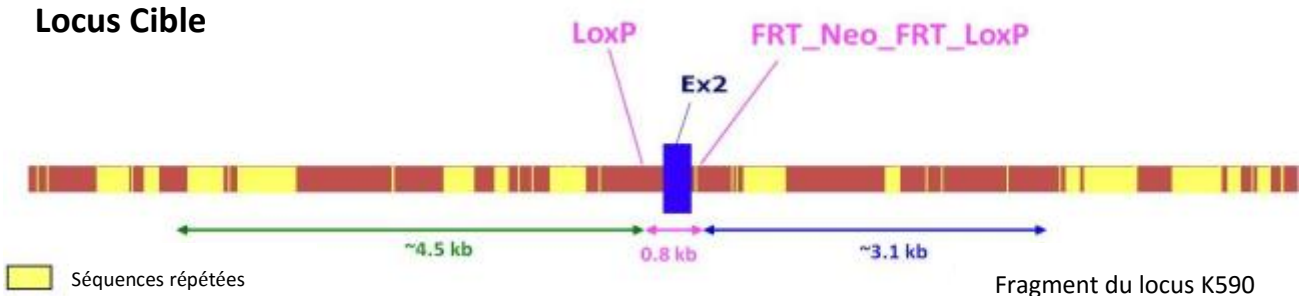


Figure 36 : Locus ciblé et encadré par les sites LoxP sur le gène VGlut3.

II.3/ LES DOUBLES MUTANTS : LES LIGNÉES VGLUT3^{flox-VIAATCRE}, VGLUT3^{flox-SERTCRE} et VGLUT3^{flox-ChATCRE}

Les souris VGLUT3^{flox/flox} (C57BL/6N) sont croisées avec des souris VIAAT-CRE (C57BL/6J / Slc32a1^{tm2(cre)Low1} / Jax stock 016962, the Jackson Laboratory), SERT-CRE (précédemment décrit dans Zhuang et al., 2005, provenant de la zone EOPS du CDTA, CNRS, Orléans) ou bien ChAT-CRE (C57BL/6N, B6;129S6-Chat^{tm2(cre)Low1} / Jax stock 006410, the Jackson Laboratory) afin de générer les élevages des souris VGLUT3^{flox-VIAATCRE}, VGLUT3

floX-SERTCRE et $\text{VGLUT3}^{\text{floX-ChATCRE}}$. Ces souris présentent une inactivation constitutive de VGLUT3 respectivement dans les neurones GABAergiques, serotoninergiques et cholinergiques.

Les souris sont génotypées par l'analyse PCR de la taille de séquence d'ADN avec les primers de PCR utilisés pour les souris $\text{VGLUT3}^{\text{floX/floX}}$ et les primers suivants :

Lignée	Bande	Taille	Séquence
$\text{VGLUT3}^{\text{floX-SERTCRE}}$	+/+	390bp	(Sertcre-C) 5'-GAACGAACCTGGTCGAAATCAG-3' (Sertcre-W) 5'-GGCACTAACCTCCACCATTCTG-3'
	Mutante	500bp	(Sertcre-CO) 5'-CATCCGCACCACTGACTGACCA-3'
$\text{VGLUT3}^{\text{floX-VIAATCRE}}$	Mutante	200bp	(C) 5'-CTT CGT CAT CGG CGG CAT CTG-3' (M) 5'-CCA AAA GAC GGC AAT ATG GT-3'
$\text{VGLUT3}^{\text{floX-ChATCRE}}$	+/+	280bp	(ChAT1) 5'-CCT TCT ATC GCC TTC TTG ACG-3' (ChAT2) 5'-GTT TGC AGA AGC GGT GGG-3'
	Mutante	360bp	(ChAT3) 5'-AGA TAG ATA ATG AGA GGC TC-3'

III/ TECHNIQUES ANATOMIQUES

III.1/ HYBRIDATION *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

Les expériences de FISH sont réalisées afin de déterminer la présence d'ARNm pour définir la nature des neurones d'intérêt à partir de coupes de cerveaux frais congelés. Le protocole utilisé et décrit ci-dessous a été mis au point par Sylvie Dumas.

Après dislocation cervicale, les cerveaux des souris sont prélevés et plongés dans de l'isopentane maintenu entre -25 et -30°C. Les cerveaux congelés sont stockés à -80°C avant leur utilisation. Des coupes coronales sériées de 16 µm sont prélevées à l'aide du cryostat (CM 3050S, Leica) et montées sur des lames superfrost-plus (Menzel-Gläser). La sonde cARN VGLUT3 utilisée est marquée à l'UTP couplée à la digoxigénine (DIG) et la sonde VIAAT à l'UTP couplée à la fluorescéine (**Tableau 4**). Les sondes cARN marquées sont obtenues à l'aide de la RNA polymérase T7 (Promega). Elles sont diluées dans une solution d'hybridation contenant du formamide désionisé (50%) et sont dénaturées à 80°C pendant 5 min. Les coupes coronales de cerveau de souris préalablement fixées dans du formaldéhyde 4% pendant 10 min, sont plongées dans une solution fraîche d'acétylation pendant 10 min et rincées au PBS. Le tampon d'hybridation contenant le mélange de sondes (100µl) est déposé sur les coupes sous un Nescofilm. Les lames sont ensuite disposées dans des porte-lames placés dans une chambre humide (tampon citrate salin, SSC 5X) à 60°C pendant une nuit. Les lames sont rincées dans

du tampon SSC (5X à 60°C, 0,2X à 60°C) puis dans du tampon MABT (acide maléique 1X, Tween 20, 0,1%), 2 fois 20 min à température ambiante (TA).

La révélation des marquages se fait ensuite en deux étapes.

Lors de la première étape, les sondes marquées à l'UTP-fluorescéine sont révélées. Les sites non spécifiques sont saturés dans du tampon de blocage (tampon d'acide maléique 5X contenant la solution de blocage source) pendant 60 min à TA. Puis, les coupes sont incubées avec un anticorps anti-fluorescéine couplé à la peroxydase du raifort (HRP, Roche, 1/2500 dans le tampon de blocage) une heure à TA. Les lames sont incubées dans la solution TSA-PLUS BIOTIN (Perkin Elmer, dilué à 1/100 dans le tampon d'amplification pendant 10 min à TA). Puis, le substrat de la peroxydase Neutravidin-Oregon green (InVitrogen, dilution 1/1000 dans du PBST) est ajouté pendant 10 min à TA.

Dans une seconde étape, les sondes marquées à l'UTP-DIG sont révélées. Les lames sont plongées dans un tampon de glycine (0,1M, pH 2,1) pendant 10 min à température ambiante, puis dans une solution d'eau oxygénée 3% diluée dans du PBS à TA. Ensuite, le blocage se fait avec le tampon de blocage pendant 30 min à TA. Les lames sont ensuite incubées avec un anticorps dirigé contre la DIG et couplé à la HRP (HRP, Roche, 1/2500 dans le tampon de blocage). Le substrat de la peroxydase TSA-PLUS CY3 (dilué au 1/200 dans le tampon d'amplification, Perkin Elmer), est ajouté pendant 10 min à TA. Le DAPI est ajouté dans les derniers rinçages au PBST afin de visualiser les noyaux des corps cellulaires. Finalement les coupes sont montées entre lame et lamelle avec le milieu de montage Fluoromount (SouthernBiotech).

Les images de FISH sont acquises au nanozoomer (XR Digital slide scanner C12000, Hamamatsu) de la plateforme d'imagerie de l'Institut de la Vision (Paris 6). La longueur d'onde d'émission du Neutravidin-Oregon green est de 524 nm, alors que celle de CY3 est de 570 nm. Le traitement des images se fait à l'aide d'Adobe Illustrator.

La quantification s'est faite par comptage manuel après détermination d'un seuil de détection des neurones sur Image J.

Sonde cARN	Marquage de l'UTP	Quantité (ng)	Source	Séquence
VGLUT3	DIG	20	Roche	aaaacaggactgggctgaccagagaatctctctgaggacaaatgtg gaatcattgaccaagatgagtttagctgaggagacagaactcaaccac gagacttcgtaagtcccagaagaagatgtcttatggagccaccacc cagaattatgaggtccagaagacggagtgaggacacagagagaat ctgccttcgacagggaggagccattatctaccaggccgaaggagact tctcagaaacatcctaaatgtctggcttcacctcagcttacaactggaa gtatcgcacccatcgctttccatactgcgtcttgccagggggcctaaa tcgtgggaaagggggagattaaattaacaacagagaaaaagaacac gccttcttacaagatgggaatatggaccttggctc
VIAAT	Fluoresceine	40	Roche	ccagggcctgcagatggacatctgaaatcggaaggcagccctgcg gagacgagggcgagaagctcccctgcaggggagacattcattatcag cgcgccggcgctcctctgccacctctggctccaaggaccaggccgtg ggagctggtggggagttcgggggtcagcacaaccaagatcacggc gtgggaagcgggctggaacgtgacaaatgccattcagggcatgttctg gctgggcctaccctacccatctccacggcggtacctgggggtgctc ctcatcatcttcgccagtggtgtgctgctacaccggcaagatcctca tcgctgcctgtacgaggagaacgaagacggggaggtggtgcgctg cgggactcgtatgtggccatagctaacgcatgctgcgctcctcgattcc ccacctgggcccggcgtggtcaatgtggcgagatcatcgagctgg tgatgacgtgtatctgtacgtcgtggtgagcggcaacctcatgataca cagttcccggggctcccgtgctcagaagctcctggtccatcatagcc acagcgggtgctgctgccctgcgcttctgaagaatctcaaggccgtg ccaagttcagctgctgtgtacgctggccacttcgtcatcaacatcctg gtcatcgcttactgtctctcgcgcgctgattggcctgggagaagg tgaagttctacatcgacgtcaagaagttccctctccattggcatcatc gtgttcagctacagctcgagatcttctgcctctctcgaaggcaaca tgcagcagcccagcga

Tableau 4 : Sondes utilisées pour les hybridations *in situ* fluorescentes.

III.2/ IMMUNOFLUORESCENCE

Les Immunofluorescences vont nous permettre de déterminer la présence de protéines dans nos neurones d'intérêt. Après injection intrapéritonéale d'une dose létale de pentobarbital sodique (54,7 mg/mL), les souris sont rapidement perfusées par voie intracardiaque avec une solution de paraformaldéhyde à 4°C (PFA 4% dans du tampon phosphate PBS). Les cerveaux sont prélevés et ensuite post-fixés sur la nuit à 4°C dans le même fixateur. Des coupes coronales sériées de 20 µm sont réalisées à l'aide d'un vibratome (VT1000S, Leica), rincées dans un tampon de blocage PGT (PBS 1X, Gélatine 2g/L, Triton 0,25%) avant d'être transférées dans du PBS 1X.

Les co-marquages sont réalisés sur coupes flottantes avec des anticorps primaires (**Tableau 5**) puis révélés par des anticorps secondaires dirigés contre les IgG de lapin ou de

cobaye et couplés à des Alexa fluor 488 et 555 (1:2000, Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA). Les coupes de cerveaux sont incubées avec du DAPI (1/50000 dans du PBS) lors du dernier rinçage afin de permettre la visualisation des corps cellulaires.

Pour les co-immunofluorescences VGLUT3 et VIAAT, VMAT2, ou VACHT, les coupes sont montées entre lame et lamelle avec le milieu de montage CFM3 (Biovalley) et laissées à sécher sur la nuit avant d'être observées au microscope confocal inversé (Sp1 Leica, TCS SP5 AOBS, Leica Microsystems, Mannheim, Germany) à l'objectif 63x, zoom 4, pour une taille d'image de 1024*1024 et un z-step de 130nm.

Pour les co-immunofluorescences VGLUT3 et CCK ou PV, les coupes sont montées entre lame et lamelle avec le milieu de montage Fluoromount (SouthernBiotech) et observées au microscope électronique à fluorescence (Zeiss).

Anticorps Primaires	Idiotype	Concentration	Source
Anti-VGLUT3	Anti-Lapin	1/2000	Synaptic System, ref 135-203
	Anti-Cobaye	1/4000	Équipe El Mestikawy
Anti-VIAAT	Anti-Lapin	1/3000	Don de Bruno Gasnier (Paris 5)
Anti-VACHT	Anti-Lapin	1/2000	Synaptic System, ref 139-103
	Anti-Cobaye	1/5000	Équipe El Mestikawy
Anti-VMAT2	Anti-Lapin	1/2000	Équipe El Mestikawy
Anti-CCK	Anti-Souris	1/1600	Don de Dr Ohning, code 9303, (Ohning et al., 1996)
Anti-PV	Anti-Souris	1/2000	Sigma, ref P3088

Tableau 5 : Anticorps primaires utilisés pour l'immunofluorescence

Les images sont traitées sous Image J et analysées grâce à la macro DiAna (Distance Analysis ; Bolte and Cordelières, 2006) pour la quantification des doubles marquages VGLUT3 et VIAAT, VMAT2, ou VACHT. Pour l'anticorps secondaire utilisé Alexa fluor 488, la longueur d'onde d'émission est de 520nm, tandis que celle de l'anticorps Alexa fluor 555 est de 565nm. Cette macro permet de déterminer la quantité de protéines présente dans les terminaisons synaptiques de l'amygdale basolatérale dans les différents canaux de nos images.

III.3/ IMMUNO-AUTORADIOGRAPHIE - IAR

Les immuno-autoradiographies sont réalisées sur des coupes de cerveaux frais congelés pour déterminer l'expression de protéines d'intérêt. Les cerveaux sont prélevés après dislocation cervicale et congelés dans de l'isopentane maintenu entre -25 et -30°C. Les cerveaux sont stockés à -80°C avant leur utilisation. Des coupes coronales sériées de 12 µm sont prélevées à l'aide du cryostat (CM 3050S, Leica) et montées sur des lames superfrost-plus (Menzel-Gläser).

Après avoir décongelé les lames, les coupes sont post-fixées dans une solution de paraformaldéhyde 4% (PFA 4% dans du tampon phosphate PBS) à température ambiante (TA). Elles sont ensuite incubées dans un tampon de blocage (BSA 3% ; NaI 1mM, Sérum de chèvre 1%, PBS 1X, Azide 0,02%) à TA, puis avec un antisérum polyclonal de lapin VGLUT3 (1/20 000, Synaptic System) toute la nuit à 4°C. La détection de l'anticorps primaire se fait à l'aide d'anticorps secondaire anti-lapin radioactif à l'iode-125 (PerkinElmer) incubé pendant 2h à TA. Les coupes sont rincées rapidement à l'eau puis séchées.

L'exposition des coupes se fait sous film radiographique (Kodack Biomax MR) avec une gamme standard bleu C14 pendant 5 jours.

Les mesures de densitométrie sont réalisées et analysées avec le logiciel MCID™ sur 8 à 10 coupes de cerveaux bilatéralement pour chaque région par souris.

IV/ CHIRURGIE STÉRÉOTAXIQUE

Les souris VGLUT3^{flox/flox} sont transférées dans notre animalerie de proximité au moins 2 semaines avant la chirurgie. Elles sont anesthésiées par une injection intrapéritonéale d'un mélange de kétamine (10mg/mL) / xylazine (1mg/mL). Une fois l'animal endormi, il est placé sur un appareil stéréotaxique Kopf et fixé par des barres d'oreilles et une barre de gueule. Sa température corporelle est suivie pendant la chirurgie et des gouttes ophtalmiques sont déposées sur ses yeux pour éviter les sécheresses oculaires.

Avant d'inciser le scalp, une anesthésie locale est réalisée à l'aide de chlorhydrate de lidocaïne (5mg/mL).

Une fois les sutures crâniennes mises en évidence, de petits trous sont percés dans le crâne. La dure mère est incisée afin de pouvoir descendre l'injecteur aux coordonnées choisies :

-pour la BLA : à partir du Bregma : AP= -1,4 mm ; ML= -3.5 mm et DV= -4,5 mm à partir de la surface du crâne (Atlas Paxinos et Franklin, 2001).

- pour le BF : à partir du Bregma : AP= +0,1 mm ; ML= +/-1,65 mm et DV= -4,6 mm à partir de la surface du crâne (Atlas Paxinos et Franklin, 2001).

L'injection de 0,5 µl du virus contrôle (AAV9.hSyn.eGFP.WPRE.bGH, lot CS0354, 8,88^e13 GC/mL pour la BLA et AAV5.CMV.PI.eGFP.WPRE.bGH, lot V1244-1CES, 7,61^e12 pour le BF ; Penn Vector Core, Université de Pennsylvanie) ou CRE non rétrograde (AAV9.hSyn.HI.eGFP-CRE.WPRE.SV40, CS0353, 5,54^e13 pour la BLA et AAV5.CMV.HI.eGFP-CRE.WPRE.SV40, lot V3597TI-R-C, 6.71^e12 GC/mL pour le BF ; Penn Vector Core, Université de Pennsylvanie) resuspendu dans du DMEM (*Vogt modified Eagle's minimal essential medium*) a été effectuée à l'aide d'une pompe à injection (0,1µL/min, Phymep) de façon bilatérale. L'injecteur a ensuite été maintenu en place pendant 5 min afin d'éviter toute remontée de la solution par capillarité. Une fois ce temps respecté, le scalp de l'animal est suturé et l'animal mis au chaud en attendant son réveil. Les souris sont ensuite replacées dans la salle d'élevage. Une solution d'antidouleur (Carprofen, 0,1mg/mL) est ajoutée dans leur eau de boisson pendant la première semaine qui suit l'opération. Ces injections stéréotaxiques virales vont permettre d'invalider l'expression de VGLUT3 dans les régions cérébrales et plus particulièrement les neurones ciblés.

Les souris sont testées comportementalement 8 semaines plus tard. Une semaine avant le début des tests comportementaux, les animaux sont manipulés quotidiennement afin de diminuer le stress lié à la manipulation humaine.

V/ TESTS COMPORTEMENTAUX

V.1/ ACTIVITÉ LOCOMOTRICE – TEST D'ACTIMÉTRIE

Ce test permet de mesurer l'activité locomotrice spontanée des souris. Les souris sont placées individuellement dans des cages d'actimétrie en plastique transparent (20 x 15 x 25 cm). Leurs déplacements sont quantifiés par des faisceaux infrarouges situés le long de l'axe horizontal à 15 mm et à 30 mm au-dessus du sol. Cela permet de mesurer l'activité horizontale et verticale. Chaque cage est connectée par une interface à un ordinateur. L'activité locomotrice spontanée a été mesurée pendant 14h (de 19h30 à 7h30) avec une phase de jour de 1h précédant la phase de nuit de 12h et une phase de jour de 1h suivant cette phase de nuit.

V.2/ TEST DE L'OPEN FIELD (OF)

Le test OF a été choisi pour étudier les comportements de type anxieux des souris. Il s'agit d'un dispositif carré en plexiglas blanc de 43 cm de côté sur 26 cm de haut. Une aire périphérique (8/9 de la surface totale) et une aire centrale (1/9 de la surface totale) sont définies par le logiciel d'enregistrement Viewpoint (**Figure 37**). La luminosité au centre de l'OF est fixée à 40 lux. En début de test, les souris sont placées en périphérie de l'OF. Leur activité d'exploration horizontale est enregistrée par vidéo puis analysée par le logiciel Viewpoint pendant les 10 min du test (distance parcourue, temps passé dans les différentes zones). L'OF est nettoyé à l'eau entre chaque souris.

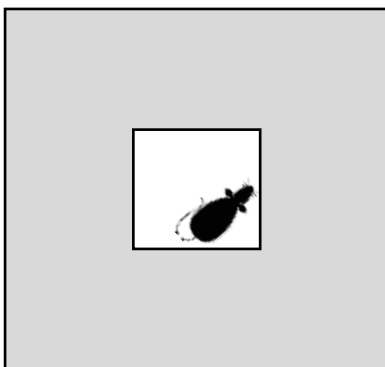


Figure 37: Schéma du Test de l'Open Field.

La zone grise représente l'aire périphérique, et la zone blanche représente l'aire centrale anxiogène.

V.3/ TEST DU LABYRINTHE EN CROIX SURELEVÉ – EPM (*elevated plus maze*)

Le labyrinthe en croix surélevé (à 1 mètre du sol) est un test utilisé pour compléter l'étude des



comportements de type anxieux chez la souris. Il est composé d'une zone centrale (zone neutre, 10 cm x 10 cm), de deux bras ouverts (zone anxiogène, 40 cm x 10 cm) et de deux bras fermés (zone sécurisante, 40 cm x 10 cm) avec des parois opaques d'une hauteur de 30 cm (**Figure 38**). L'intensité lumineuse est de 5 lux au bout des bras ouverts.

Les souris sont placées individuellement dans la zone centrale et le temps passé dans chacun des compartiments est mesuré pendant 10 min grâce au logiciel ViewPoint.

Figure 38 : Photo d'un labyrinthe en croix surélevé – EPM

Les bras ouverts représentent la zone anxiogène et les bras fermés correspondent à la zone sécurisante. La zone centrale est la zone neutre.

V.4/ SENSIBILITÉ AUX CHOCS ÉLECTRIQUES

Ce protocole a été utilisé afin de déterminer la sensibilité à la douleur des souris suite à la délivrance de chocs électriques via une grille de sol électrifiée.

Au cours de ce test, des chocs électriques aux pattes d'intensité croissante et d'une durée d'une seconde sont délivrés à intervalle de 30 sec. Le premier choc est de 0,1mA. Les chocs qui suivent augmentent par pas de 0,02mA (**Figure 39**). Lorsque l'ensemble des comportements attendus est observé (mouvements, vocalisation, course et saut), l'expérience s'arrête. A chaque apparition d'un de ces comportements, l'intensité du choc correspondante est relevée.

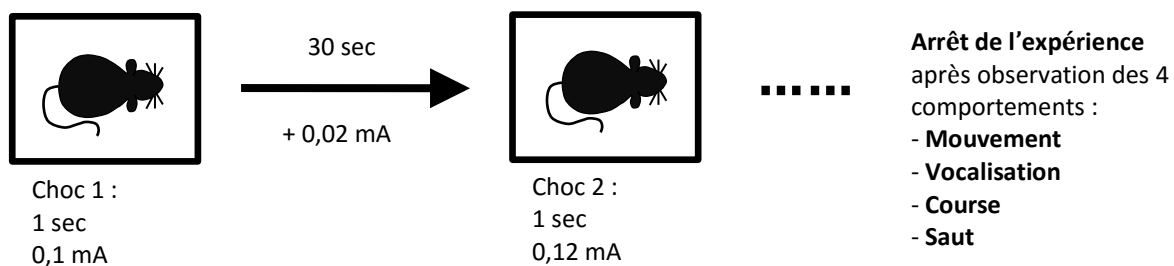


Figure 39 : Schéma du protocole de sensibilité aux chocs électriques.

V.5/ TEST DU CONDITIONNEMENT DE PEUR – FC (*Fear Conditioning*)

Le test de FC permet d'étudier l'apprentissage et la mémorisation de stimuli aversifs et en particulier de peur chez les souris. Le stimulus conditionné (SC) utilisé est soit un signal lumineux (80 lux, 20sec, 2 sec on/off) soit un signal sonore (4000 Hz, 85 dB, 30 sec) et le stimulus inconditionné (SI) est un choc électrique (0,25 mA, 2sec). Le conditionnement se fait le jour 1 durant 4 min et se compose de 2 min d'exploration libre du contexte A (**Figure 40**), suivi d'une première présentation du SC se co-terminant avec le SI. Après 30 sec de délai, le couple SC-SI est de nouveau présenté. Trente secondes après la fin de la deuxième association SC-SI, la souris est remise dans sa cage d'élevage et transportée dans l'animalerie. Avant chaque souris, la boîte de conditionnement est nettoyée à l'éthanol 70%. Les tests ont lieu le jour 2. La mémoire contextuelle, dépendante de l'amygdale et de l'hippocampe, est mise en évidence grâce au test au contexte alors que la mémoire au stimulus discret lumineux purement amygdalo-dépendante est révélée par le test au contexte modifié. De façon randomisée, les capacités mnésiques des souris sont évaluées dans un test, puis 2 h après dans l'autre test.

Lors du test au contexte, l'animal est remis dans l'environnement du conditionnement (contexte A sans SC-SI) pendant 6 min. La boîte de conditionnement est nettoyée à l'éthanol 70% avant

chaque passage de souris. Le transport de la salle d'élevage à la salle d'expérimentation se fait dans les cages d'élevage des souris. Le test au contexte modifié se déroule en deux phases. Trois minutes après son introduction dans le contexte modifié (contexte B, **Figure 40**), le SC est présenté pendant les 3 dernières minutes à 4 reprises pour la lumière avec un intervalle de 30sec entre chaque présentation, et de façon constante pour le son. Dans le contexte B, l'environnement est modifié : les parois sont couvertes de plaques blanches, la grille de sol est recouverte d'une plaque en aluminium, et un cylindre central change la forme de la zone d'exploration de la souris. La boîte de conditionnement est nettoyée avec de l'acide acétique à 1%, la lumière est rouge et les souris sont transportées dans de petites boîtes opaques de la salle d'élevage à la pièce d'expérimentation. Toutes ces modifications sont effectuées afin de différencier au maximum le contexte A de conditionnement du contexte modifié B.

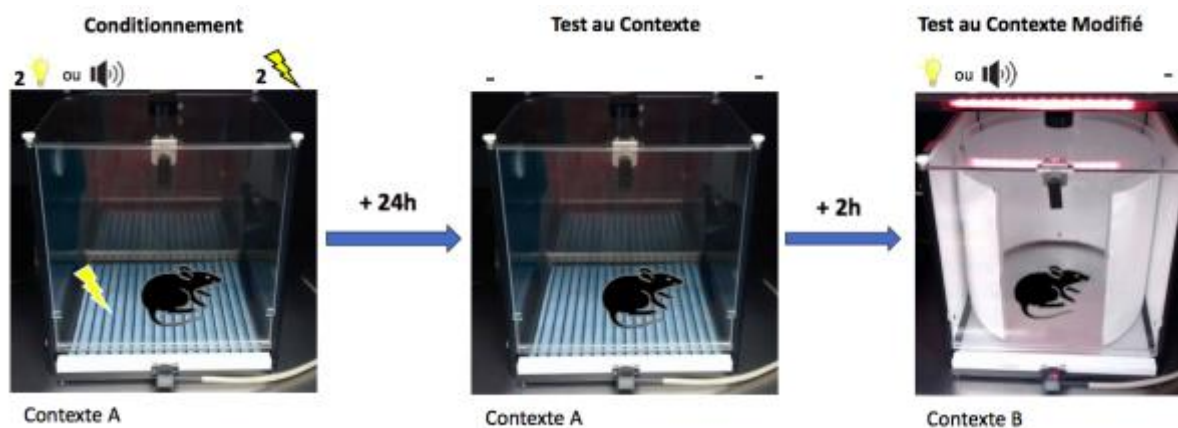


Figure 40: Schéma du protocole de Peur Conditionnée

Le logiciel PanLab couplé aux boîtes de conditionnement Bioseb nous permet d'acquérir de façon automatisée le taux de *freezing* des animaux. Les seuils de *freezing* ont été déterminés pour être en accord avec la méthode de relevé manuel.

V.6/ TEST D'EXTINCTION DE CONDITIONNEMENT DE PEUR

Ce test est utilisé pour analyser l'évolution des réponses comportementales de peur suite aux présentations successives du stimulus conditionné qui n'est plus associé à l'évènement aversif. Le 1^{er} jour a lieu la phase de conditionnement. Les souris sont placées dans la chambre de conditionnement pendant 2 min avant la première présentation de la lumière (80 lux, 20sec, 2 sec on/off) ou du son (30 sec, 4000 Hz, 85 dB). Les 2 dernières secondes du stimulus conditionné sont associées avec un choc électrique (0,25 mA). Dix associations SC-SI se

succèdent à intervalle de 75 secondes. Les souris sont remises dans leur cage d'élevage 1 minute et 45 secondes après le dernier choc. Elle est nettoyée à l'alcool 70% avant chaque passage de souris.

La phase d'extinction a lieu les jours 2 à 8 dans un nouveau contexte (**Figure 41**). Les parois sont couvertes de plaques blanches, la grille de sol est recouverte d'une plaque en aluminium, et un cylindre central change la forme de la zone d'exploration. Les souris sont exposées à 10 présentations de la lumière ou du son à intervalle de 85 secondes. Les souris sont transportées vers la salle d'élevage dans des boîtes de transport opaques 1 minute et 45 secondes après la dernière présentation du son. La lumière au sein de la chambre est rouge et l'intensité lumineuse est de 0 lux. Avant chaque passage de souris, la chambre de conditionnement est nettoyée à l'acide acétique 1%.

Durant le jour 15, les souris sont de nouveau dans le contexte de conditionnement. Dix présentations de la lumière (80 lux, 20sec, 2 sec on/off) ou du son (30 sec, 4000 Hz, 85 dB) ont lieu.

Tout comme pour le protocole de conditionnement de peur (FC) précédemment décrit, le taux de *freezing* est mesuré et analysé à l'aide du logiciel PanLab.

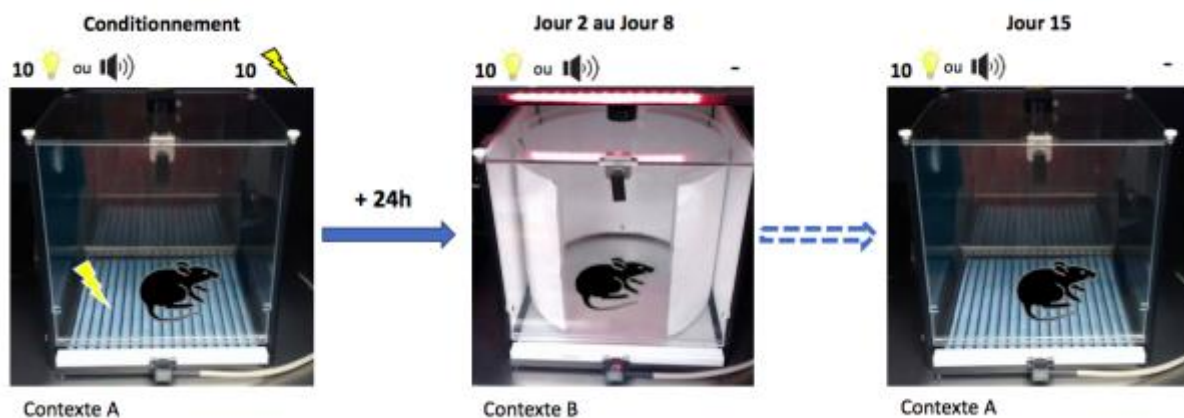


Figure 41 : Schéma du protocole d'extinction.

VI/ STATISTIQUES

Les résultats comportementaux ont été traités par le logiciel d'analyses statistiques Prism 5 (GraphPad software Inc). Les données obtenues sont analysées par des unpaired t tests avec correction de Welch lorsqu'il s'agit de comparer deux moyennes. Des ANOVA à mesures répétées sont réalisées pour comparer plusieurs groupes. Les tests post-hoc sont effectués avec le test de comparaisons multiples de Sidak où le t(DF) sera mentionné. Tous les résultats sont exprimés en moyenne +/- SEM. Les différences significatives sont observées pour un $p < 0,05$.

RÉSULTATS

*Etude I : Caractérisation Anatomique de
VGLUT3 dans l'amygdale basolatérale*

CHAPITRE I :

NATURE DES NEURONES VGLUT3 POSITIFS DE L'AMYGDALE BASOLATERALE

I/ Introduction

Dans l'amygdale cérébrale, les différents groupes de noyaux amygdaliens sont de nature différente. En effet, le noyau basolatéral est principalement glutamatergique et exprime VGLUT1 et VGLUT2 alors que le noyau central est exclusivement GABAergique (McDonald and Augustine, 1993; Spampanato et al., 2011; Swanson and Petrovich, 1998). D'après les études de caractérisation anatomique effectuées au laboratoire, il apparaît également que VGLUT3 est fortement exprimé dans l'amygdale basolatérale (**Figure 42**).

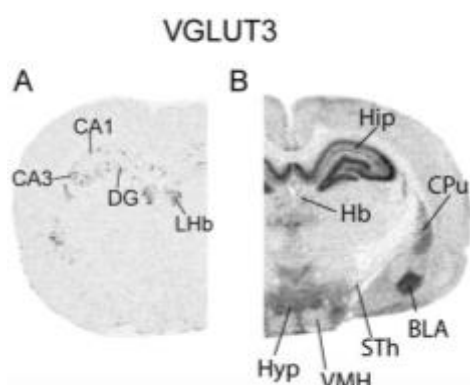


Figure 42: Répartition de la distribution de l'ARNm (A) et de la protéine (B) VGLUT3.
(D'après Herzog et al, 2004)

Toutefois, le glutamate n'étant pas le NT principal des neurones exprimant VGLUT3, aucune étude au commencement de ce projet n'avait mis en évidence la nature des neurones et des terminaisons possédant VGLUT3 dans l'amygdale basolatérale.

Dans l'hippocampe, les neurones possédant VGLUT3 appartiennent uniquement à une sous-population d'interneurones GABAergiques, les « baskets cells » CCK positifs qui représente moins de 10% de la population neuronale GABAergique totale (Fasano et al, 2017). Etant donné que l'hippocampe est une structure de type corticale tout comme l'amygdale basolatérale, on pourrait s'attendre à observer le même type d'interneurones GABAergiques exprimant VGLUT3.

Ainsi, dans un premier temps, j'ai cherché à caractériser la nature des neurones possédant VGLUT3 en ciblant VGLUT3 et VIAAT, le transporteur vésiculaire du GABA des neurones de la BLA. Le but de cette étude était de caractériser les neurones VGLUT3 positifs afin de mieux comprendre leur rôle fonctionnel au sein du réseau amygdalien.

II/ Matériel et Méthodes

II.1/ Animaux

Quatre souris ont été utilisées pour déterminer de la nature des neurones VGLUT3 positif par double hybridation *in situ* fluorescente (FISH).

La quantification a été effectuée sur 24 coupes couvrant la totalité de la structure, soit 48 amygdales.

II.2/ Double hybridation *in situ* fluorescente

D'après les résultats publiés sur la nature des interneurones GABAergiques VGLUT3 positifs dans l'hippocampe, j'ai choisi de réaliser avec l'aide de Sylvie Dumas une double hybridation *in situ* fluorescente dirigée contre VGLUT3 et VIAAT afin de vérifier notre hypothèse de départ.

La quantification s'est faite par comptage manuel après détermination d'un seuil de détection des neurones sur Image J.

Le protocole utilisé est celui décrit dans le Matériel et Méthodes générales (cf page 118).

III/ Résultats

III.1/ Caractérisation de la nature des neurones VGLUT3 positifs de l'amygdale basolatérale

La **Figure 43** présente les images obtenues après la FISH VGLUT3/VIAAT. L'ARNm de VGLUT3 est marqué en rouge (**B**) alors que celui de VIAAT est en vert (**C**). Le DAPI en bleu permet de voir les noyaux cellulaires (**D**).

Les résultats montrent que l'ARNm de VGLUT3 colocalise parfaitement avec l'ARNm de VIAAT dans l'amygdale basolatérale. En revanche, certains neurones VIAAT positifs ne possèdent pas l'ARNm VGLUT3.

Ainsi, dans l'amygdale basolatérale, VGLUT3 est uniquement présent dans une sous-population d'interneurones GABAergiques.

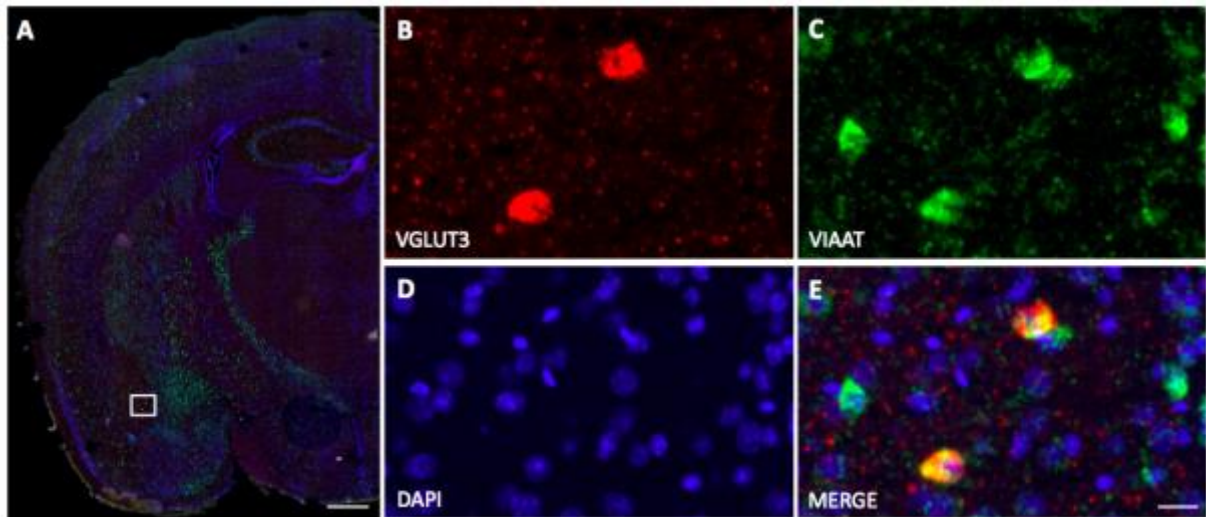


Figure 43 : Distribution des ARNm de VGLUT3 et VIAAT dans l'amygdale basolatérale.
 A) Coupe coronale au niveau de l'amygdale basolatérale. B) Localisation de l'ARNm de VGLUT3 (vert). C) Localisation de l'ARNm de VIAAT (vert). D) Localisation des noyaux cellulaires avec le DAPI. E) Co-localisation de VGLUT3 et VIAAT (jaune) dans l'amygdale basolatérale. Echelle : A, 500µm ; B-E, 20µm.

La prochaine étape était d'évaluer quantitativement la population neuronale GABAergique VGLUT3 positive par rapport à la population GABAergique globale.

III.2/ Quantification des neurones VGLUT3 positifs de l'amygdale basolatérale

Précédemment nous avons pu mettre en évidence que l'ensemble des neurones possédant l'ARNm de VGLUT3 sont VIAAT positifs, en revanche la réciproque semble incorrecte. Afin de définir plus précisément et de façon quantitative la présence de VGLUT3 dans les interneurons GABAergiques de la BLA, j'ai quantifié le pourcentage d'interneurones GABAergiques possédant l'ARNm VGLUT3 par rapport à la population GABAergique totale (**Figure 44**).

A partir de la quantification, on trouve que les interneurons GABAergiques possédant VGLUT3 représentent une faible sous-population avec une représentation de moins de 10% de la population GABAergique entière dans l'amygdale basolatérale.

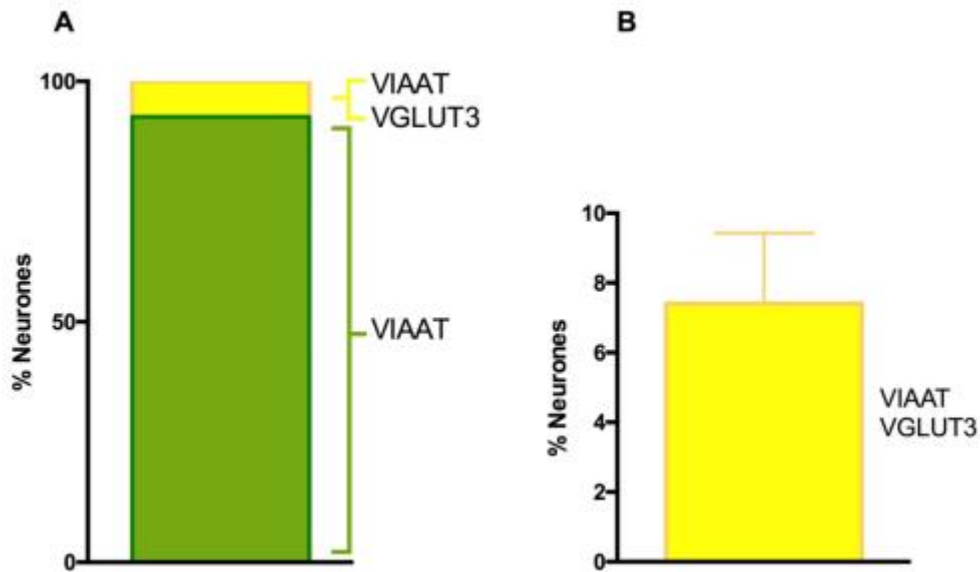


Figure 44 : Quantification du nombre de neurones VIAAT positifs possédant VGLUT3 par rapport à la population globale GABAergique dans la BLA.

A) Représentation de la population neuronale exprimant les ARNm de VGLUT3 et VIAAT par rapport à la population GABAergique totale dans la BLA. B) Pourcentage de neurones exprimant les ARNm de VGLUT3 et VIAAT dans la BLA. ARNm de VIAAT en vert. Colocalisation des ARNm de VGLUT3 est VIAAT en jaune.

IV/ Discussion

Les neurones VGLUT3 positifs de l'amygdale basolatérale semblent donc appartenir à une sous-population de neurones GABAergiques comme ceux observés dans l'hippocampe (Fasano, 2017). De plus, une autre étude récente menée par Omiya et ses collaborateurs a également défini la nature de ces neurones VGLUT3 positifs de l'amygdale basolatérale comme étant GABAergiques (Omiya, 2015).

On peut alors se demander quel type d'action régisse ces neurones, à savoir s'ils ont une action locale sur les neurones principaux de la BLA ou bien s'ils projettent vers d'autres structures afin de réguler d'autres systèmes. A ce jour, les seuls neurones de projection GABAergique de la BLA identifiés expriment SOM et projettent vers le BF (McDonald et al., 2012).

Il semble alors s'agir d'une sous-population d'interneurones GABAergiques ayant une activité locale sur le réseau amygdalien (McDonald, 1992; Spampanato et al., 2011).

Etant donné la diversité des interneurones GABAergiques de la BLA, il serait intéressant de déterminer plus précisément à quel type d'interneurones, parmi les cinq décrits, la population neuronale GABAergique VGLUT3 positive est rattachée (Mascagni and McDonald, 2003,

2007; McDonald and Betette, 2001; McDonald and Mascagni, 2001, 2002). Cela permettrait de nous orienter sur les propriétés physiologiques et fonctionnelles de ces interneurons.

D'autre part, d'un point de vue quantitatif, il s'avère que ces neurones GABAergiques VGLUT3 positifs représentent moins de 10% de la population GABAergique totale. Cette proportion est retrouvée au sein des interneurons GABAergiques de l'hippocampe (Fasano, 2017). Cela laisserait présager qu'il s'agit du même type de population. Ainsi par homologie, on pourrait suggérer une similitude du rôle de ces neurones dans le cadre du réseau fonctionnel hippocampique et amygdalien à l'échelle cellulaire.

Afin d'être plus précis dans la caractérisation anatomique et d'amorcer une proposition fonctionnelle pour ces interneurons GABAergiques, l'étape suivante est la détermination de la nature des terminaisons VGLUT3 positives du noyau basolatéral de l'amygdale. On regardera notamment si la diversité neuronale observée à l'échelle du SNC est retrouvée au sein de l'amygdale, et si les interneurons de la BLA partagent les mêmes propriétés que celles décrites pour les interneurons GABAergiques de l'hippocampe.

*Etude I : Caractérisation Anatomique de
VGLUT3 dans l'amygdale basolatérale*

CHAPITRE II :

NATURE DES TERMINAISONS VGLUT3 POSITIVES DE L'AMYGDALE BASOLATERALE

I/ Introduction

Dans le SNC, VGLUT3 a été identifié dans différentes populations neuronales et particulièrement dans une sous-population d'interneurones GABAergiques du cortex et de l'hippocampe, dans les neurones sérotoninergiques du raphé et dans les interneurones cholinergiques du striatum (El Mestikawy et al., 2011).

La question de la nature des terminaisons VGLUT3 positives de l'amygdale basolatérale se pose alors, étant donné l'hétérogénéité des neurones exprimant VGLUT3.

Précédemment, nous avons mis en évidence que VGLUT3 est présent uniquement dans une sous-population d'interneurones GABAergiques de l'amygdale basolatérale. Étant donné que ces interneurones sont locaux et projettent dans le noyau basolatéral de l'amygdale, cela implique qu'il existe une source endogène de glutamate avec ces terminaisons GABAergiques VGLUT3 positives.

De plus, il s'avère qu'une population cholinergique VGLUT3 positive a été décrite dans l'amygdale basolatérale provenant du cerveau antérieur basal (*basal forebrain - BF*) (Nickerson Poulin et al., 2006). On s'attend ainsi à retrouver la présence de cette population neuronale à travers notre étude.

Par ailleurs, des projections sérotoninergiques provenant des noyaux rostraux du raphé ont été observées dans l'amygdale. Il apparaît que certaines d'entre elles semblent être VGLUT3 positives (Shutoh et al., 2008).

Ainsi, notre étude vise à définir la présence de ces sous-population à travers leurs terminaisons au sein de la BLA ainsi que leur proportion respective au sein de la population VGLUT3 positive entière.

D'autre part, la caractérisation des interneurones GABAergiques VGLUT3 positifs sera complétée pour déterminer plus précisément leur nature et mieux comprendre leur rôle au sein du réseau amygdalien.

Cette approche sera réalisée à l'aide de techniques d'immunohistochimie.

II/ Matériel et Méthodes

II.1/ Animaux

Quatre souris mâles C57Bl6/J adultes provenant des fermes d'élevage de Janvier Labs (France) ont été utilisées pour les doubles immunofluorescences VGLUT3 et VIAAT, VMAT2 ou VACHT.

Par souris, 2 coupes coronales prises au niveau de l'amygdale ont été sélectionnées. Deux photos par coupe ont été prises pour réaliser la quantification. Au total, 16 images ont été analysées pour chacune des expériences de double marquage en immunofluorescence.

Pour les immunofluorescences VGLUT3 et PV ou CCK, un nombre de trois souris a été utilisé.

II.2/ Immunofluorescence et Quantification

Les protocoles utilisés sont ceux détaillés dans le Matériel et Méthodes générales (cf page 120).

III/ Résultats

III.1/ Immunofluorescences VGLUT3 et VIAAT, VACHT, ou VMAT2

Pour déterminer la nature des terminaisons nerveuses VGLUT3-positives dans la BLA, j'ai effectué des doubles immunofluorescences avec VGLUT3 et VIAAT, le transporteur vésiculaire du GABA, VMAT2 celui des monoamines ou VACHT pour l'acétylcholine, afin de détecter et quantifier la présence de VGLUT3 dans les terminaisons GABAergiques, monoaminergiques ou cholinergiques.

Les résultats de ces immunofluorescences montrent que VGLUT3 est présent dans les terminaisons GABAergiques (**Figure 45 A-C**), monoaminergiques (**Figure 45 D-F**) et cholinergiques (**Figure 45 G-I**) dans l'amygdale basolatérale.

La quantification réalisée sur l'ensemble des images acquises à l'aide du logiciel DIANA (Bolte and Cordelières, 2006) indique que les pourcentages d'expression de VGLUT3 sont variables en fonction de la nature des terminaisons dans la BLA.

En effet, il apparaît que :

- 30% des terminaisons VGLUT3-positives sont GABAergiques et environ 20% des terminaisons VIAAT-positives expriment VGLUT3 (**Figure 46 A**).
- 23% environ des varicosités exprimant VGLUT3 sont monoaminergiques et près de 14% des terminaisons VMAT2-positives le sont aussi pour VGLUT3 (**Figure 46 B**).
- 63 % des terminaisons VGLUT3-positives sont cholinergiques et environ 20% des terminaisons VACHT-positives sont également VGLUT3-positives (**Figure 46 C**).

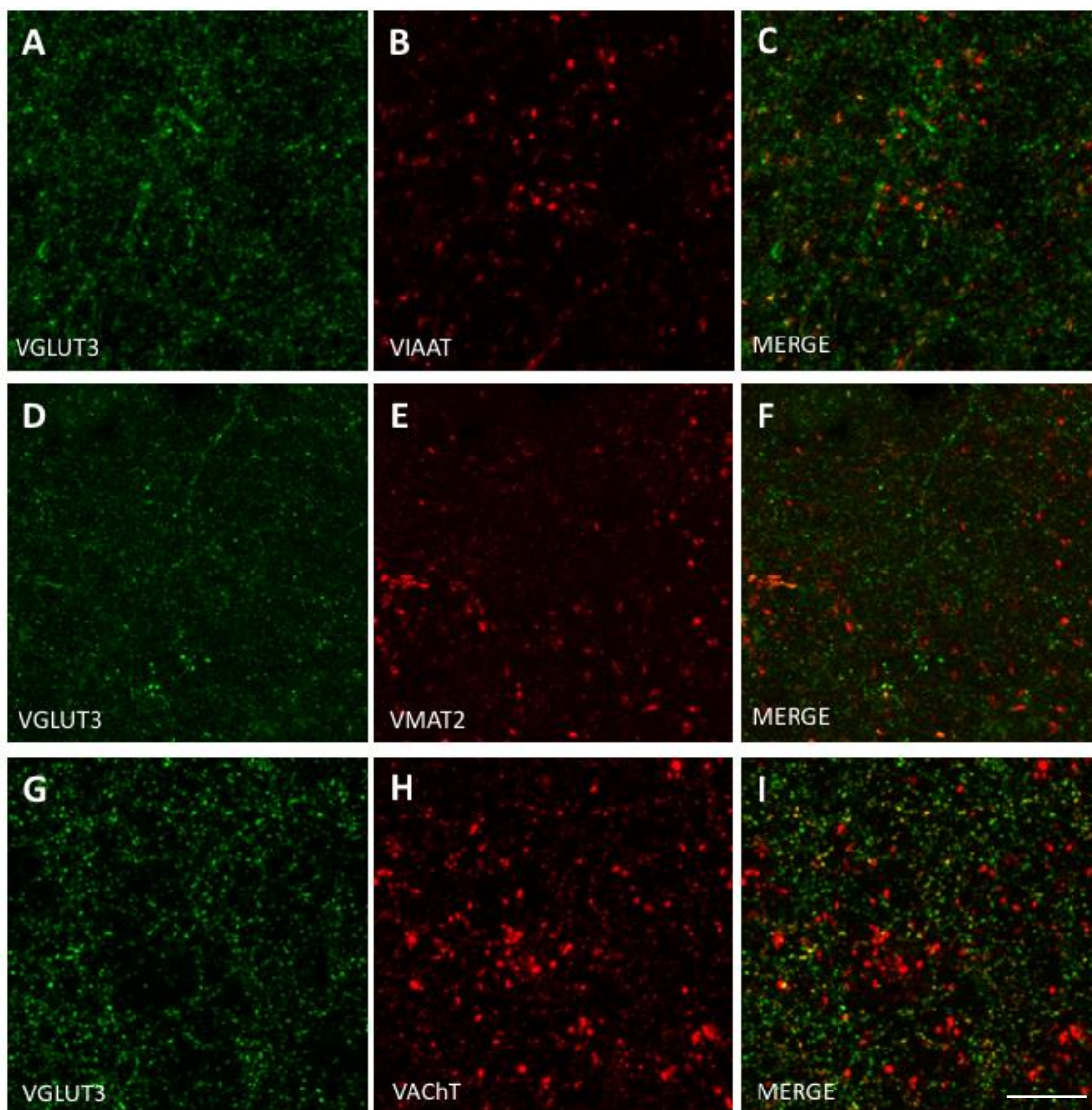


Figure 45 : Expression de VGLUT3 dans les terminaisons GABAergiques, monoaminergiques ou cholinergiques de l'amygdale basolatérale de souris.

A, D et G) VGLUT3 est détecté en vert. B, E, H) VIAAT, VMAT2 et VACHT sont respectivement marqués en rouge. C, F, I) la superposition des marquages en jaune est montrée respectivement pour VGLUT3 et VIAAT, VGLUT3 et VMAT2, VGLUT3 et VACHT. Echelle : 10µm.

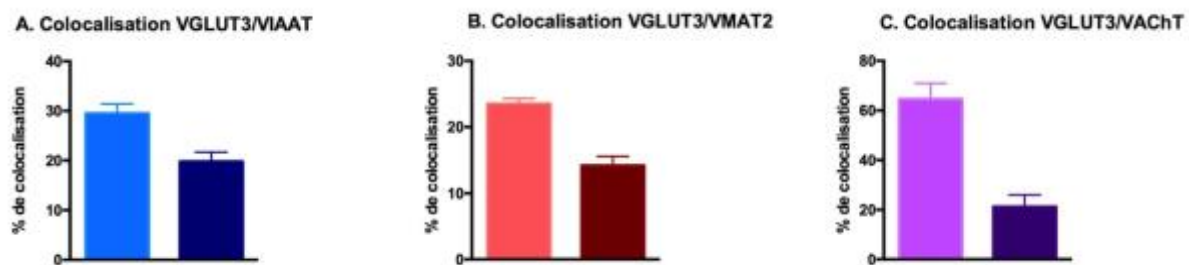


Figure 46 : Quantification de la co-localisation de VGLUT3 avec les protéines VIAAT, VMAT2 et VACHT dans les terminaisons nerveuses de l'amygdale basolatérale.

Les histogrammes clairs représentent le pourcentage de neurones VGLUT3 positifs exprimant VIAAT (A), VMAT2 (B) ou VACHT (C), alors que les histogrammes sombres représentent le pourcentage de neurones VIAAT positifs (A), VMAT2 positifs (B) ou VACHT positifs (C) exprimant VGLUT3.

L'analyse statistique réalisée sur l'ensemble des animaux montre que le nombre de terminaisons GABAergiques, monoaminergiques ou cholinergiques VGLUT3-positives de l'amygdale n'est pas significativement différent d'une souris à l'autre (données non présentées ; respectivement $F(3,12)=2,197$, $p=0,1412$; $F(3,12)=1,250$, $p=0,3351$; $F(3,12)=3,143$, $p=0,0651$, one-way ANOVA). Le même résultat est observable pour les terminaisons VIAAT-, VMAT2- ou VACHT-positives qui expriment VGLUT3 (respectivement $F(3,12)=3,162$, $p=0,0643$; $F(3,12)=3,315$, $p=0,0571$; $F(3,12)=2,247$, $p=0,1141$, one-way ANOVA).

Ainsi, il apparaît que les terminaisons nerveuses VGLUT3-positives sont de différentes natures (monoaminergique, GABAergique et cholinergique) et que la majorité de ces terminaisons VGLUT3-positives projetant dans la BLA sont cholinergiques.

III.2/ Immunofluorescences VGLUT3 et PV ou CCK

Etant donné que la population des neurones GABAergiques est très hétérogène, j'ai cherché à caractériser plus précisément la nature de ces interneurons GABAergiques VGLUT3 positifs. Je me suis orientée vers les interneurons « en panier » (*basket cells*) car il s'avère que ce sont ceux retrouvés dans l'hippocampe et le cortex (Fasano, 2017; Somogyi et al., 2004). Au sein de ce type d'interneurones, il existe deux sous catégories : ceux exprimant PV et d'autres possédant la CCK (Capogna, 2014; Somogyi et al., 2004; Spampanato et al., 2011). J'ai donc réalisé des doubles immunofluorescences dirigées contre VGLUT3 et PV ou CCK.

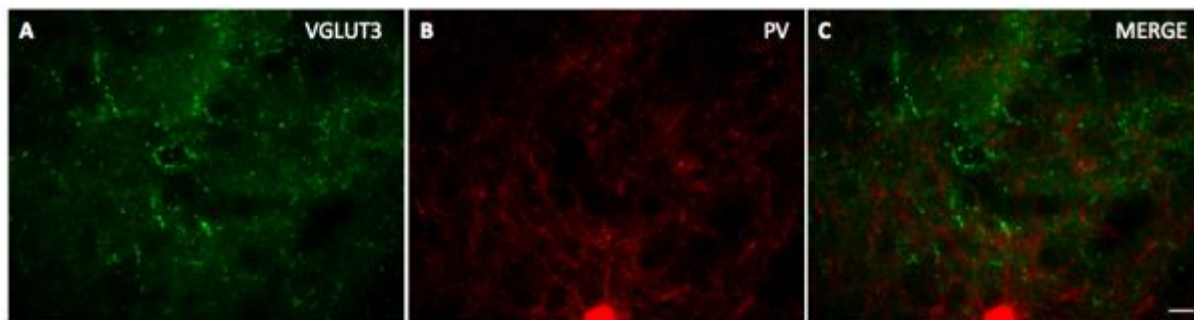


Figure 47 : Expression de VGLUT3 et de PV dans la BLA.

A) Localisation de VGLUT3 en vert. B) Localisation de PV en rouge. C) Aucune co-localisation n'est observé entre les deux types de marquages. Echelle : 20 μ m.

Les résultats montrent que les interneurons exprimant PV ne possèdent pas VGLUT3 dans l'amygdale basolatérale (**Figure 47**). En revanche, VGLUT3 est présent dans les interneurons GABAergique CCK positifs de la BLA (**Figure 48**). On remarque que la colocalisation du marquage VGLUT3 et CCK se fait au niveau des terminaisons nerveuses autour des somas d'autres neurones. Cette localisation est caractéristique des interneurons « en panier » (Somogyi and Klausberger, 2005; Somogyi et al., 2004).

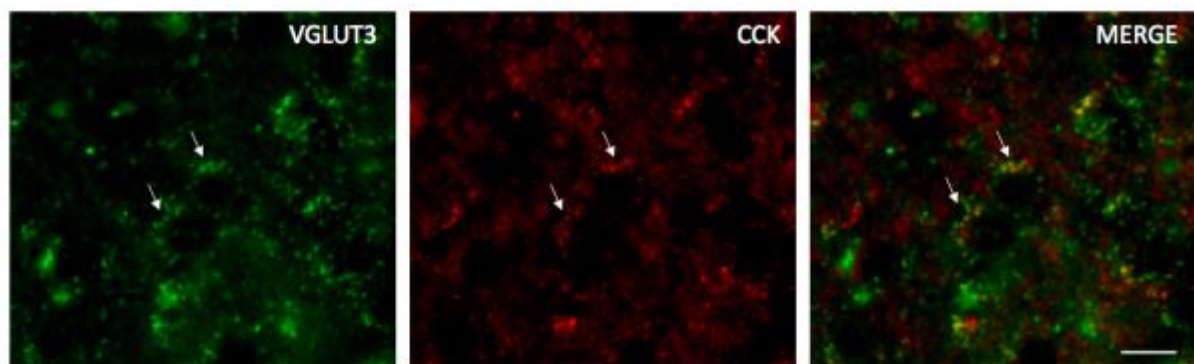


Figure 48 : Localisation de VGLUT3 et de CCK dans la BLA.

A) Localisation de VGLUT3 en vert. B) Localisation de CCK en rouge. C) La co-localisation observé en jaune entre VGLUT3 et CCK se trouve autour des somas d'autres neurones au niveau des terminaisons synaptiques. Les flèches blanches indiquent les zones de co-localisation. Echelle : 30 μ m.

Ainsi, il semble que VGLUT3 soit uniquement exprimé dans une sous-population d'interneurones GABAergiques « en panier » possédant la CCK dans l'amygdale basolatérale.

IV/ Discussion

Cette étude nous a permis de définir de nombreuses caractéristiques concernant les terminaisons VGLUT3 positives de l'amygdale basolatérale.

En effet, elles semblent être de natures différentes. On observe ainsi des terminaisons VGLUT3 positives GABAergiques, monoaminergiques et cholinergiques.

Au sein de ces terminaisons, une population se distingue représentant plus de la majorité de celles-ci dans la BLA. Il s'agit de projections neuronales cholinergiques VGLUT3 positives. D'après les résultats présentés dans l'étude de Nickerson Poulin à partir d'une technique de traçage rétrograde dans l'amygdale basolatérale, ces terminaisons VGLUT3 cholinergiques proviendraient du cerveau antérieur basal (Nickerson Poulin et al., 2006). Il semblerait donc qu'une source exogène de glutamate existe via cette population de neurones de projection cholinergique VGLUT3 positifs.

De plus, la forte représentation de ces terminaisons cholinergiques VGLUT3 positives laisse présager un rôle important de ces projections dans la régulation du circuit amygdalien à travers la modulation des neurones pyramidaux de la BLA. En effet, un des rôles définis de VGLUT3 étant d'augmenter l'accumulation d'acétylcholine dans les VS, la stimulation de ces neurones cholinergiques VGLUT3 positifs augmenteraient nettement l'activité des neurones principaux de la BLA (Gras et al., 2008).

Une autre population de neurones de projection de nature monoaminergique est identifiée. Il s'agirait plus précisément de terminaisons sérotoninergiques. En effet, VGLUT3 n'a été retrouvé jusqu'à présent que dans des neurones de type sérotoninergique au sein de la population monoaminergique (Amilhon et al., 2010; El Mestikawy et al., 2011; Gras et al., 2002; Shutoh et al., 2008; Somogyi et al., 2004). Ces neurones pourraient provenir du raphé médian (Somogyi et al., 2004) et constitueraient une seconde source exogène de VGLUT3 dans la BLA. En effet, deux types de projections sérotoninergiques provenant du raphé ont été identifiés dans le cortex et l'hippocampe : des terminaisons nerveuses fines provenant majoritairement du raphé dorsal, et des projections plus larges originaires du raphé médian (Freund and Buzsáki, 1996; Kosofsky and Molliver, 1987). Toutefois, d'autres études indiquent que les projections sérotoninergiques de la BLA proviennent majoritairement du raphé dorsal

et de façon plus éparse du noyau médian (Abrams et al., 2004; Jacobs et al., 1978; Vertes, 2004).

Le troisième type de terminaisons retrouvé est GABAergique. La première partie de mon étude anatomique a mis en évidence la présence d'interneurones GABAergiques VGLUT3 positifs locaux. Les seuls neurones GABAergiques identifiés aujourd'hui comme projetant dans la BLA sont les interneurones localisés dans la capsule externe, les ICM_L (Marowsky et al., 2005). Ces interneurones sont exclusivement GABAergiques et n'expriment donc pas VGLUT3. On peut alors présumer que les terminaisons GABAergiques VGLUT3 positives ne proviennent pas de neurones de projection mais correspondent aux terminaisons des interneurones GABAergiques VGLUT3 positifs locaux et constituent ainsi une source endogène de VGLUT3 dans la BLA.

Au vu de la faible quantité d'interneurones GABAergiques exprimant l'ARNm de VGLUT3 face à la proportion relativement importante de ses terminaisons, il semble que l'arborisation axonale et le nombre de collatérales GABAergiques VGLUT3 positives soient importantes dans la BLA laissant suggérer un rôle important de ces interneurones dans la régulation et le contrôle des circuits locaux d'inhibition.

Par ailleurs, ces interneurones GABAergiques VGLUT3 positifs se caractérisent également par l'expression de CCK. Tout comme les interneurones définis dans l'hippocampe et le cortex, il s'agit d'interneurones « en panier » (Somogyi et al., 2004). Cela laisse présager une similarité de propriétés physiologiques et fonctionnelles entre ces populations d'interneurones. Dans l'hippocampe, il a été montré que la perte de VGLUT3 entraîne l'absence de potentialisation à long-terme (LTP), phénomène synaptique nécessaire à l'apprentissage et à la formation de la mémoire, suite à des stimulations hautes fréquences. De plus, la régulation inhibitrice de la transmission GABAergique à travers la présence de VGLUT3 a été mise en évidence par l'existence d'un rétrocontrôle négatif réalisé par la fixation du glutamate libéré sur des récepteurs présynaptiques mGluRs du groupe III (Fasano et al., 2017). Le glutamate libéré par la présence de VGLUT3 semble donc réguler la transmission GABAergique afin d'éviter une inhibition trop importante des neurones principaux.

Une étude récente s'est intéressée à la caractérisation de ces interneurones et a mis en évidence que ces derniers expriment CCK mais également les récepteurs aux endocannabinoïdes de type I (récepteurs CB1) (Omiya et al., 2015). De plus, les contacts synaptiques établis par ces interneurones semblent former des invaginations au sein des neurones principaux post-synaptique de la BLA. Ces résultats sous-entendent des mécanismes

de régulation complexes d'une part au sein de la sous-unité présynaptique, et d'autre part globalement au sein des circuits locaux d'inhibition.

En effet, la présence des récepteurs au glutamate, mGluR5 et à la CCK, CCK2R à la surface de la membrane de l'élément postsynaptique a été identifiée (Omiya et al., 2015). L'activation de ces récepteurs faciliterait la synthèse des endocannabinoïdes, qui une fois fixés sur les récepteurs CB1 présynaptique entraîneraient une inhibition de la libération des NT (GABA, glutamate) (Albayram et al., 2016; Chhatwal et al., 2009; Omiya et al., 2015). D'autre part, des interactions entre CCK et CB1 semblent exister avec l'inhibition de CCK par CB1 (Chhatwal et al., 2009).

Au-delà de son rôle dans la synergie vésiculaire, ces travaux renforcent l'idée que VGLUT3 serait un acteur important des circuits locaux d'inhibition permettant de réguler et moduler la transmission GABAergique.

Points Importants :

Etude I : Caractérisation Anatomique de VGLUT3 dans l'amygdale basolatérale

Résultats :

- Environ 10 % des interneurons GABAergiques sont VGLUT3 positifs dans la BLA
- Les interneurons « en panier » GABA-VGLUT3 sont CCK positifs dans la BLA, et expriment également les récepteurs CB1 (Omiya et al., 2015).

- Dans la BLA, VGLUT3 est présent dans les terminaisons (**Figure 49**) :

- GABAergiques (30%),
- Sérotoninergiques (23%) et
- Cholinergiques (63%)

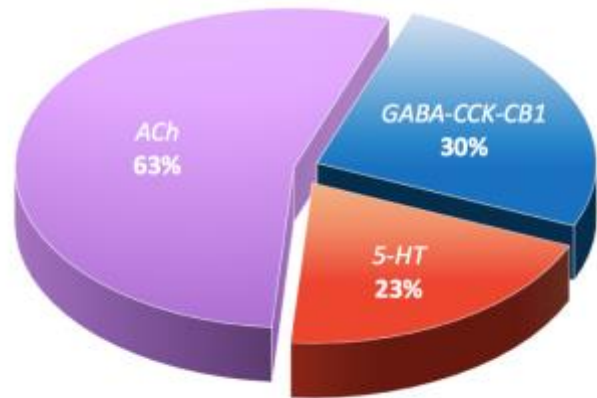


Figure 49 : Distribution des terminaisons VGLUT3 positives de la BLA.

Discussion :

- Il existe une source endogène (interneurones GABAergiques) et deux sources exogènes (neurones de projection 5HT et ACh) de VGLUT3 dans la BLA.
- VGLUT3 serait un acteur important des circuits locaux d'inhibition permettant de réguler et moduler la transmission GABAergique.

*Etude II : Caractérisation Comportementale
de VGLUT3 dans l'amygdale basolatérale*

CHAPITRE I :
LE ROLE DE VGLUT3 DANS LES MEMOIRES AVERSIVES A TRAVERS L'ETUDE DES
SOURIS VGLUT3^{-/-}

I/ Introduction

Dans un premier temps, et afin de déterminer le rôle de VGLUT3 dans les processus d'apprentissage des mémoires aversives, je me suis intéressée à l'étude des souris invalidées constitutivement pour VGLUT3, les souris VGLUT3^{-/-} afin d'analyser l'effet de l'absence global de VGLUT3.

Comme présentée dans l'introduction, les souris VGLUT3^{-/-} se caractérisent par l'absence de VGLUT3 dans des neurones cholinergiques du striatum (**Figure 50**), des interneurons GABAergic du cortex, de l'hippocampe, et de l'amygdale, et des neurones sérotoninergiques du raphé (El Mestikawy et al., 2011; Omiya et al., 2015).

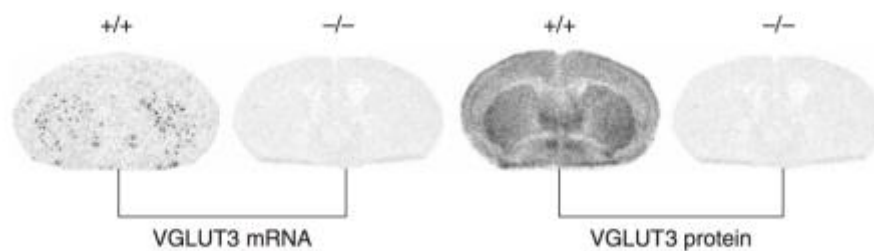


Figure 50 : Distribution de l'ARNm et de la protéine VGLUT3 chez la souris.

Comparaison de la distribution de l'ARNm et de la protéine VGLUT3 entre des souris invalidées constitutivement pour VGLUT3 (-/-) et des souris sauvages (+/+). (D'après Gras et al., 2008)

D'un point de vue comportemental, des études antérieures sur les souris invalidées constitutivement pour VGLUT3 ont permis d'amorcer leur caractérisation phénotypique.

Des études menées au sein de l'équipe ont mis en évidence chez ces souris VGLUT3^{-/-} un phénotype hyperlocomoteur (Gras et al., 2008), ainsi qu'un phénotype de type anxieux (Amilhon et al., 2010). Elles présentent également une hypersensibilité à la douleur due aux stimuli qui accompagnent les inflammations, les lésions nerveuses, et les trauma (Seal et al., 2009). Enfin, il apparaît que les souris VGLUT3^{-/-} montrent une propension à l'addiction à la cocaïne. En effet, l'équipe a montré que ces souris présentent une hypersensibilité locomotrice induite par la prise de cocaïne (Sakae et al., 2015).

Comme je vous l'ai présenté dans la première étude, VGLUT3 est fortement exprimé dans l'amygdale basolatérale, structure clé impliquée dans les processus émotionnels. Par conséquent, dans un premier temps, j'ai cherché à déterminer comment l'absence de VGLUT3 pouvait influencer la mise en place et la plasticité des mémoires aversives en étudiant la mémoire de peur conditionnée (contextuelle et élémentaire) ainsi que son extinction.

Or comme précédemment mentionné, dans le système nerveux périphérique, le 1^{er} relai auditif est glutamatergique et exclusivement VGLUT3 positif. En effet, dans la cochlée, VGLUT3 permet l'accumulation du glutamate dans les VS des cellules cillées internes afin de transmettre les informations sensorielles aux terminaisons nerveuses auditives. Les souris VGLUT3^{-/-} présentent donc une surdité due à l'absence de VGLUT3 (Ruel et al., 2008).

De ce fait, je n'ai pu opter pour un SC sonore tel que classiquement utilisé, mais j'ai dû mettre en place un protocole de conditionnement de peur à la lumière (Bergstrom and Johnson, 2014; Dagnino-Subiabre et al., 2012; Yang et al., 2015).

VGLUT3 ayant été montré comme impliqué dans une forme d'hypersensibilité à la douleur (Seal et al., 2009), j'ai donc avant toute chose, dû évaluer la sensibilité aux chocs des souris VGLUT3^{-/-}.

Une fois ces deux points établis, j'ai ensuite pu étudier la mémoire de peur conditionnée (contextuelle et élémentaire) ainsi que son extinction grâce à un paradigme de conditionnement de peur.

II/ Matériel et Méthodes

II.1/ Protocole de sensibilité à la douleur

Un total de 16 souris (VGLUT3^{+/+}, n=8 ; VGLUT3^{-/-}, n=8) a été utilisé pour ce protocole de sensibilité à la douleur. L'objectif de cette expérience a été de vérifier si l'hypersensibilité à la douleur décrite par Rebecca Seal (Seal et al., 2009) se manifestait suite à la délivrance d'un choc électrique aux pattes. Les paramètres de ce protocole sont les mêmes que ceux décrits dans le Matériel et Méthodes générales (cf page 125).

II.2/ Test du Conditionnement de peur (FC) et d'Extinction

Un nombre de 24 souris (VGLUT3^{+/+}, n=12 ; VGLUT3^{-/-}, n=12) a été utilisé pour chacune des expériences de peur conditionnée et d'extinction.

Pour ces protocoles, étant donné que les souris sont sourdes, la difficulté a été de trouver un stimulus assez saillant qui puisse se démarquer de l'environnement globale.

Ainsi, suite à une succession d'expériences pilotes, un stimulus lumineux de 80 lux clignotant (2sec on / 2 sec off) sur une durée de 20 sec a été choisi.

Les procédures utilisées pour ces deux protocoles suivent celles présentées dans le Matériel et Méthodes générales (cf pages 125-126).

III/ Résultats

III.1/ Sensibilité à la douleur

Pour rappel, au cours de ce protocole, des chocs électriques d'intensité croissante sont délivrés à intervalle de 30 sec. Lorsque l'ensemble des comportements attendus est observé (mouvements, vocalisation, course et saut), l'expérience s'arrête. A chaque apparition d'un de ces comportements, l'intensité du choc correspondante est relevée.

Les résultats de cette expérience montrent que l'arrivée de chacun des comportements observés se déclenche pour une intensité de choc électrique identique entre les souris VGLUT3^{+/+} et les souris VGLUT3^{-/-} à l'exception du comportement de saut (**Figure 51** ; pour les mouvements, $p=0,7277$; pour les vocalisations, $p=0,1229$; pour la course, $p=0,08718$; pour le saut, $p=0,0106$, unpaired t test avec correction de Welch).

En effet, les souris VGLUT3^{+/+} déclenchent leur saut pour une intensité de choc électrique plus élevée que les souris VGLUT3^{-/-} laissant sous-entendre une sensibilité plus forte aux chocs électriques chez les souris VGLUT3^{-/-}. Toutefois, étant donné que cette observation n'est réalisée que pour un des cinq comportements attendus, on ne peut donc pas conclure quant à l'hypersensibilité généralisée des souris VGLUT3^{-/-}.

Ainsi, les souris VGLUT3^{-/-} ne semble pas présenter d'hypersensibilité au choc électrique. Ces résultats nous permettent de valider l'utilisation comme SI d'un choc électrique aux pattes.

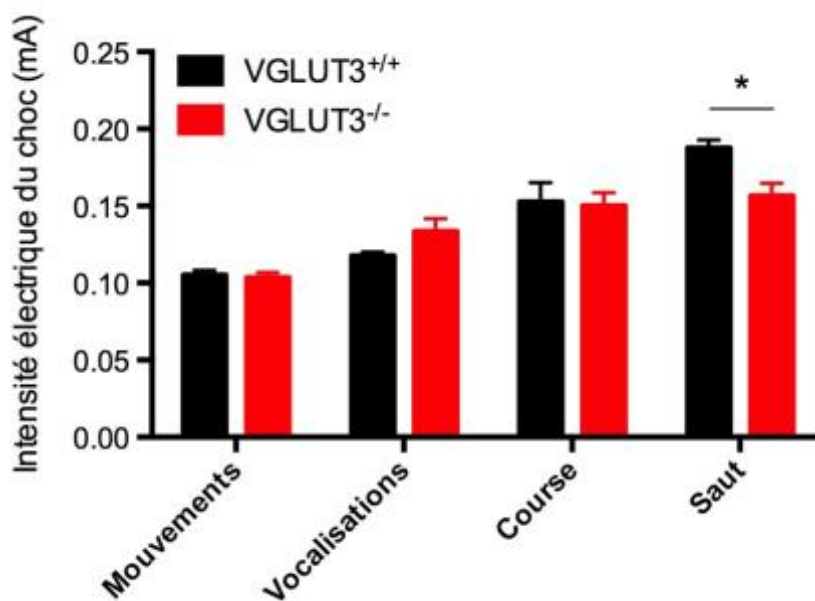


Figure 51 : Les souris VGLUT3^{-/-} ne présentent pas d'hypersensibilité aux chocs électriques délivrés aux pattes.

Le déclenchement des comportements se fait pour la même intensité de choc électrique chez les souris VGLUT3^{+/+} et VGLUT3^{-/-}, à l'exception du saut.

III.2/ Test du conditionnement de peur - FC

Afin d'étudier les mémoires aversives chez la souris, j'ai utilisé un test de peur conditionnée avec comme SC un stimulus discret lumineux.

Etant donné que les souris VGLUT3^{-/-} présentent un phénotype de type anxieux, le niveau de *freezing* est analysé au cours des trois premiers jours d'habituation (**Figure 52 A**) afin de vérifier que le niveau basal de *freezing* ne s'avère pas plus élevé chez les souris VGLUT3^{-/-} que chez les VGLUT3^{+/+} ce qui pourrait fausser les interprétations concernant les mémoires aversives. Les résultats montrent qu'une différence de niveau de *freezing* globale existe entre les deux groupes de souris au cours des trois jours d'habituation ($F(1,22)=4,389$, $p=0,0479$, ANOVA à mesures répétées). Toutefois, les analyses post-hoc ne révèlent pas de différences entre les taux de *freezing* des souris VGLUT3^{-/-} et VGLUT3^{+/+} au sein de chaque journée (pour le Jour1 : $t(66)=1,790$, pour le Jour2 : $t(66)=2,345$, pour le Jour3 : $t(66)=1,486$, test de comparaisons multiples de Sidak). De façon importante, le taux de *freezing* entre les deux groupes lors du troisième jour d'habituation, est identique. De plus, comme nous pouvons le constater sur la **Figure 52 B**, le taux de *freezing* des souris VGLUT3^{-/-} est similaire à celui des animaux contrôle au cours du conditionnement ($F(1,22)=1,540$, $p=0,2277$, ANOVA à

mesures répétées), et en particulier lors des deux premières minutes, c'est-à-dire avant la présentation SC-SI (à 30 sec : $t(176)=0,008743$, à 60 sec : $t(176)=0,6437$, à 90 sec : $t(176)=0,4699$, et à 120 sec : $t(176)=1,025$, test de comparaisons multiples de Sidak).

Les trois jours d'habituation permettent donc aux souris VGLUT3^{-/-} d'atteindre le niveau des souris contrôles. Les animaux partent avec un niveau de *freezing* similaire lors du test comportemental.

Lors du test de mémoire contextuelle, 24h après le conditionnement, les performances des deux groupes sont comparables (**Figure 52 C** ; Moyenne : $p=0,1221$, unpaired t test avec correction de Welch). Toutefois, lorsque l'on regarde de plus près la cinétique du niveau de *freezing*, on remarque que le taux de *freezing* des souris VGLUT3^{+/+} diminue progressivement au cours du test alors que celui des souris VGLUT3^{-/-} reste stable (**Figure 52 C** ; à 360 sec : $t(264)=3,593$, test de comparaisons multiples de Sidak). En effet, lors des trois premières minutes de test, les niveaux de *freezing* sont similaires entre les deux groupes. Cependant, au cours des trois dernières minutes, le niveau de *freezing* chez les souris VGLUT3^{-/-} reste constant alors qu'une diminution de ce taux apparaît pour les souris VGLUT3^{+/+} (**Figure 52 C** ; de 0-180 sec : $t(44)=0,4722$, de 180-360 sec : $t(44)=2,464$, test de comparaisons multiples de Sidak).

Ces résultats tendent à suggérer que les souris VGLUT3^{-/-} ont une mémoire contextuelle plus persistante que les VGLUT3^{+/+}. Toutefois des expériences complémentaires devraient être menées pour explorer plus en profondeur ce phénomène observé.

Dans un deuxième temps, les souris sont introduites dans nouvel environnement (appelé contexte modifié), qu'elles peuvent tout d'abord explorer librement avant le déclenchement du stimulus conditionné (la lumière). Comme présenté sur la **Figure 52 D**, nous constatons que les souris VGLUT3^{+/+} présentent un niveau faible de *freezing* lors de cette première phase d'exploration, qui augmente significativement suite à l'apparition de la lumière ($t(20)=3,188$, test de comparaison multiple de Sidak). L'apprentissage associatif lumière-choc a donc bien lieu.

En revanche, les souris VGLUT3^{-/-} présentent dès la première phase un taux de *freezing* extrêmement important, comparable à celui observé lors de la présence de la lumière ($t(20)=1,544$, test de comparaison multiple de Sidak). Elles se caractérisent par un fort taux de *freezing* constant au cours de l'ensemble du test. Les souris VGLUT3^{-/-} semblent donc réagir au contexte et présentent un comportement de peur dans ce nouvel environnement pourtant non associé au stimulus aversif.

Ces résultats suggèrent que les animaux VGLUT3^{-/-} pourraient présenter un phénomène de généralisation au contexte, une des caractéristiques du trouble de stress post-traumatique. Toutefois, étant donné que le niveau de *freezing* observé le Jour 1 de l'habituation (**Figure 52 A**) est similaire à celui apparaissant pendant la phase d'exploration du test au contexte modifié (**Figure 52 D**), on pourrait également supposer qu'il s'agirait d'une forme de néophobie.

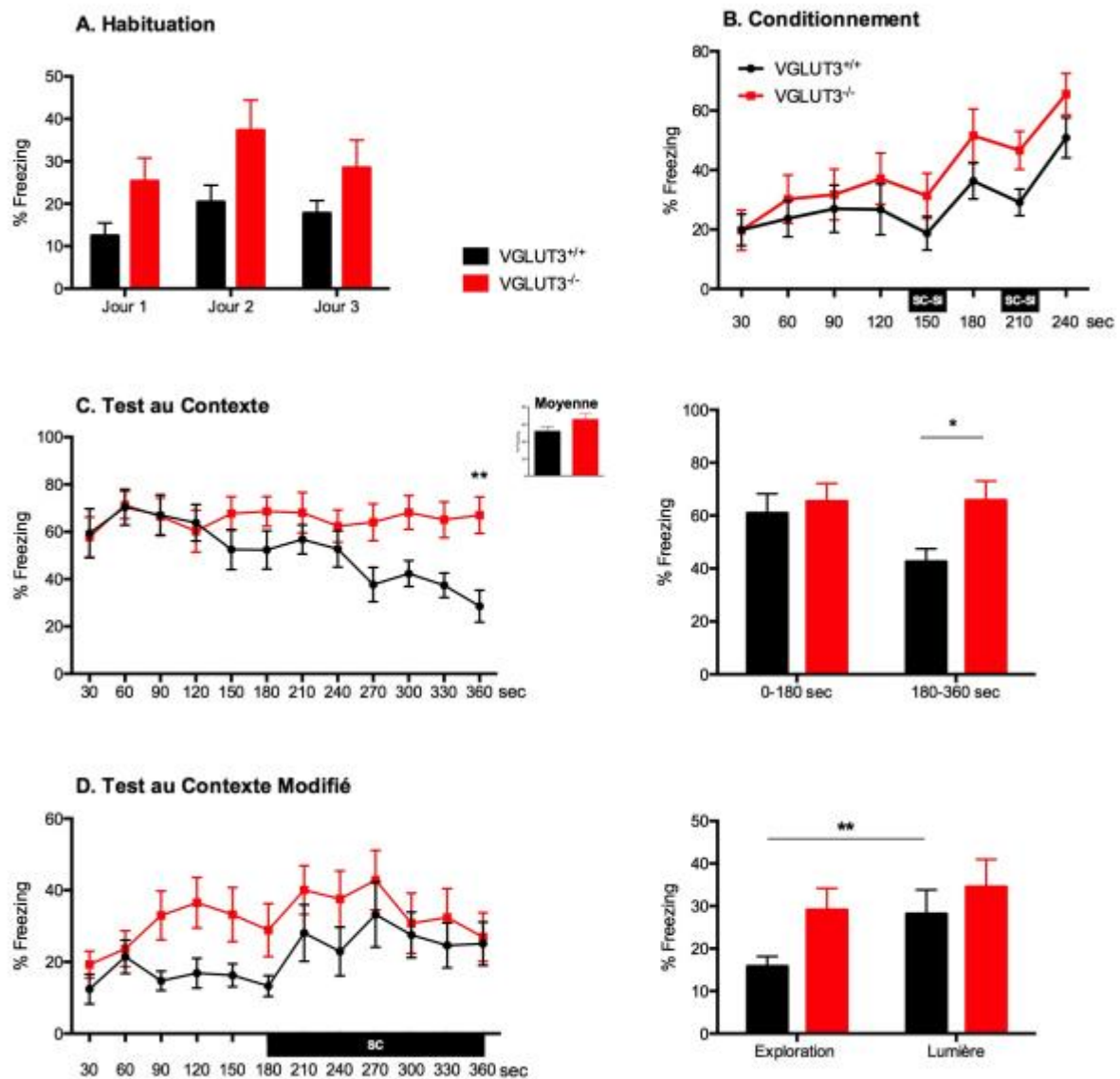


Figure 52 : Conditionnement de peur chez les souris VGLUT3^{-/-}.

A) Le niveau de *freezing* n'est pas significativement différent au cours des trois jours d'habituation entre les souris VGLUT3^{+/+} et VGLUT3^{-/-}. B) L'apprentissage de peur conditionnée est similaire entre les deux groupes de souris. C) La mémoire contextuelle est plus stable chez les souris VGLUT3^{-/-}. D) L'association SC-SI a lieu pour les souris VGLUT3^{+/+}, mais pas pour les souris VGLUT3^{-/-}.

III.3/ Test d'Extinction de conditionnement de peur

Une des thérapies actuelles utilisée pour guérir les personnes atteintes de TSPT, est une thérapie comportementale, basée sur l'extinction de la mémoire de peur.

Dans ce contexte, et afin de caractériser au mieux les phénotypes observés chez les animaux VGLUT3^{-/-}, un protocole d'extinction de peur a été réalisé.

Lors du conditionnement, l'animal est exposé dans un premier contexte (contexte A) à 10 présentations du couple lumière-choc électrique. L'extinction consiste en la présentation dans un second contexte (contexte B) de la lumière seule et ceci pendant une semaine.

Les résultats présentés dans la **Figure 53, A** montrent un retour au niveau de *freezing* basal au jour 8 comparable entre les deux groupes ($t(154)=1,435$, test de comparaison multiple de Sidak). Les deux groupes présentent bien une extinction de leur mémoire de peur ($F(6,132)=27,87$, $p<0,0001$, ANOVA à mesures répétées).

Lorsque l'on regarde les niveaux de *freezing* jour par jour sur la **Figure 53 A**, on observe que les souris VGLUT3^{-/-} présentent une cinétique d'extinction plus rapide que les souris VGLUT3^{+/+}. Toutefois, un seul point est significativement différent entre les deux groupes à la 10^e présentation du SC le jour 3 ($t(1540)=3,809$, test de comparaison multiple de Sidak). J'ai donc cherché à déterminer la performance de ces souris dans l'apprentissage d'extinction à l'aide d'un indice de progression (**Figure 53 B**). Il s'agit de déterminer pour chaque jour, la diminution de *freezing* réalisée entre la 1^{ère} présentation du SC et la dernière. On remarque que l'indice de progression de l'extinction des souris VGLUT3^{-/-} est supérieur à celui des contrôles tout au long de la semaine d'extinction (**Figure 53 B** ; courbe de gauche : $F(1,22)=6,395$, $p=0,0191$, ANOVA à mesures répétées). Les souris VGLUT3^{-/-} réalisent un meilleur apprentissage d'extinction que les souris VGLUT3^{+/+} (**Figure 53 B** ; histogramme de droite : $p=0,0051$, unpaired t test avec correction de Welch).

Ainsi, il semblerait que cette invalidation constitutive de VGLUT3 facilite l'extinction de la mémoire de peur.

Dans un troisième temps, les animaux sont ré-exposés au contexte d'origine et leur mémoire de peur évaluée (**Figure 53 C**). Au cours de ce test, on observe un fort niveau de *freezing* pour les premières présentations de lumière (autour de 70% à la 1^{ère} présentation du SC pour les deux groupes de souris) qui diminue pour arriver à un niveau basal et similaire aux dernières présentations pour les souris VGLUT3^{-/-} et leurs contrôles (à la 10^e présentation du SC (L10) : $t=0,7789$, test de comparaison multiple de Sidak). Les souris VGLUT3^{-/-} présentent

un niveau de *freezing* plus important que les souris VGLUT3^{+/+} au cours de la première partie du *renewal* (**Figure 53 C** ; courbe de gauche ; L2 : t(220)=2,971, L3 : t(220)=3,773, L4 : t(220)=2,859, test de comparaison multiple de Sidak ; graphique de droite : L1-L5 : t(44)=4,076, test de comparaison multiple de Sidak).

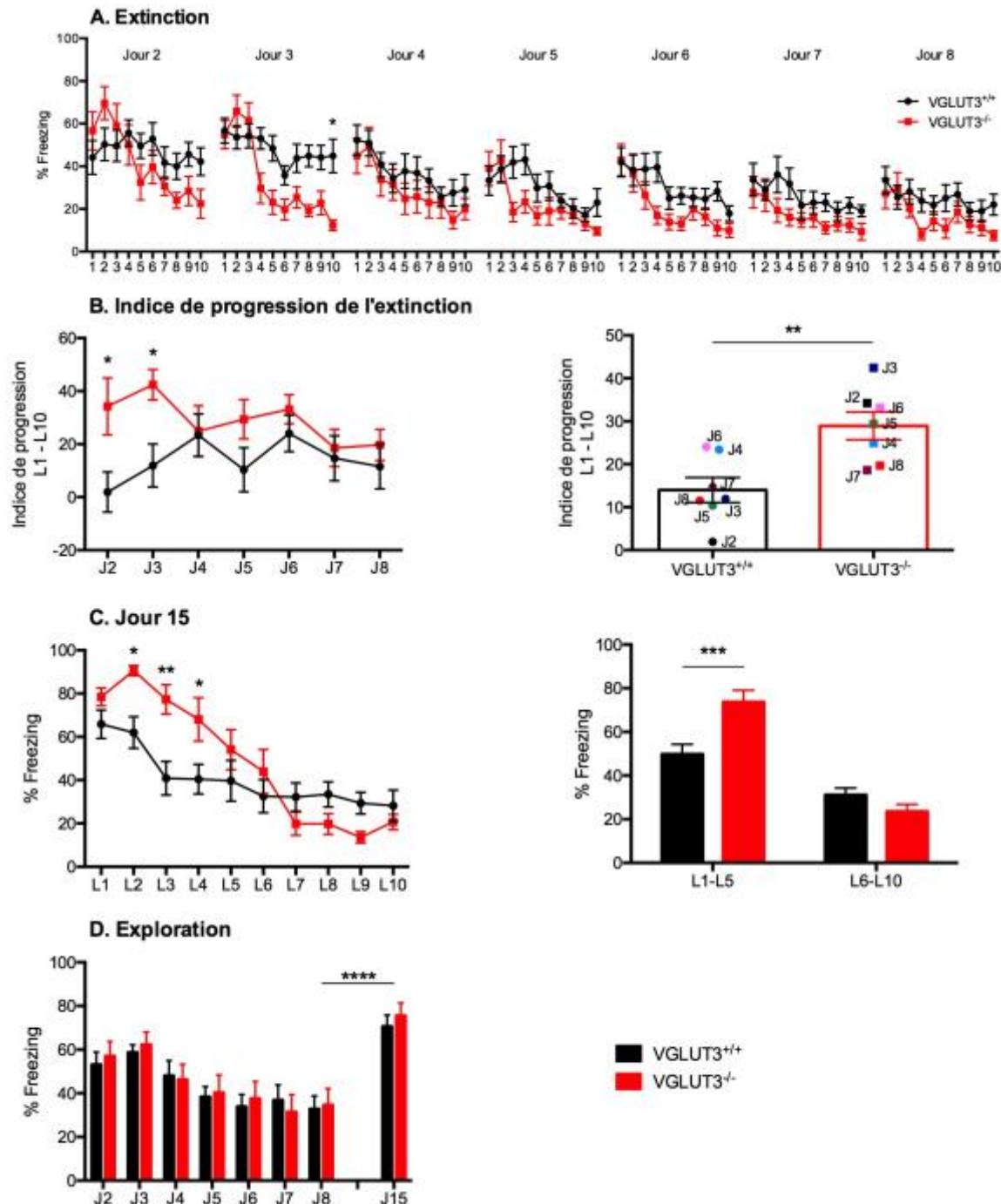


Figure 53 : Extinction de peur chez les souris VGLUT3^{-/-}.

A-B) L'apprentissage d'extinction est facilité chez les souris VGLUT3^{-/-} par rapport aux contrôles. C) La mémoire original du conditionnement semble meilleure suite à la perte constitutive de VGLUT3. D) Le niveau de *freezing* au cours des deux premières minutes d'exploration ne semble pas différent entre les deux groupes. Une augmentation significative est observée lorsque les animaux sont ré-exposés à l'environnement du conditionnement au jour 15 (J15).

Ces résultats suggèrent que les souris VGLUT3^{-/-} ont une meilleure mémoire du conditionnement original que les souris VGLUT3^{+/+} car elles ont associé plus fortement le choc au SC et au contexte du conditionnement. On remarque également que l'extinction au SC est plus rapide chez les souris VGLUT3^{-/-} ce qui renforce l'idée de l'établissement d'une meilleure mémoire.

Lorsque l'on regarde les deux premières minutes d'exploration libre au cours de l'extinction, on remarque que le niveau de *freezing* est important (environ 60% au J2) et aucune différence n'apparaît entre les deux groupes (**Figure 53 D** ; $F(1,22)=0,04666$, $p=0,8310$, ANOVA à mesures répétées). Le jour 15 on remarque que le niveau de *freezing* est significativement plus haut qu'au J8 car le contexte a été associé au stimulus aversif lors du conditionnement (souris VGLUT3^{-/-} : $t(154)=7,272$, souris VGLUT3^{+/+} : $t(154)=6,722$, test de comparaison multiple de Sidak).

IV/ Discussion

L'étude des souris invalidées constitutivement pour VGLUT3 nous a permis de mettre en évidence un rôle important joué par ces réseaux VGLUT3 positifs dans les mémoires émotionnelles. Trois processus différents des mémoires aversives semblent particulièrement touchés entraînant les phénotypes suivants :

- 1/ la généralisation de la mémoire contextuelle,
- 2/ une mémoire contextuelle plus forte et stable, et
- 3/ la facilitation de l'extinction.

La généralisation au contexte correspond à une défaillance de discrimination entre un environnement neutre et un environnement associé à une valence aversive (Ehrlich et al., 2009; Lee et al., 2013). Au cours de l'exploration du nouvel environnement pendant le test élémentaire, le niveau de *freezing* des souris VGLUT3^{-/-} est important ce qui signifie que ces souris réagissent à ce nouveau contexte qu'elles ne considèrent pas comme étant sécurisant. Il s'avère que deux structures sont impliquées majoritairement dans ce phénotype comportemental : le noyau basomédial de la BLA (BMA), et l'hippocampe dorsal.

En effet, une étude a montré que le noyau basomédial de l'amygdale joue un rôle essentiel dans la différenciation des environnements. Son activation entraîne une diminution des niveaux de *freezing* et d'anxiété. D'autre part, le BMA reçoit des afférences provenant du CPFm (comprenant la région IL) qui favorise l'extinction (Adhikari et al., 2015). On peut alors supposer que l'augmentation de l'inhibition des neurones principaux de la BMA est impliquée dans l'altération des circuits menant à la généralisation contextuelle.

Par ailleurs, des études ont montré le rôle essentiel de l'hippocampe dorsal dans la séparation de pattern et la discrimination de différents contextes spatiaux les uns par rapport aux autres à travers la formation d'ensembles de neurones distincts répondant et représentant des contextes spécifiques (Frankland et al., 1998; Guzowski et al., 2004). De plus, il apparaît que des lésions des fibres cholinergiques du BF projetant dans l'hippocampe dorsal entraîne une généralisation contextuelle (Knox and Keller, 2016). Cela suggérerait que l'activité des neurones principaux est diminuée par l'inhibition de la transmission cholinergique dans l'hippocampe dorsal.

Il semble ainsi que l'altération de l'activité des neurones principaux de la BMA et de l'hippocampe dorsal par une diminution de leur excitation est impliquée dans le processus de généralisation de la mémoire contextuelle. D'autre part, les défaillances d'activité de ces neurones principaux pourraient perturber de potentielles connexions établies entre l'hippocampe dorsal et l'amygdale au cours du conditionnement de peur. En effet, les seules connexions clairement identifiées sont celles formées entre l'amygdale et l'hippocampe ventrale (Felix-Ortiz et al., 2013; Herry et al., 2008; Narayanan et al., 2007).

D'autres résultats indiquent que l'augmentation de la transmission GABAergique permet la différenciation contextuelle (Ehrlich et al., 2009). En effet, l'invalidation constitutive de GAD65 (enzyme de synthèse du GABA) entraîne une généralisation contextuelle de peur (Bergado-Acosta et al., 2008), tout comme la perte génétique des récepteurs GABA_B présynaptiques (Shaban et al., 2006).

Or, on retrouve dans la BMA des souris des interneurones GABAergiques CCK-CB1-VGLUT3 positifs d'après les résultats de mon étude anatomique et la littérature (Omiya et al., 2015). Initialement, la perte de VGLUT3 est associée à une diminution de libération du NT auquel il est associé (Amilhon et al., 2010; Gras et al., 2008). Toutefois, à partir de mes résultats dans l'étude I, il semblerait que VGLUT3 ait un rôle modulateur dans les interneurones GABAergiques VGLUT3 positifs. Son absence ne permettrait plus le rétrocontrôle négatif du glutamate sur la libération du GABA. On observerait alors une augmentation de la transmission GABAergique par la perte de VGLUT3 dans ces interneurones. Ainsi, il se pourrait que

l'augmentation massive de GABA dans la BMA entraîne l'inactivation des neurones pyramidaux.

D'autre part, des interneurons GABAergiques CCK-CB1-VGLUT3 positifs ont également été retrouvé dans l'hippocampe. Il se peut alors que les neurones pyramidaux de l'hippocampe dorsal soient également sujet à une augmentation de l'inhibition.

Par conséquent, la diminution de l'activité des neurones pyramidaux de ces deux structures entraînant l'affaiblissement des connexions potentielles et réciproques amygdale-hippocampe dorsal pourrait être à l'origine de ce phénomène de généralisation.

Etant donné qu'une augmentation ou une inhibition excessive de GABA mènent à la généralisation contextuelle, on peut alors supposer que le rôle du GABA dans ce processus est de moduler et réguler la balance inhibitrice au sein des structures mises en jeu.

Par ailleurs, les souris VGLUT3^{-/-} montrent une mémoire contextuelle plus stable. Ce processus mnésique fait également intervenir l'amygdale et l'hippocampe dorsal. L'implication de l'hippocampe dorsal dans la mémoire contextuelle a notamment été mise en évidence à travers le système cholinergique. En effet, l'inhibition de l'acétylcholine estérase (enzyme transformant l'ACh en choline) dans l'hippocampe dorsal et l'utilisation d'agonistes aux récepteurs nAChR augmentent la mémoire contextuelle (Davis et al., 2007; Kenney et al., 2012; Rogers and Kesner, 2004).

Par ailleurs, cette augmentation mnésique pourrait être due à une augmentation de l'activation des neurones de peur de la BLA qui projettent dans la région PL du CPFm impliquée dans les états de haut niveau de peur (Ehrlich et al., 2009; Herry et al., 2008; Lee et al., 2013; Senn et al., 2014; Vogel et al., 2016). L'activité plus importante des neurones de peur pourrait être induite par le renforcement d'afférences provenant de structures extérieures, et notamment du BF et de l'hippocampe dorsal.

En effet, d'après mes résultats anatomiques, la BLA est composée de nombreuses terminaisons VGLUT3 positives provenant majoritairement des neurones de projection cholinergiques VGLUT3-positifs du BF. Il est possible que la perte de VGLUT3 entraînant une augmentation de libération d'ACh dans la fente synaptique, mène à une augmentation de l'excitation des neurones de peur qui faciliterait les réponses de peur.

Par ailleurs, en ce qui concerne l'hippocampe, il a été montré que l'hippocampe ventral projette vers les neurones de peur de la BLA (Herry et al., 2008). Toutefois, il semble que son rôle ne soit pas d'augmenter l'activité de ces neurones ou de renforcer la voie des états de haut niveau de peur. En effet, il s'avère que l'hippocampe ventral projette vers les interneurons du PL

entraînant une inhibition des neurones principaux (Sotres-Bayon et al., 2012). Ainsi, pour contrebalancer ces effets, il se pourrait que des projections de l'hippocampe dorsal innervent ces neurones de peur ayant pour but de renforcer leur activation. En effet, les neurones principaux de l'hippocampe dorsal pourraient être plus fortement activés en raison de la plus forte désinhibition générée par l'absence de VGLUT3 dans les interneurons GABAergiques CCK-VGLUT3 présents dans l'hippocampe à travers des systèmes de désinhibition (El Mestikawy et al., 2011). L'HPC_D ne projetant pas directement sur la BLA, l'augmentation de l'activation des neurones de peur serait consécutive à une augmentation de l'activité de neurones d'aires parahippocampiques, relais supposés entre l'HPC_D et la BLA (McDonald and Mott, 2017).

Ainsi, l'apparition d'une mémoire contextuelle anormalement stable serait due à l'augmentation de l'activation des neurones de peur impliqués dans la voie des états de haut niveau de peur consécutive à l'augmentation de la transmission GABAergique générée par l'absence de VGLUT3.

Ensuite, les souris VGLUT3^{-/-} semblent avoir une meilleure mémoire d'extinction. En effet, on observe que leur niveau de *freezing* diminue plus rapidement et de façon plus importante lors des présentations du SC au cours de la même journée. Ce phénomène est particulièrement marqué au début de l'extinction. Les souris VGLUT3^{-/-} semblent donc apprendre plus rapidement que le SC n'est plus associé au choc électrique dans ce nouveau contexte.

L'extinction implique un type particulier de neurones de la BLA, les neurones d'extinction qui projettent vers la région IL du CPFm (Duvarci and Pare, 2014; Herry et al., 2008; Senn et al., 2014; Vertes, 2004; Vogel et al., 2016). Des études ont mis en évidence que l'apprentissage d'extinction s'accompagne d'une augmentation de l'inhibition locale dans la BLA (Ehrlich et al., 2009). En effet, l'extinction de peur est associée à une augmentation du nombre de récepteurs de liaison aux benzodiazépines et des niveaux d'ARNm de composés postsynaptiques comme les sous-unités $\alpha 2$ et $\beta 2$ des récepteurs GABA_A et la géphyrine (protéine structurale des synapses GABAergiques) (Chhatwal et al., 2005a; Heldt and Ressler, 2007).

Chez nos souris VGLUT3^{-/-}, l'augmentation excessive de l'inhibition GABAergique stimulerait fortement la voie impliquée dans l'extinction à travers les connexions entre les neurones d'extinction et les neurones principaux de l'IL entraînant la facilitation de l'extinction.

Cette augmentation de la transmission GABAergique supposée induite par l'absence de VGLUT3 dans les interneurons GABAergiques CCK-VGLUT3 positifs pourrait entraîner l'augmentation de l'activation des neurones d'extinction, et participer au switch entre l'activité des neurones de peur vers celle des neurones d'extinction. En effet, une balance d'activité entre ces deux types de neurones semble exister afin de privilégier l'une ou l'autre des voies impliquant les mémoires aversives, à savoir la voie des états de haut niveau de peur ou celle de l'extinction (Herry et al., 2008; Lee et al., 2013; Senn et al., 2014).

Cette activation de neurones d'extinction pourrait passer par leur désinhibition. En effet, des systèmes de désinhibition des neurones principaux de la BLA ont déjà été identifiés faisant intervenir les interneurons PV et SOM. Des travaux ont montré que les interneurons PV sont capables d'inhiber les interneurons SOM permettant la désinhibition des neurones pyramidaux (Wolff et al., 2014). Ainsi, une forte désinhibition des neurones d'extinction pourrait s'opérer à travers l'inhibition des interneurons projetant sur ces neurones d'extinction par les interneurons GABA-CCK-VGLUT3. Les neurones d'extinction peuvent alors activer la région IL du CPFm.

De plus, une étude a mis en évidence que la stimulation des afférences du CPFm projetant vers la BLA, induit une inhibition des cellules principales probablement par l'activation d'interneurons GABAergiques (Rosenkranz and Grace, 2002b).

On peut alors supposer que les neurones principaux de l'IL activent en retour les interneurons GABA-CCK-VGLUT3 de la BLA qui vont fortement inhiber les neurones de peur par l'augmentation de la transmission GABAergique due à l'absence de VGLUT3.

Ainsi, la réalisation du switch entre l'activité des neurones de peur et d'extinction pourrait être observée conduisant à l'observation du phénotype comportementale d'extinction facilitée.

*Etude II : Caractérisation Comportementale
de VGLUT3 dans l'amygdale basolatérale*

CHAPITRE II :
LE ROLE DES DIFFERENTS SOUS-SYSTEMES VGLUT3 POSITIFS DANS LES MEMOIRES
AVERSIVES

I/ Introduction

La première partie de notre étude nous a permis de mettre en évidence le rôle de VGLUT3 dans les mémoires aversives à travers les souris VGLUT3^{-/-}. En effet, il apparaît que ces souris présentent une généralisation de la mémoire contextuelle, une mémoire contextuelle plus stable, et une facilitation de l'extinction. Toutefois, cette approche globale touche l'ensemble des systèmes du SNC et ne nous permet donc pas de définir l'implication de chacun des sous-systèmes dans les phénotypes décrits.

Pour répondre à cette interrogation, nous avons choisi une approche génétique d'inactivation par croisement entre des souris VGLUT3^{flox} et SERT-CRE, VIAAT-CRE, ou bien ChAT-CRE afin de générer des animaux invalidés spécifiquement pour VGLUT3 dans le sous-système sérotoninergique, GABAergique ou cholinergique respectivement.

Le système sérotoninergique est impliqué dans la régulation des émotions aversives tel que l'anxiété et la peur (Deakin and Graeff, 1991; Lowry et al., 2005).

En effet, le traitement pharmacologique le plus couramment prescrit contre la dépression et l'anxiété se caractérise par l'administration d'inhibiteurs spécifiques de la recapture de sérotonine, les SSRI (Preskorn et al., 2004). Il apparaît que ce blocage de recapture du 5-HT module l'activation de l'amygdale face à des stimuli émotionnel (Bigos et al., 2008; Godlewska et al., 2012; Murphy et al., 2009). D'autre part, comme mentionnée précédemment dans le chapitre portant sur les souris VGLUT3^{-/-}, ces dernières présentent un phénotype de type anxieux (Amilhon et al., 2010). L'existence de ce phénotype serait alors conséquente à la perturbation du système sérotoninergique par l'absence de VGLUT3. Ainsi, on s'attendrait à observer un comportement de type anxieux chez les souris invalidées pour VGLUT3 dans les neurones sérotoninergiques par rapport aux souris contrôles.

Par ailleurs, de divers et nombreux récepteurs sont exprimés à la surface des neurones de l'amygdale qui reçoivent des projections sérotoninergiques majoritairement du raphé dorsal et de façon plus éparse du noyau médian (Abrams et al., 2004; Jacobs et al., 1978; Vertes, 2004). Il apparaît que ces neurones 5-HT de projection jouent un rôle dans les processus d'apprentissage de peur. Il a été montré que la présentation d'un SC précédemment associé à un choc électrique entraîne une augmentation de l'expression de c-Fos dans ces neurones (Spannuth et al., 2011). D'autres études ont mis en évidence que les présentations du SC et du SI entraînent une augmentation de libération de 5-HT dans la BLA suggérant une modulation

des circuits de la BLA pendant le conditionnement de peur (Amat et al., 1998; Kawahara et al., 1993; Zanoveli et al., 2009). Dans le même sens, d'autres auteurs ont montré que l'augmentation transitoire des niveaux de 5-HT extracellulaire par des moyens pharmacologiques facilite l'acquisition et l'expression du conditionnement de peur (Browning et al., 2007; Burghardt et al., 2004, 2007; Grillon et al., 2007). D'autre part, des lésions des fibres 5-HT projetant vers la BLA entraînent une diminution du niveau de *freezing* suite à la présentation du SC (pendant l'acquisition et le rappel) et du contexte du conditionnement (lors du rappel) (Izumi et al., 2012; Johnson et al., 2015). Cela laisse supposer que la diminution de 5-HT au niveau des contacts synaptiques perturbent l'apprentissage du conditionnement de peur. Or, l'absence de VGLUT3 chez les souris VGLUT3^{-/-}, à travers son rôle dans la synergie vésiculaire entraîne une diminution de la libération de 5-HT dans la fente synaptique (Amilhon et al., 2010). On s'attendrait alors à observer des altérations des mémoires aversives chez les souris invalidées pour VGLUT3 dans les neurones sérotoninergiques. Néanmoins, d'après mon étude anatomique, seulement 23% des terminaisons VGLUT3 positives sont 5-HT et 86% des terminaisons 5-HT n'expriment pas VGLUT3 dans la BLA. On peut alors se demander si la diminution de 5-HT induite par l'absence de VGLUT3 est suffisante pour perturber l'apprentissage de peur conditionnée.

Pour ce qui est de la locomotion, ce sont les souris invalidées pour VGLUT3 dans les neurones cholinergiques qui pourraient présenter un phénotype locomoteur différent puisque ce dernier fait intervenir principalement le striatum. En effet, une étude menée précédemment au laboratoire a mis en évidence la présence d'un phénotype hyperlocomoteur chez les souris VGLUT3^{-/-} expliquant sa présence par la perte de VGLUT3 dans les interneurons cholinergiques VGLUT3 positifs du striatum (Gras et al., 2008).

D'après ma caractérisation anatomique, la majorité des terminaisons VGLUT3 positives du noyau basolatéral de l'amygdale sont cholinergiques et proviendrait du BF (Nickerson Poulin et al., 2006) et seulement 20% des terminaisons cholinergiques de la BLA expriment VGLUT3. De nombreuses études ont montré l'implication du système cholinergique dans la peur conditionnée. En effet, il a été montré que des lésions des fibres cholinergiques du BF projetant dans le cortex préfrontal et l'hippocampe entraînent une généralisation contextuelle et une résistance à l'extinction (Knox and Keller, 2016). Des activations optogénétiques des terminaisons cholinergiques provenant du BF dans la BLA conduisent à une résistance de l'extinction, alors que l'inactivation de ces projections mènent à une diminution de l'apprentissage de la peur conditionnée, et une diminution de la mémoire élémentaire (Jiang et

al., 2016). De plus, l'utilisation d'antagonistes des récepteurs mAChR et nAChR entraînent une diminution de *freezing* au cours du rappel élémentaire et de l'extinction (Jiang et al., 2016). De ce fait, l'inactivation de VGLUT3 dans la population cholinergique globale et notamment dans les neurones de projection de la BLA constituant la principale source de VGLUT3, pourraient générer des modifications des comportements de peur chez les souris VGLUT3^{fllox-ChATCRE}.

Enfin, l'inactivation spécifique de VGLUT3 dans les interneurons GABA pourraient altérer l'apprentissage émotionnelle. En effet, les circuits d'inhibition locaux de la BLA jouent un rôle majeur dans l'acquisition et l'expression du conditionnement de peur (Ehrlich et al., 2009; Lee et al., 2013; Wolff et al., 2014). Ils permettent de moduler l'activité des neurones pyramidaux de la BLA, et notamment les neurones de peur et d'extinction qui sont impliqués respectivement dans les voies des états de haut niveau de peur et d'extinction, permettant ainsi le switch entre ces deux voies au cours des différents processus traitant des mémoires aversives (Herry et al., 2008, 2010; Lee et al., 2013; Senn et al., 2014). Toutefois, seulement 30% des terminaisons GABAergiques de la BLA sont VGLUT3 positives. On peut alors s'interroger sur les conséquences de l'absence de VGLUT3 de ces neurones dans les comportements de peur.

VGLUT3 est présent dans différentes sous-populations neuronales, représentant un très faible pourcentage des populations neuronales concernées (GABA, 5-HT ou ACh). La question de son implication dans les différents sous-systèmes se pose dans le cadre des processus d'apprentissage aversif.

II/ Matériel et Méthodes

II.1/ Animaux

Le nombre d'animaux utilisés pour chacune des lignées murines et tests comportementaux figure dans le **Tableau 6**.

Tests comportementaux	Lignées génétiques (n)		
	VGLUT3 ^{flox-SERTCRE}	VGLUT3 ^{flox-VIAATCRE}	VGLUT3 ^{flox-ChATCRE}
Actimétrie	8 VGLUT3 ^{flox-flox}	13 VGLUT3 ^{flox-flox}	19 VGLUT3 ^{flox-flox}
	12 VGLUT3 ^{flox-SERTCRE}	14 VGLUT3 ^{flox-VIAATCRE}	20 VGLUT3 ^{flox-ChATCRE}
Open Field / EPM	9 VGLUT3 ^{flox-flox}	13 VGLUT3 ^{flox-flox}	10 VGLUT3 ^{flox-flox}
	17 VGLUT3 ^{flox-SERTCRE}	14 VGLUT3 ^{flox-VIAATCRE}	10 VGLUT3 ^{flox-ChATCRE}
CFC	15 VGLUT3 ^{flox-flox}	13 VGLUT3 ^{flox-flox}	12 VGLUT3 ^{flox-flox}
	16 VGLUT3 ^{flox-SERTCRE}	14 VGLUT3 ^{flox-VIAATCRE}	12 VGLUT3 ^{flox-ChATCRE}
Extinction	9 VGLUT3 ^{flox-flox}	4 VGLUT3 ^{flox-flox}	12 VGLUT3 ^{flox-flox}
	10 VGLUT3 ^{flox-SERTCRE}	8 VGLUT3 ^{flox-VIAATCRE}	12 VGLUT3 ^{flox-ChATCRE}

Tableau 6 : Nombre de souris utilisés par lignées dans les différents tests comportementaux.

III.2/ Tests comportementaux

L'activité locomotrice est analysée par le test d'actimétrie, alors que l'anxiété est étudiée à partir des tests de champs ouvert (Open Field) et de labyrinthe en croix surélevé (EPM).

Pour les tests de conditionnement de peur et d'extinction, un stimulus sonore d'une durée de 30 sec est choisi comme SC afin d'étudier les mémoires aversives.

Les protocoles utilisés sont ceux décrits dans le Matériel et Méthodes générales (cf pages 123-126).

III/ Résultats

III.1/ Validation anatomique des différentes lignées génétiques

Dans un premier temps, une vérification anatomique par immunohistochimie dirigée contre VGLUT3 a été réalisée pour chacune de ces lignées afin d'observer l'invalidation de l'expression de VGLUT3 dans les régions d'intérêt. Les résultats sont présentés sur les **Figures 54** et le **Tableau 7**.

Pour les souris $VGLUT3^{flox-SERT^{CRE}}$, on observe une diminution de l'expression de VGLUT3 autour de 30% dans le raphé et de 12% dans l'amygdale. Trois types de populations sérotoninergiques sont identifiées dans le raphé : des neurones purement sérotoninergiques, d'autres exclusivement VGLUT3 positifs et des neurones sérotoninergiques VGLUT3 positifs (Gras et al., 2002; Nakamura et al., 2004). Les neurones 5-HT sont des neurones de projection dont 30% d'entre eux expriment l'ARNm de VGLUT3 (Gras et al., 2002; Hioki et al., 2010; Schäfer et al., 2002). La protéine VGLUT3 est présente à la fois dans les corps cellulaires et les terminaisons. Cette diminution de VGLUT3 dans le raphé correspond donc bien à la population de neurones sérotoninergiques VGLUT3 positifs.

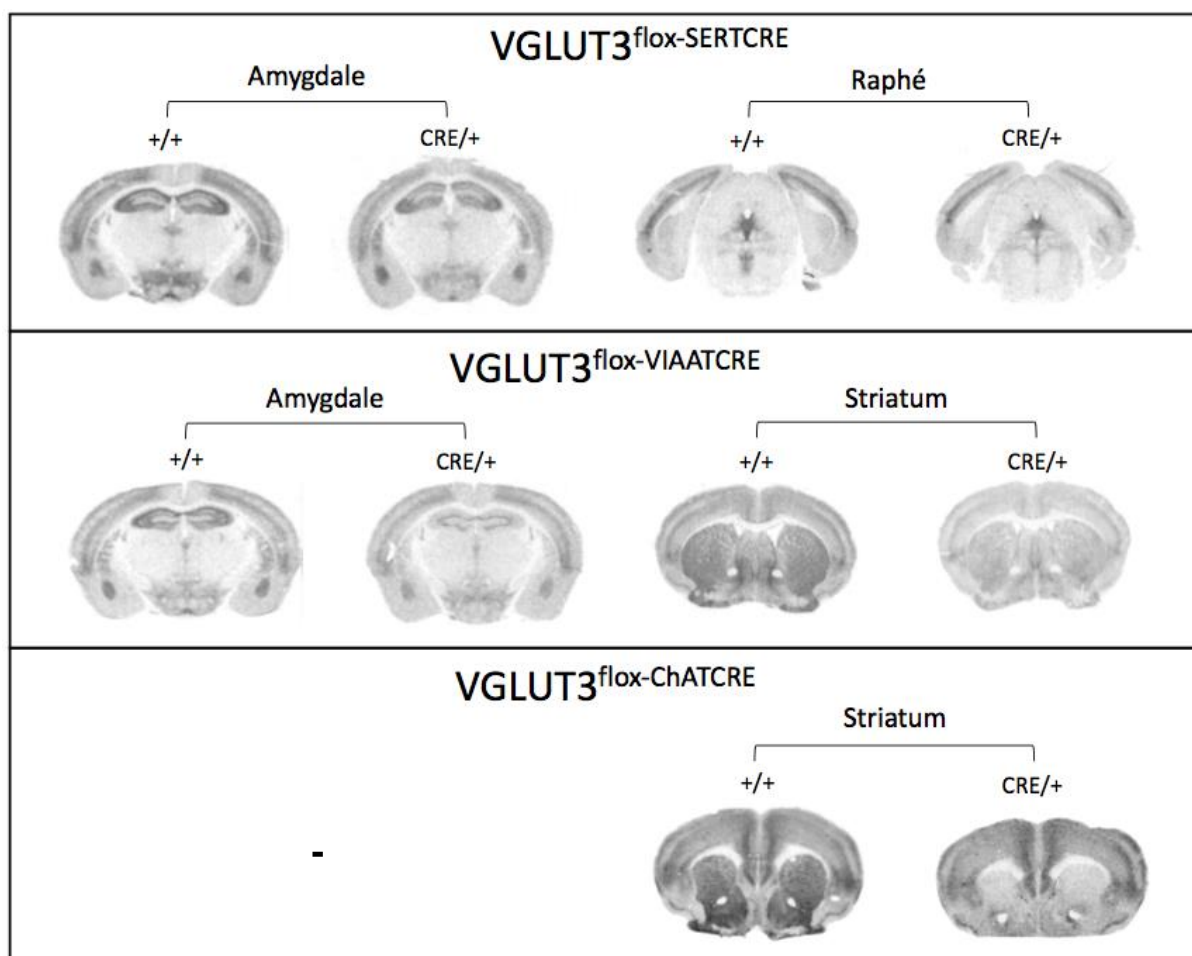


Figure 54 : Distribution de la protéine VGLUT3 dans les différentes lignées génétiques.

Pour les souris $VGLUT3^{flox-VIAAT^{CRE}}$, la diminution observée de l'expression de VGLUT3 est de 57% dans le striatum dorsal et d'environ 20% dans le noyau accumbens, et de 35% dans l'amygdale. Or dans le striatum, aucun neurone GABAergique VGLUT3 positifs n'a été mis en évidence. En effet, il s'avère que VGLUT3 est exprimé dans les interneurons

cholinergiques représentant 1 à 2% de la population striatale totale (El Mestikawy et al., 2011). Dans le striatum, des études ont montré que les interneurons GABAergiques et cholinergiques dérivent d'une même population embryonnaire, celle de l'éminence ganglionique médiale (*medial ganglionic eminence* – MGE) (Anderson et al., 1997; Deacon et al., 1994; Olsson et al., 1995; Zhao et al., 2003). On pourrait alors supposer que cette diminution est due à la présence de marqueurs GABAergiques apparus précocement et transitoirement au cours du développement dans des interneurons cholinergiques.

Enfin, la validation anatomique des souris VGLUT3^{flox-ChATCRE} a été réalisée dans notre équipe à Montréal, au Canada. L'expression de VGLUT3 diminue de 90% dans le striatum dorsal et d'environ 47% dans le noyau accumbens. Les données concernant l'amygdale restent à être déterminées. Les interneurons cholinergiques VGLUT3 positifs représentent 1-2 % de la population striatale et sont la seule source d'acétylcholine du striatum (Calabresi et al., 2000; Pisani et al., 1997).

L'ensemble de ces résultats obtenus jusqu'à présent pour l'amygdale sont cohérents avec ceux de la quantification des terminaisons VGLUT3 positives de l'amygdale réalisés au cours de ma caractérisation anatomique (**Tableau 7**).

Sous-systèmes	Terminaisons VGLUT3 positives	Diminution de l'expression de VGLUT3 par IAR
Sérotoninergique	23%	14%
GABAergique	30%	35%
Cholinergique	63%	-

Tableau 7: Comparaison de la quantification des terminaisons VGLUT3 positives et de la diminution de l'expression de VGLUT3 dans les différentes lignées génétiques dans l'amygdale.

Ainsi, les croisements ont pu être validés ce qui nous a permis d'entreprendre l'étude de la caractérisation comportementale de ces différentes lignées afin de connaître leur implication dans les phénotypes déterminés chez les souris invalidées constitutivement pour VGLUT3, les souris VGLUT3^{-/-}.

III.2/Les souris VGLUT3^{flox-SERTCRE}

III.2.a) Activité locomotrice

L'activité locomotrice des souris VGLUT3^{flox-SERTCRE} a été observée sur 24h avec une période de nuit de 19h30 à 7h30. Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les souris contrôles et expérimentales pour l'activité locomotrice spontanée horizontale (**Figure 55 A** ; $F(1,18)=0,03757$, $p=0,8485$, ANOVA à mesures répétées) mais également pour le comportement de redressement (**Figure 55 B** ; $F(1,18)=0,1453$, $p=0,7075$, ANOVA à mesures répétées).

L'activité locomotrice ne semble pas être affectée par l'invalidation de VGLUT3 dans le système sérotoninergique.

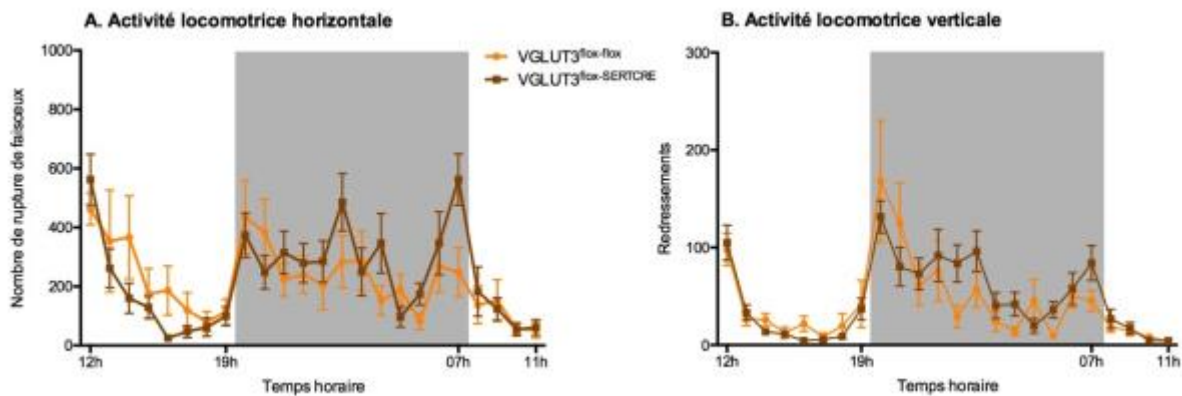


Figure 55 : Activité locomotrice spontanée chez les souris de la lignée VGLUT3^{flox-SERTCRE}.

L'activité locomotrice horizontale entre les souris VGLUT3^{flox-SERTCRE} et VGLUT3^{flox-flox} ne semble pas différente, tout comme l'activité locomotrice verticale.

III.2.b) Anxiété

L'anxiété a été analysée à partir des tests de champ ouvert (Open Field) et de labyrinthe en croix surélevé (EPM).

Pour le test de l'Open Field, les résultats du temps passé dans la zone centrale qui est la zone anxiogène, indiquent qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux groupes testés (**Figure 56 A** ; $p=0,6554$, unpaired t test avec correction de Welch). Les distances parcourues dans les zones centrale et périphérique ne montrent également aucune différence entre les souris VGLUT3^{flox-SERTCRE} et VGLUT3^{flox-flox} (**Figure 56 A** ; $p=0,6725$, et $p=0,5736$ respectivement, unpaired t test avec correction de Welch).

Lors du test de l'EPM, le pourcentage du nombre d'entrées dans les bras ouverts ainsi que celui de temps passé dans les bras ouverts ont été analysés par rapport aux données correspondant aux bras fermés. Il apparaît que le groupe control et le groupe expérimental présentent les mêmes performances (**Figure 56 B** ; $p=0,8542$, $p=0,9001$ respectivement, unpaired t test avec correction de Welch).

En revanche, le nombre total d'entrées dans les bras ouverts et les bras fermés est significativement plus important chez les souris $VGLUT3^{lox-SERTCRE}$ que les souris $VGLUT3^{lox-fox}$ (**Figure 56 B** ; $p<0,0001$, unpaired t test avec correction de Welch) ce qui signifie que les souris $VGLUT3^{lox-SERTCRE}$ réalisent plus d'entrées dans les bras fermés et seraient par conséquent légèrement plus actives que les souris $VGLUT3^{lox-fox}$.

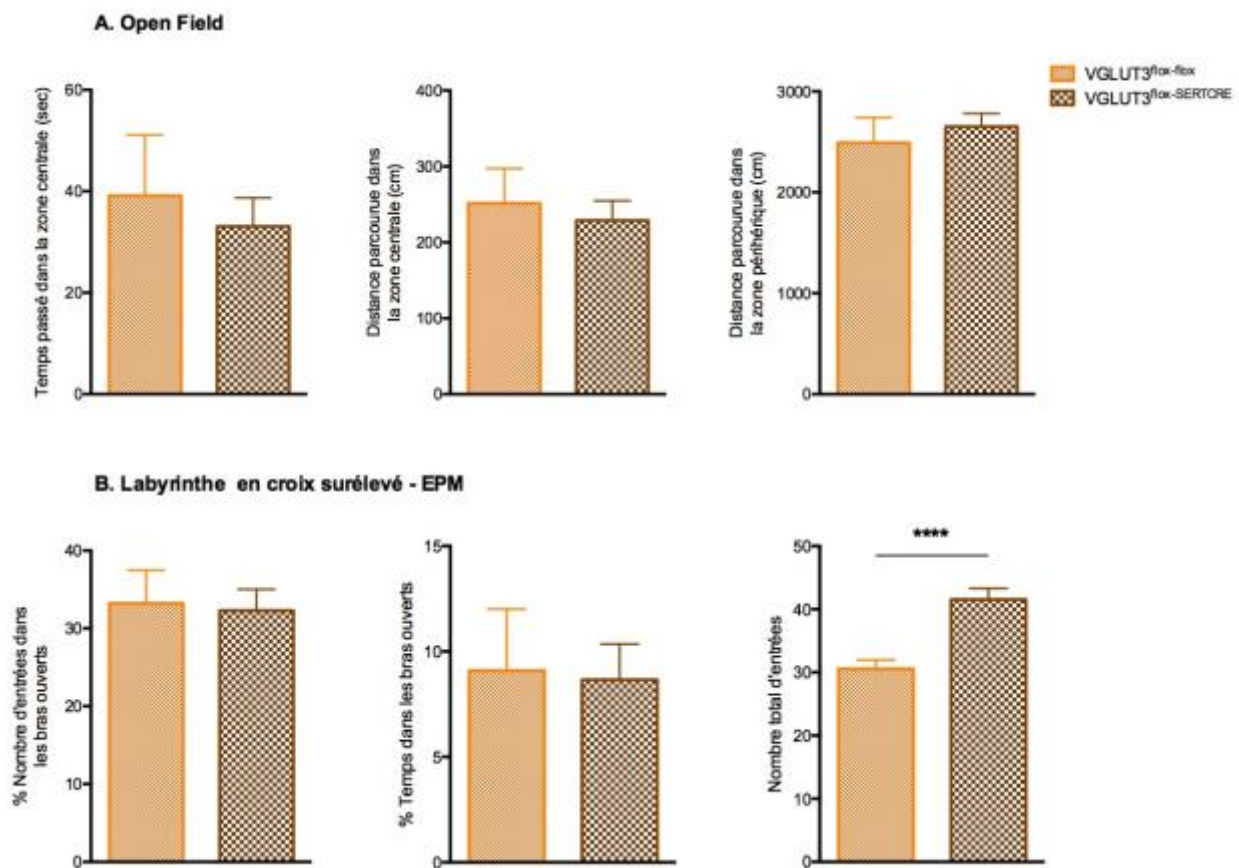


Figure 56 : Etude du phénotype anxieux chez les souris de la lignée $VGLUT3^{lox-SERTCRE}$.

A) Au cours du test de l'Open Field, le temps passé dans la zone centrale et les distances parcourues dans les zones centrale et périphérique sont les mêmes chez les souris $VGLUT3^{lox-SERTCRE}$ et $VGLUT3^{lox-fox}$. B) Lors du test d'EPM, le pourcentage du nombre d'entrées et de temps passé dans les bras ouverts sont similaires entre les deux groupes. En revanche, le nombre total d'entrées est plus important chez les souris $VGLUT3^{lox-SERTCRE}$ que les souris contrôles.

Ces résultats nous indiquent que l'inactivation constitutive de $VGLUT3$ dans les neurones sérotoninergiques n'affecte pas les phénotypes de type anxieux chez ces souris, mais semble affecter leur activité locomotrice en situation anxiogène.

III.2.c) Test du conditionnement de peur - FC

L'ensemble des données évaluant les mémoires de peur conditionnées sont présentées sur la **Figure 57**. Les souris $VGLUT3^{fl\text{-}SERT^{CRE}}$ montrent un apprentissage similaire aux animaux contrôles lors du conditionnement (**Figure 57 A** ; $F(1,29)=1,677$, $p=0,2056$, ANOVA à mesures répétées).

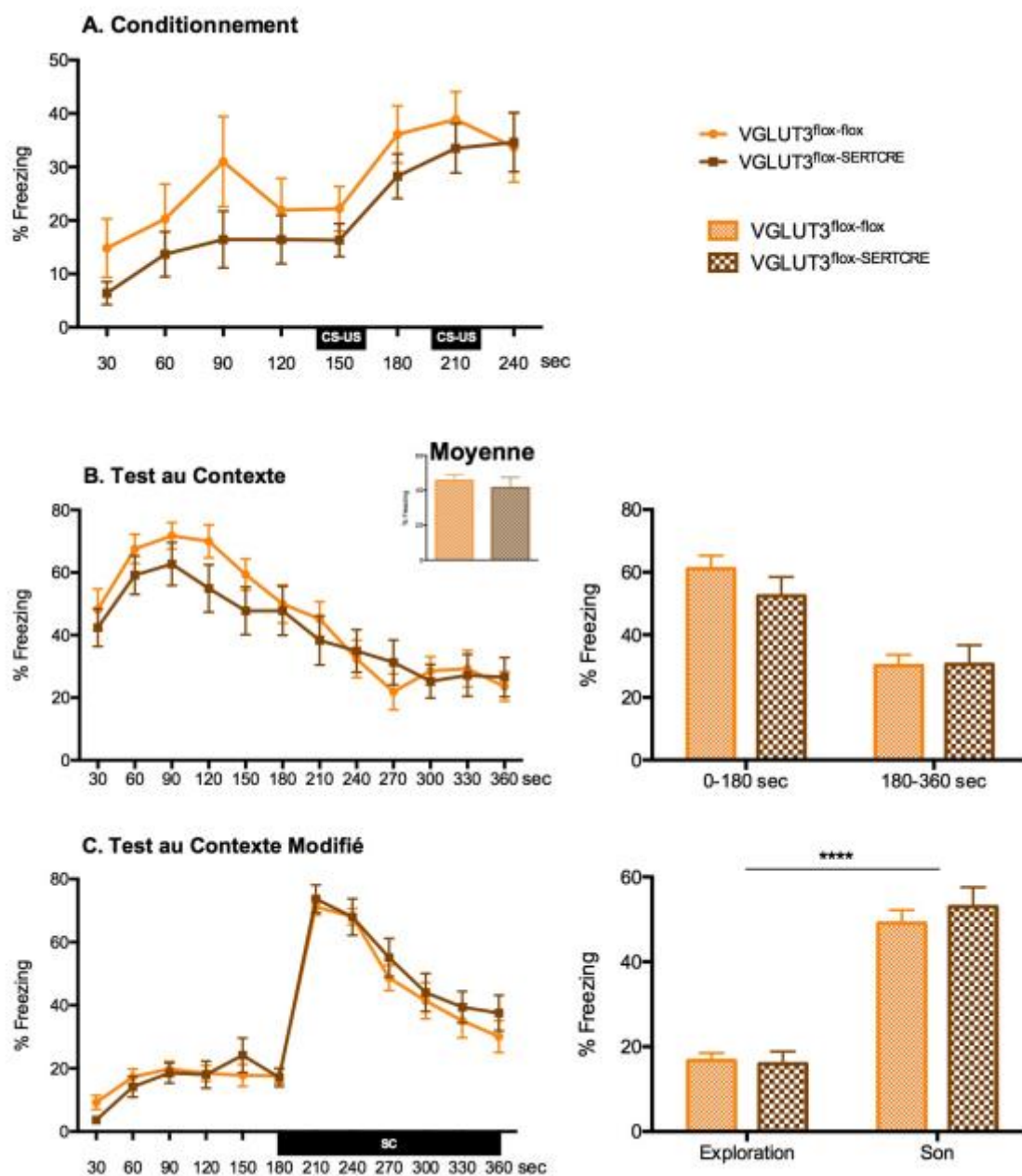


Figure 57 : Conditionnement de peur chez les souris de la lignée $VGLUT3^{fl\text{-}SERT^{CRE}}$.
 A) La courbe d'apprentissage de conditionnement de peur est similaire entre les deux groupes de souris. B-C) Les mémoires contextuelle et élémentaire sont similaires entre les souris $VGLUT3^{fl\text{-}SERT^{CRE}}$ et $VGLUT3^{fl\text{-}fl\text{-}flx}$. D'autre part, l'association son-choc a bien eu lieu pour les deux groupes avec une augmentation significative du niveau de *freezing* entre la phase d'exploration et celle de présentation du son.

De plus, aucune différence n'est observée entre ces deux groupes pour la mémoire contextuelle (**Figure 57 B** ; cinétique de gauche : $F(1,29)=0,3621$, $p=0,5520$, ANOVA à mesures répétées ; moyenne : $p=0,5460$, unpaired t test avec correction de Welch ; histogramme de droite : de 0-180 sec : $t(58)=1,187$, de 180-360 sec : $t(58)=0,06051$, test de comparaison multiple de Sidak) et la mémoire élémentaire (**Figure 57 C** ; cinétique de gauche : $F(1,29)=0,1481$, $p=0,7032$, ANOVA à mesures répétées ; histogramme de droite : $F(1,29)=0,1480$, $p=0,7032$, ANOVA à mesures répétées). L'association son-choc a bien eu lieu pour les deux groupes avec une augmentation significative du niveau de *freezing* entre la phase d'exploration et celle de présentation du son (**Figure 57 C** ; histogramme de droite : $VGLUT3^{flox-flox}$, $t(29)=9,791$, $VGLUT3^{flox-SERTCRE}$: $t(29)=11,55$, test de comparaison multiple de Sidak). On note l'absence de généralisation dans le contexte modifié (**Figure 57 C**, histogramme de droite, phase d'exploration).

Ainsi, l'invalidation de VGLUT3 dans les neurones sérotoninergiques VGLUT3 positifs, ne perturbent pas la mise en place et le rappel des mémoires de peur contextuelle et élémentaire.

III.2.d) Test d'Extinction de conditionnement de peur

Les deux groupes d'animaux semblent présenter une extinction comparable. Au jour 8, on observe un retour au niveau basal du taux de *freezing* pour les deux groupes (**Figure 58 A** ; $F(1,17)=2,453e-006$, $p=0,9988$, ANOVA à mesures répétées).

Cependant, lorsque l'on regarde l'indice de progression de l'extinction, on remarque que les souris $VGLUT3^{flox-SERTCRE}$ sont plus basses que les souris contrôles (**Figure 58 B** ; graphique de gauche : $F(1,17)=5,290$, $p=0,0344$, ANOVA à mesures répétées) et montrent une performance plus faible dans l'apprentissage d'extinction (**Figure 58 B** ; histogramme de droite : $p=0,0254$, unpaired t test avec correction de Welch). Toutefois, cette différence de performance est due au comportement des animaux lors du jour 8 (**Figure 58 B** ; graphique de gauche : à J8 : $t(119)=2,763$, test de comparaison multiple de Sidak). De plus, sachant qu'au jour 8 les souris retournent à un niveau basal de *freezing*, il semble alors difficile de conclure à une réelle altération de l'extinction de peur chez ces animaux. Le processus d'apprentissage d'extinction ne paraît donc pas modifié bien qu'il existe ponctuellement une variation de *freezing* à la fin du test.

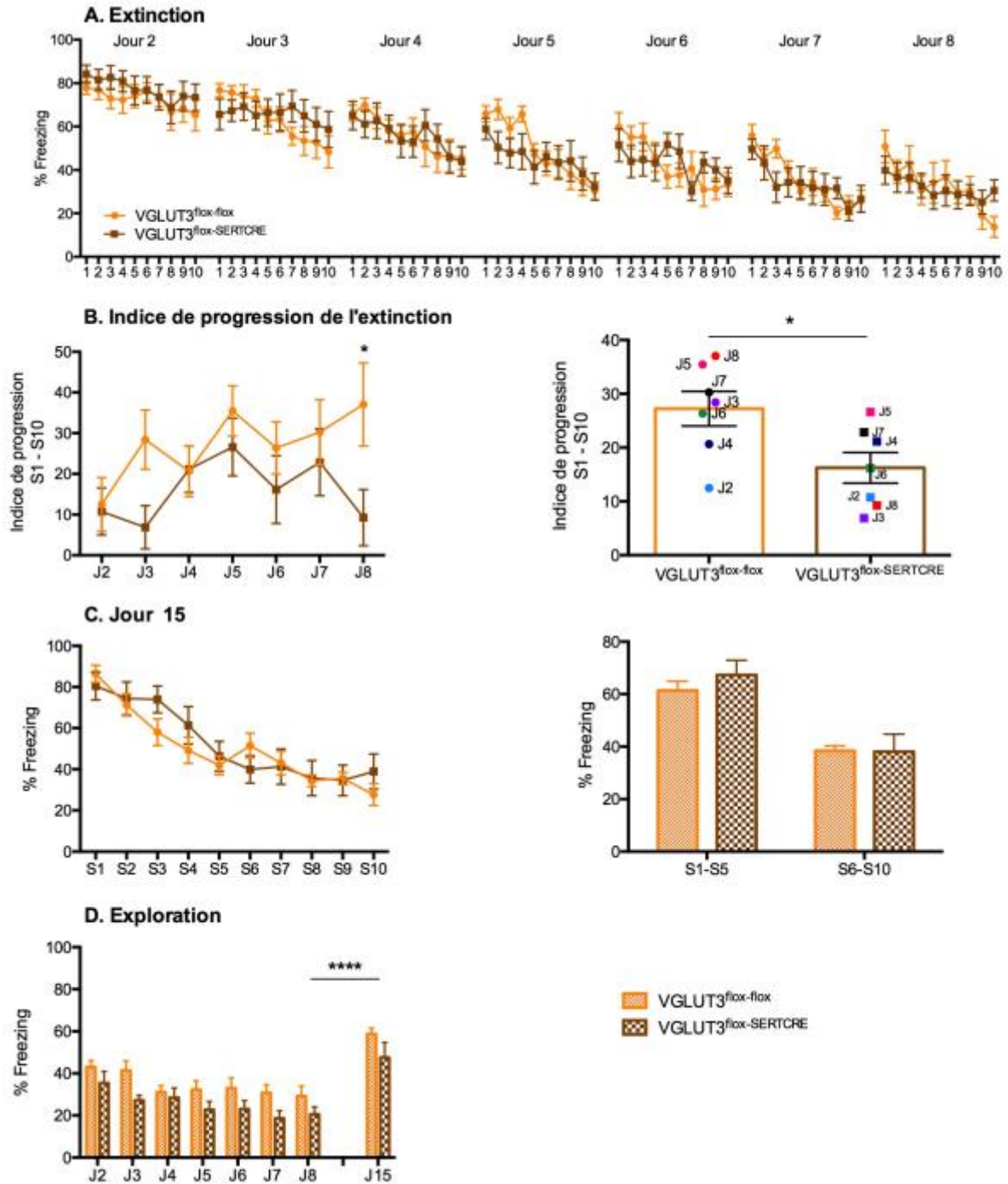


Figure 58 : Extinction de peur chez les souris VGLUT3^{flox-SERTCRE}.

A) L'apprentissage d'extinction est comparable entre les deux groupes. B) L'indice de progression est en moyenne plus faible chez les souris VGLUT3^{flox-SERTCRE}. C) Le rappel de la mémoire de peur dans le contexte original du conditionnement est le même chez les deux groupes. D) Le niveau de *freezing* lors des deux premières minutes d'exploration du jour 2-8 et lors du jour 15 est plus bas chez les souris VGLUT3^{flox-SERTCRE} que chez les souris contrôles ($F(1,17)=5,052$, $p=0,0382$, ANOVA à mesures répétées).

Lorsque l'on remet les souris dans l'environnement du conditionnement, la présentation du stimulus sonore réactive la mémoire aversive comme le montre le taux de *freezing* important (80%) constaté de façon similaire chez nos deux groupes de souris. Ce taux de *freezing* diminue

au cours des présentations sonores de façon similaire entre notre groupe contrôle et expérimental (**Figure 58 C** ; cinétique de gauche : $F(1,17)=0,2005$, $p=0,6600$, ANOVA à mesures répétées, histogramme de droite : $F(1,17)=0,2005$, $p=0,6600$, ANOVA à mesures répétées).

D'autre part, on remarque que la seule présentation du contexte de conditionnement lors des deux premières minutes d'exploration au jour 15 (**Figure 58 D**) réactive la mémoire contextuelle liée à l'association du choc au contexte avec un niveau de *freezing* autour de 60% pour les souris $VGLUT3^{lox-fox}$ ($t(119)=6,110$, test de comparaison multiple de Sidak) et les souris $VGLUT3^{lox-SERCRE}$ ($t(119)=5,868$, test de comparaison multiple de Sidak).

L'inactivation de VGLUT3 dans les neurones sérotoninergiques $VGLUT3$ positifs ne semble pas altérer l'apprentissage d'extinction et les mémoires associées aux SC.

III.3/ Les souris $VGLUT3^{lox-VIAATCRE}$

III.3.a) Activité locomotrice

L'activité locomotrice des souris $VGLUT3^{lox-VIAATCRE}$ a été observée sur 24h avec une période de nuit de 19h30 à 7h30. Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les souris contrôles et les souris expérimentales pour l'activité locomotrice spontanée horizontale (**Figure 59 A** ; $F(1,23)=0,2074$, $p=0,6531$, ANOVA à mesures répétées) mais également pour le comportement de redressement (**Figure 59 B** ; $F(1,23)=0,5629$, $p=0,4607$, ANOVA à mesures répétées).

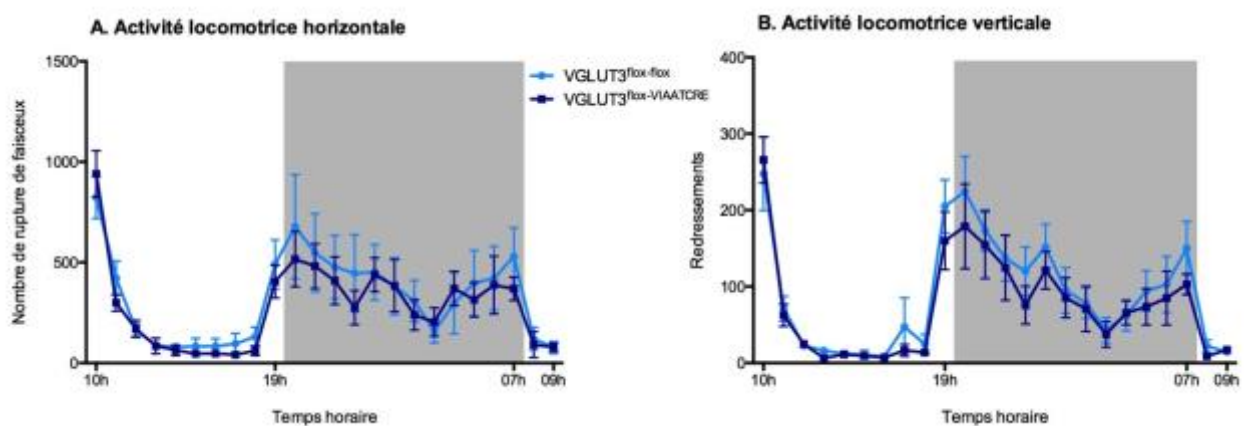


Figure 59 : Activité locomotrice spontanée chez les souris de la lignée $VGLUT3^{lox-VIAATCRE}$.

L'activité locomotrice horizontale entre les souris $VGLUT3^{lox-VIAATCRE}$ et $VGLUT3^{lox-fox}$ n'est pas différente, tout comme l'activité locomotrice verticale.

III.3.b) Anxiété

Le phénotype anxieux a été étudié à partir des tests de champ ouvert (Open Field) et de labyrinthe en croix surélevé (EPM).

Pour le test de l'Open Field, les résultats indiquent qu'il n'y a aucune différence significative pour le temps passé dans la zone centrale, la distance parcourue dans la zone centrale et la zone périphérique (**Figure 60, A** ; $p=0,2791$, $p=0,2343$, $p=0,3986$ respectivement, unpaired t test avec correction de Welch).

Il en est de même pour les analyses de l'anxiété avec le test de l'EPM. Le pourcentage du nombre d'entrées et de temps passé dans les bras ouverts, mais aussi le nombre d'entrées total ne s'avèrent pas significativement différent entre le groupe control et le groupe expérimental (**Figure 60, B** ; $p=0,1982$, $p=0,1465$, $p=0,7133$ respectivement, unpaired t test avec correction de Welch).

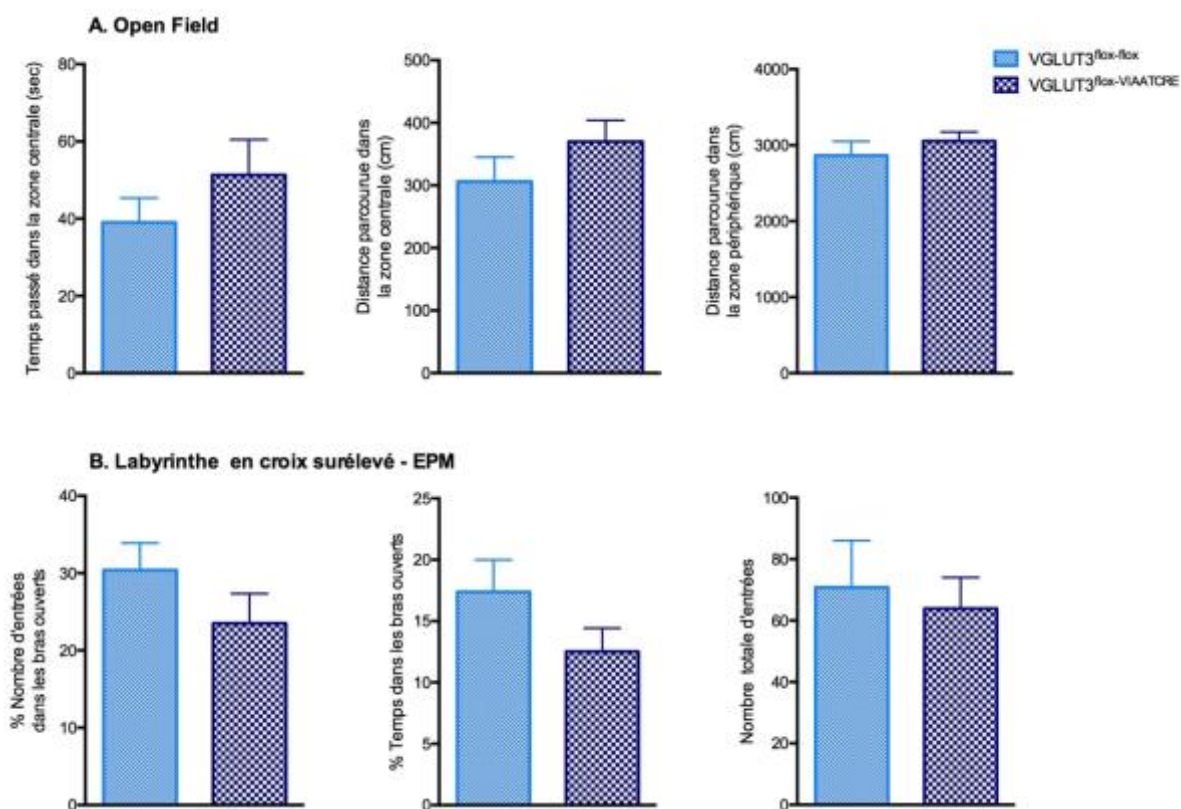


Figure 60 : Etude du phénotype anxieux chez les souris de la lignée VGLUT3^{flox-VIAATCRE}.

A) Au cours du test de l'Open Field, le temps passé dans la zone centrale et les distances parcourues dans les zones centrale et périphérique sont les mêmes chez les souris VGLUT3^{flox-VIAATCRE} et VGLUT3^{flox-flox}. B) Lors du test d'EPM, le pourcentage du nombre d'entrées et de temps passé dans les bras ouverts sont similaires entre les deux groupes. Il en est de même pour le nombre total d'entrées.

L'invalidation constitutive de VGLUT3 dans les neurones GABAergiques n'affecte pas les phénotypes de type anxieux chez les souris VGLUT3^{flox-VIAATCRE}.

III.3.c) Test du conditionnement de peur - FC

Comme nous pouvons le constater sur la **Figure 61**, au cours des tests de peur conditionnée, aucune différence n'est observée pour les paramètres évalués : apprentissage (**Figure 61 A** ; $F(1,23)=0,2089$, $p=0,6519$, ANOVA à mesures répétées), et les mémoires contextuelle (**Figure 61 B** ; cinétique de gauche : $F(1,23)=0,07741$, $p=0,7833$, ANOVA à mesures répétées ; moyenne : $p=0,5506$, unpaired t test avec correction de Welch ; histogramme de droite : $F(1,23)=0,07741$, $p=0,7833$, ANOVA à mesures répétées) et élémentaire (**Figure 61 C** ; cinétique de gauche: $F(1,23)=0,01992$, $p=0,8890$, ANOVA à mesures répétées ; histogramme de droite : $F(1,23)=0,01982$, $p=0,8893$, ANOVA à mesures répétées). De plus, l'association entre le stimulus conditionné et le stimulus aversif a bien lieu pour les souris VGLUT3^{flox-VIAATCRE} et VGLUT3^{flox-flox} (**Figure 61 C**, graphique de droite : VGLUT3^{flox-flox}: $t(23)=8,283$, VGLUT3^{flox-VIAATCRE} : $t(23)=7,374$, test de comparaison multiple de Sidak).

L'inactivation de VGLUT3 dans les neurones GABAergiques VGLUT3 positifs n'affecte pas les mémoires aversives contextuelle et élémentaire.

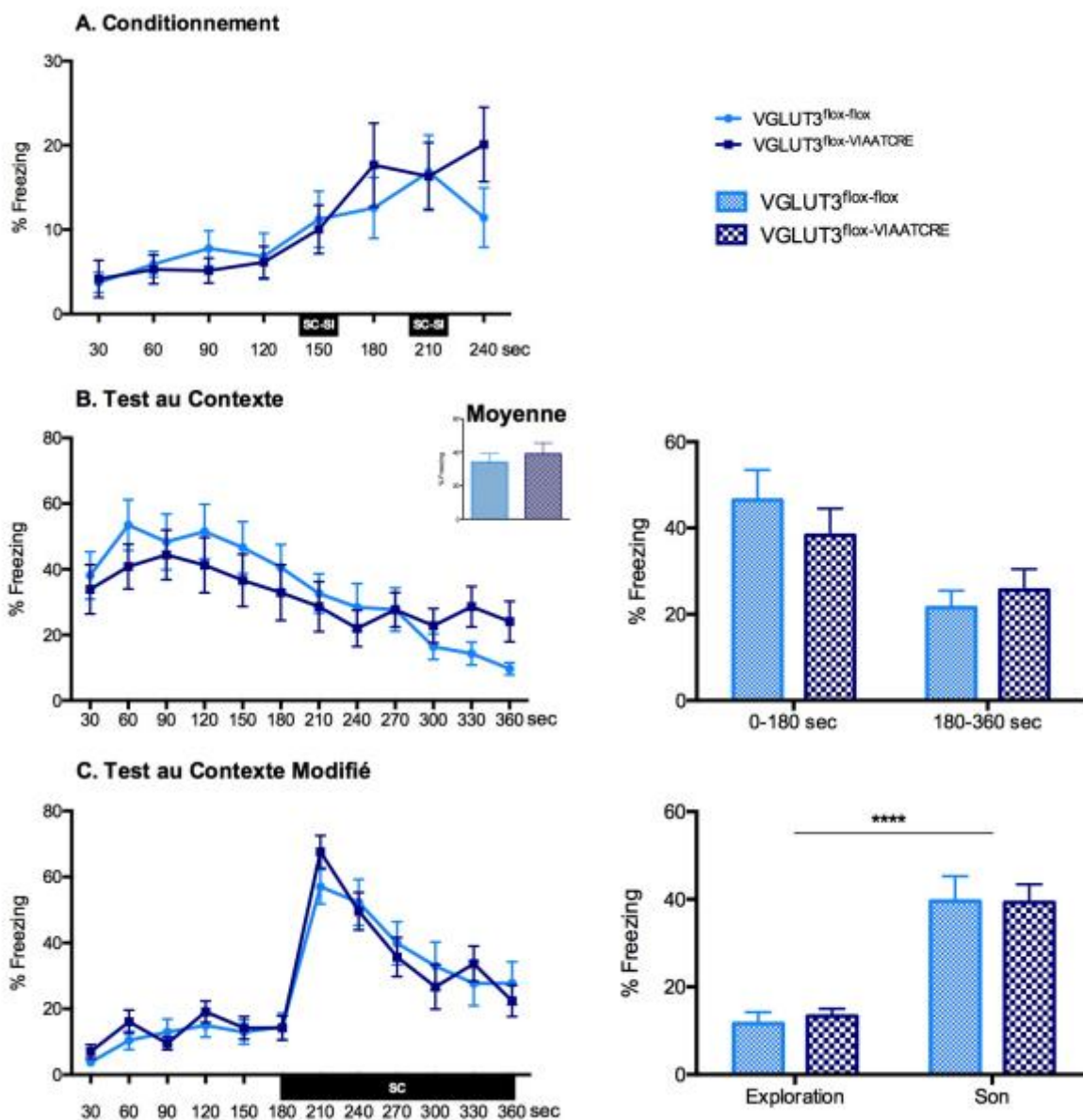


Figure 61 : Conditionnement de peur chez les souris de la lignée VGLUT3^{flox-VIAATCRE}.
 A) La courbe d'apprentissage de conditionnement de peur est similaire entre les deux groupes de souris. B-C) Les mémoires contextuelle et élémentaire sont similaires entre les souris VGLUT3^{flox-VIAATCRE} et VGLUT3^{flox-flox}. L'association son-choc a bien eu lieu pour les deux groupes.

III.3.d) Test d'Extinction de conditionnement de peur

Pour le test d'extinction, on observe que la cinétique d'extinction est comparable entre le groupe contrôle et le groupe expérimental (Figure 62 A ; $F(1,10)=0,9286$, $p=0,9286$, ANOVA à mesures répétées). L'analyse de l'indice de progression valide les observations faites à partir de la cinétique d'extinction (Figure 62 B ; $p=0,8642$, unpaired t test avec correction de

Welch). De même, la mémoire originale au jour 15 n'est pas différente entre les deux groupes d'animaux (**Figure 62 C** ; $F(1,10)=0,0001963$, $p=0,9891$, ANOVA à mesures répétées).

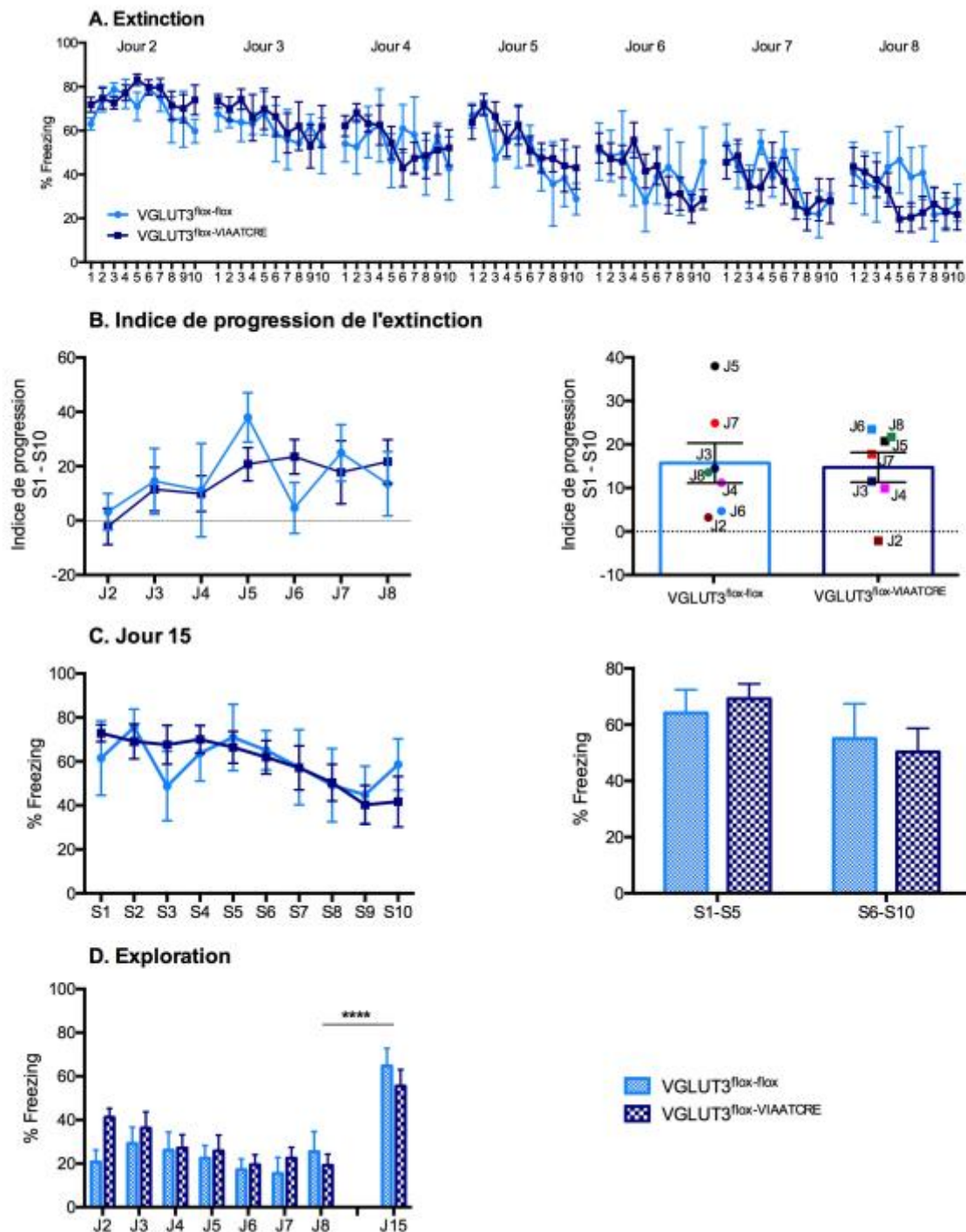


Figure 62 : Extinction de peur chez les souris VGLUT3^{flax-VIAATCRE}.

A-B) La cinétique d'extinction est similaire chez les souris VGLUT3^{flax-VIAATCRE} et VGLUT3^{flax-flax}. C) Le rappel de la mémoire de peur dans le contexte original du conditionnement est le même chez les deux groupes. D) Le niveau de *freezing* lors des deux premières minutes d'exploration du jour 2-8 et lors du jour 15 n'est pas différent entre les souris contrôles et mutantes.

Lorsque l'on ré-expose les souris au contexte du conditionnement initial, la mémoire contextuelle liée à l'association SC-SI est réactivée chez les souris VGLUT3^{flox-flox} et les souris VGLUT3^{flox-VIAATCRE} (**Figure 62 D** ; VGLUT3^{flox-flox} : $t(70)=5,002$, VGLUT3^{flox-VIAATCRE} : $t(70)=6,534$, test de comparaison multiple de Sidak).

L'inactivation de VGLUT3 dans les neurones GABAergiques ne perturbe pas les processus d'extinction et de rappel de la mémoire de peur, ni la mémoire contextuelle liée à l'association SC-SI.

III.4/ Les souris VGLUT3^{flox-ChATCRE}

III.4.a) Activité locomotrice

L'activité locomotrice des souris VGLUT3^{flox-ChATCRE} a été analysée par notre équipe à Montréal, au Canada. L'étude a été réalisée sur 12h sur une période de nuit de 20h à 7h. Les résultats montrent qu'il y a une légère augmentation de l'activité horizontale chez les souris VGLUT3^{flox-ChATCRE} par rapport à leurs contrôles (**Figure 63** ; $p=0,0474$, unpaired t test avec correction de Welch).

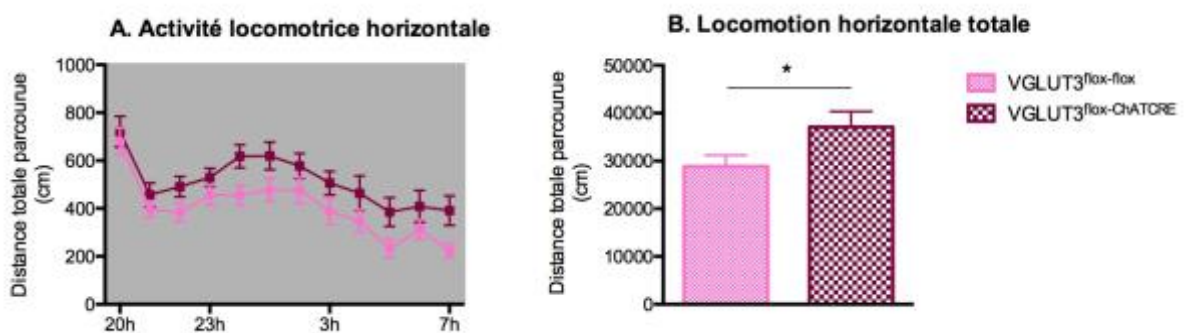


Figure 63 : Activité locomotrice spontanée chez les souris de la lignée VGLUT3^{flox-ChATCRE}. L'activité locomotrice horizontale entre les souris VGLUT3^{flox-ChATCRE} est légèrement plus importante que celle des souris VGLUT3^{flox-flox}.

III.4.b) Anxiété

D'après les études menées par l'équipe à Montréal au Canada, il semble que l'inactivation de VGLUT3 dans les neurones cholinergiques ne perturbe pas les phénotypes de type anxieux des animaux en Open Field (**Figure 64** ; temps passé dans la zone centrale :

$p=0,7640$, nombre d'entrées dans la zone centrale : $p=0,1649$, unpaired t test avec correction de Welch) et en EPM (données non illustrées).

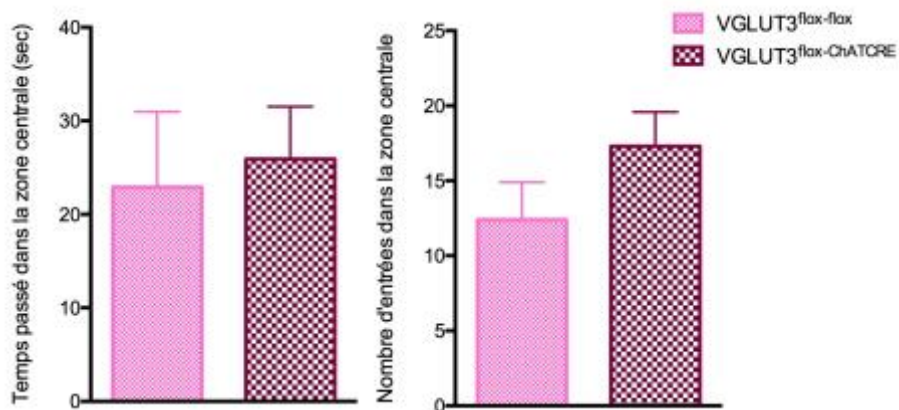


Figure 64 : Etude du phénotype anxieux chez les souris de la lignée VGLUT3^{flax-ChATCRE} par le test de l'Open Field.

Le temps passé dans la zone centrale en seconde (gauche), et le nombre d'entrées dans la zone centrale (droite) ne semblent pas significativement différent entre les souris VGLUT3^{flax-ChATCRE} et leurs contrôles.

III.4.c) Test du conditionnement de peur - FC

Les résultats présentés dans la **Figure 65 A** n'indiquent pas de différence concernant l'apprentissage ($F(1,22)=1,708$, $p=0,2048$, ANOVA à mesures répétées), et le rappel des mémoires de peur contextuelle (**Figure 65 B** ; cinétique de gauche : $F(1,22)=0,3744$, $p=0,5569$, ANOVA à mesures répétées ; moyenne : $p=0,5468$, unpaired t test avec correction de Welch ; histogramme de droite : $F(1,22)=0,3744$, $p=0,5469$, ANOVA à mesures répétées) et élémentaire (**Figure 65 C** ; cinétique de gauche : $F(1,21)=0,02354$, $p=0,8795$, ANOVA à mesures répétées ; histogramme de droite : $F(1,21)=0,02354$, $p=0,8794$, ANOVA à mesures répétées) entre les souris contrôles et les souris VGLUT3^{flax-ChATCRE}. Cependant, l'association SC-SI a bien lieu pour les deux groupes d'animaux (: $t(21)=9,494$, VGLUT3^{flax-ChATCRE} : $t(21)=9,666$, test de comparaison multiple de Sidak).

Ainsi, les mémoires contextuelle et élémentaire ne sont pas altérées par l'invalidation de VGLUT3 dans les neurones cholinergiques.

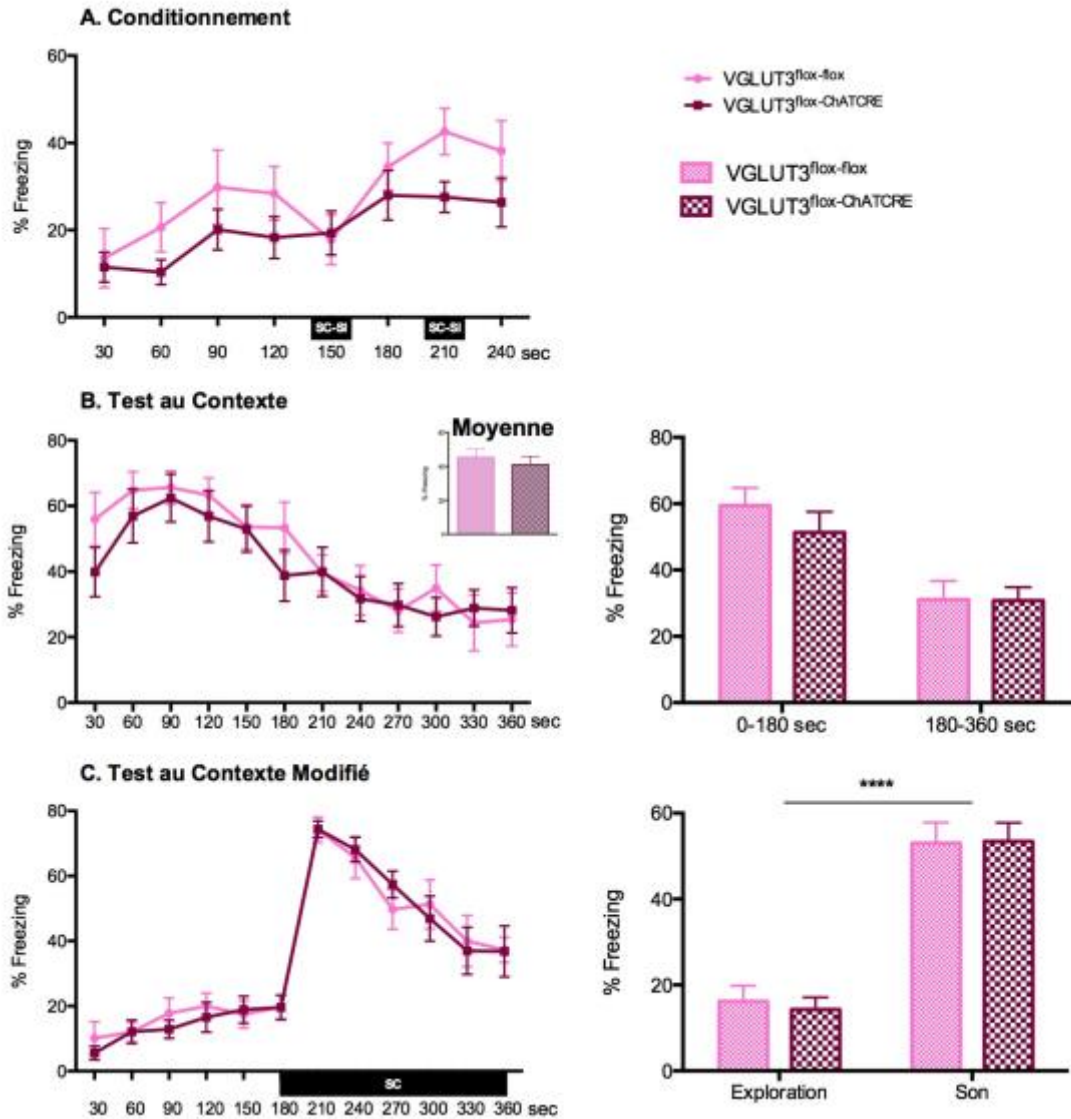


Figure 65 : Conditionnement de peur chez les souris de la lignée VGLUT3^{flox-ChATCRE}.

A) La courbe d'apprentissage de conditionnement de peur est similaire entre les deux groupes de souris. B-C) Les mémoires contextuelle et élémentaire sont comparables entre les souris VGLUT3^{flox-ChATCRE} et VGLUT3^{flox-flox}. L'association SC-SI a lieu pour les deux groupes.

III.4.d) Test d'Extinction de conditionnement de peur

Pour le test d'extinction, là aussi, les souris mutantes présentent le même profil comportemental que les souris contrôles (**Figure 66 A** ; $F(1,20)=0,06663$, $p=0,7989$, ANOVA à mesures répétées). Toutefois, l'analyse de l'indice de progression montre que les souris VGLUT3^{flox-ChATCRE} sont moins performantes que les souris VGLUT3^{flox-flox} au cours de l'extinction (**Figure 66 B** ; $p=0,0135$, unpaired t test avec correction de Welch). Pour le

processus de rappel, aucune différence n'est observée (Figure 66 C ; $F(1,22)=0,6478$, $p=0,4295$, ANOVA à mesures répétées).

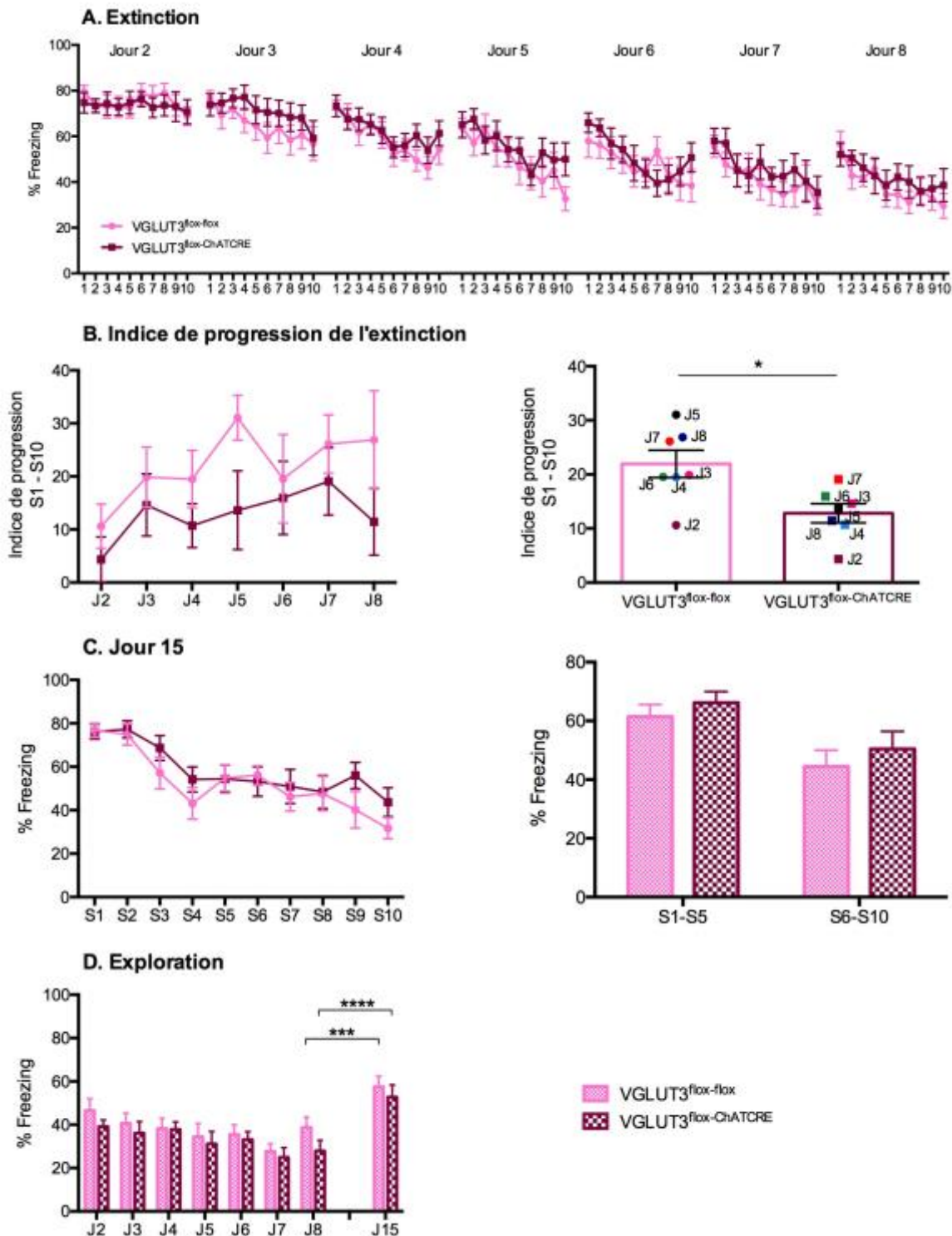


Figure 66 : Extinction de peur chez les souris VGLUT3^{fllox-ChATCRE}.

A) L'apprentissage d'extinction est comparable chez les souris VGLUT3^{fllox-ChATCRE} et les contrôles. B) L'analyse de l'indice de progression de l'extinction indique une chute de l'efficacité de l'apprentissage chez les VGLUT3^{fllox-ChATCRE}. C) Le rappel de la mémoire de peur dans le contexte original du conditionnement est identique entre les deux groupes. D) Le niveau de *freezing* lors des deux premières minutes d'exploration du jour 2-8 et lors du jour 15 n'est pas différent entre les souris contrôles et mutantes. La mémoire contextuelle est bien réactivée au jour 15.

Lors de l'exploration libre des deux premières minutes, on remarque que la mémoire contextuelle liée à l'association SC-SI est réactivée chez les souris contrôles et chez les souris mutantes (**Figure 66 D** ; VGLUT3^{flox-flox} : t(154)=4,280, VGLUT3^{flox-ChATCRE} : t(154)=5,671, test de comparaison multiple de Sidak).

L'inactivation de VGLUT3 dans les neurones cholinergiques VGLUT3 positifs semble modifier la cinétique d'extinction, comme le montre l'analyse de l'indice de progression entraînant une résistance relative au processus d'apprentissage d'extinction. Toutefois, elle ne modifie pas les autres mémoires aversives testées.

IV/ Discussion

De façon surprenante, l'inactivation constitutive de VGLUT3 dans les neurones sérotoninergiques, GABAergiques ou cholinergiques VGLUT3 positifs n'affecte globalement ni les comportements locomoteurs et de type-anxieux, ni les mémoires aversives. Aucun des phénotypes observés chez les souris VGLUT3^{-/-} ne sont retrouvés lorsque l'on invalide spécifiquement chaque sous système. La question de l'importance du rôle de VGLUT3 dans ces différents phénotypes est par conséquent soulevée.

Concernant le système sérotoninergique, le phénotype de type anxieux observé chez les souris VGLUT3^{-/-} n'est pas retrouvé chez **les souris VGLUT3^{flox-SERTCRE}**.

L'hypothèse originale stipulait que chez les souris VGLUT3^{-/-}, le phénotype de type anxieux serait dû à une diminution de la transmission sérotoninergique consécutive à la perte du rôle de VGLUT3 dans la synergie vésiculaire (Amilhon et al., 2010).

En effet, étant donné que les SSRI (agents pharmacologiques utilisés comme anxiolytiques) modulent les niveaux de 5-HT dans le cerveau entier, une diminution globale des niveaux de 5-HT pourraient expliquer ce phénotype (Bocchio et al., 2016).

Toutefois, des études ont montré qu'une diminution de la transmission 5-HT par la surexpression de transporteurs de la recapture de la 5-HT (5-HTT) par modèle génétique peut entraîner une diminution du comportement de type anxieux (Barkus et al., 2014; Bocchio et al., 2015; Jennings et al., 2006; Line et al., 2014; McHugh et al., 2015). Cela suggère que le système

sérotoninergique seul n'est pas suffisant pour déclencher ce type de comportement chez les souris VGLUT3^{-/-}.

Il se pourrait notamment que le système GABAergique soit également touché. En effet, d'une part car, il existe de nombreux interneurons GABAergiques VGLUT3 positifs dans le cortex, l'hippocampe et l'amygdale, structures impliquées dans les comportements de type anxieux et de peur (El Mestikawy et al., 2011). D'autre part, il s'agit d'une cible pour les traitements thérapeutiques contre l'anxiété avec notamment l'utilisation de benzodiazépines (Sternbach et al., 1974; Wierońska et al., 2011). Ainsi, si l'on considère uniquement son rôle dans la synergie vésiculaire, l'absence de VGLUT3 chez les souris VGLUT3^{-/-} entraînerait une diminution de la transmission GABAergique ce qui irait dans le même sens que l'utilisation thérapeutique des benzodiazépines dont le rôle est de pallier à cette diminution (Wierońska et al., 2011).

Cependant, selon l'hypothèse présentée, la perte de VGLUT3 n'induirait pas une diminution, mais une augmentation de la libération de 5-HT et de GABA chez les souris VGLUT3^{-/-}. Le phénotype de type anxieux observé pourrait alors être consécutif à l'emballement de ces deux systèmes de neurotransmission.

Chez les souris VGLUT3^{flox-SERT^{CRE}}, l'augmentation de 5-HT induite par la perte de VGLUT3 dans les neurones sérotoninergiques ne semble pas induire d'état de type anxieux particulier. Cette observation pourrait être un nouvel argument démontrant que le système 5-HT n'est pas le seul impliqué. En effet, il se pourrait que la transmission glutamatergique globale ne soit pas modifiée par l'intervention des circuits inhibiteurs locaux régulant l'activité des neurones pyramidaux dans les structures associées à l'anxiété.

Lors de l'étude des mémoires aversives, le phénotype cognitif des souris VGLUT3^{-/-}, à savoir la généralisation au contexte, la mémoire contextuelle plus stable et la facilitation de l'extinction n'a pas été retrouvé chez les souris VGLUT3^{flox-SERT^{CRE}}.

Des études antérieures ont montré que des lésions des fibres 5-HT de la BLA entraînent une diminution du niveau de *freezing* lors de l'acquisition de la peur conditionnée et du rappel suite à la présentation du SC et du contexte du conditionnement (Izumi et al., 2012; Johnson et al., 2015). D'autre part, d'autres travaux ont démontré que l'augmentation transitoire de 5-HT extracellulaire améliore l'acquisition et l'expression de peur dans les processus d'apprentissage de peur conditionnée (Browning et al., 2007; Burghardt et al., 2004, 2007; Grillon et al., 2007). Par ailleurs, la surexpression de transporteurs de la recapture de la 5-HT (5-HTT) par utilisation de modèle génétique entraîne une diminution du niveau de *freezing* (Barkus et al., 2014; Bocchio et al., 2015; Jennings et al., 2006; Line et al., 2014; McHugh et al., 2015). Ainsi, il

semble que les neurones de projections 5-HT provenant du raphé dorsal modulent l'activité de la BLA au cours du conditionnement de peur par l'augmentation de libération de la 5-HT (Bocchio et al., 2016).

Par conséquent avec notre approche génétique - les souris $VGLUT3^{\text{floX-SERTCRE}}$ -, nous aurions pu nous attendre à une diminution des niveaux de *freezing* au cours des tests comportementaux de peur reflétant la diminution de la neurotransmission 5-HT induite par l'absence de VGLUT3 à travers son rôle dans la synergie vésiculaire.

Néanmoins, les neurones sérotoninergiques projetant à la fois sur les neurones pyramidaux et les interneurons de la BLA expriment faiblement VGLUT3 (Muller et al., 2007b). En effet, seulement 14% des terminaisons 5-HT sont VGLUT3 positives d'après mes résultats obtenus par l'étude anatomique. Cela signifie que près de 85% des neurones sérotoninergiques continuent à innervier les neurones de la BLA. Il se peut alors que la diminution de 5-HT ne soit pas assez importante pour perturber la transmission 5-HT qui reste fonctionnelle dans les circuits d'apprentissage de peur chez les souris $VGLUT3^{\text{floX-SERTCRE}}$.

Par ailleurs, d'après les résultats anatomiques trouvés, l'absence de VGLUT3 entraînerait plutôt une perte du contrôle de la libération de 5-HT entraînant une augmentation du NT finalement plus importante. Toutefois, étant donné que de divers et nombreux récepteurs 5-HT ayant des actions opposées sont exprimés à la surface des neurones de l'amygdale, il est difficile de conclure quant au rôle de la 5-HT dans ces processus mnésiques (pour revue Bocchio et al., 2016). Les phénotypes observés chez les souris $VGLUT3^{-/-}$ doivent alors avoir une autre origine impliquant un autre sous-système, ou bien être induite par l'association de plusieurs systèmes défailants.

Chez les souris $VGLUT3^{\text{floX-VIAATCRE}}$, l'expression de VGLUT3 est invalidée dans une sous-population d'interneurones GABAergiques du cortex, de l'hippocampe, du cervelet, de l'olive supérieure et de l'amygdale. Lors de la caractérisation anatomique de cette lignée, j'ai pu mettre en évidence une forte diminution de VGLUT3 dans le striatum, où aucune co-localisation VGLUT3-VIAAT n'a été observée. Cette diminution pourrait être expliquée par l'origine embryonnaire des interneurons cholinergiques du striatum.

En effet, des études ont montré que les interneurons GABAergiques et cholinergiques du striatum dérivent d'une même population embryonnaire, celle de l'éminence ganglionique médiale (*medial ganglionic eminence* – MGE) (Anderson et al., 1997; Deacon et al., 1994; Olsson et al., 1995; Zhao et al., 2003). On pourrait alors supposer que la baisse d'expression de

VGLUT3 observée est due à la présence de marqueurs GABAergiques apparus précocement et transitoirement au cours du développement dans les interneurons cholinergiques.

D'après la validation anatomique des lignées, la diminution d'expression de VGLUT3 dans le striatum dorsal est de 57% et celle du NAc de 20% chez les souris VGLUT3^{flox-VIAATCRE} alors que celle observée chez les souris VGLUT3^{flox-ChATCRE} est de 90% dans le striatum dorsal et de 47% dans le NAc. Le pourcentage de baisse de VGLUT3 étant plus faible chez les souris VGLUT3^{flox-VIAATCRE}, ces résultats iraient dans le sens de notre hypothèse de l'existence d'une sous-population cholinergique exprimant transitoirement le GABA.

Comme précédemment, les phénotypes décrits chez les souris VGLUT3^{-/-} ne sont pas observés ici. Tout d'abord, le phénotype hyperlocomoteur des souris VGLUT3^{-/-} ne semble pas apparaître (Gras et al., 2008). Dans cette étude menée au sein du laboratoire, les auteurs attribuent l'apparition de ce phénotype à l'absence de VGLUT3 dans les interneurons cholinergiques VGLUT3 positifs du striatum. Il s'agit de la seule population VGLUT3 positive présente dans le striatum. D'après notre hypothèse, il se pourrait alors que l'inactivation de VGLUT3 dans la sous-population cholinergique exprimant transitoirement le GABA au cours du développement ne soit pas suffisante pour déclencher une altération de la locomotion chez nos animaux. En revanche, l'hyperlocomotion en phase nocturne chez les souris VGLUT3^{-/-} est retrouvée chez les souris invalidées pour VGLUT3 dans le système cholinergique suggérant que ce phénotype apparaîtrait lorsque l'ensemble de la population cholinergique VGLUT3 positive du striatum est atteinte.

D'après les connaissances actuelles et mes résultats portant sur l'étude des processus mnésiques, il semble que les autres systèmes VGLUT3 positifs non touchés chez les souris VGLUT3^{flox-VIAATCRE}, à savoir le système cholinergique par les projections du BF et le système 5-HT via les neurones de projection du raphé dorsal, régulent les circuits de peur et d'extinction empêchant l'altération des phénotypes comportementaux. En effet, d'après mes interprétations, la perte de VGLUT3 dans les neurones GABAergiques entraînerait une augmentation de la transmission inhibitrice dans la BLA.

Les neurones cholinergiques de projections VGLUT3 positifs du BF entraîneraient une augmentation de l'excitation des neurones de peur de la BLA dans le cas d'une perte de VGLUT3 dans ses terminaisons (cf hypothèse émise pour les souris VGLUT3^{-/-} dans le phénotype de facilitation d'extinction). Pour le système 5-HT, la libération de 5-HT peut avoir des effets excitateurs ou inhibiteurs selon les récepteurs sur lesquels elle se fixe (pour revue

Bocchio et al., 2016). Les effets de son augmentation de libération dans la BLA semblent alors difficiles à prédire.

Il est ainsi non aisé de voir de quelle façon l'excitation globale générée par les systèmes ACh et 5-HT peuvent contrebalancer l'augmentation de la transmission GABAergique dans la BLA. La mise en jeu de compensations développementales permettant de rééquilibrer les systèmes suite à la perte de VGLUT3 pourrait être une autre explication plausible à l'absence d'altération des phénotypes comportementaux.

Chez les souris **VGLUT3^{flox-ChATCRE}**, les neurones cholinergiques perdant l'expression de VGLUT3 appartiennent à une sous-population de neurones cholinergiques du BF qui projettent dans la BLA et à une sous-population d'interneurones cholinergiques du striatum (El Mestikawy et al., 2011). Les autres structures impliquées dans les mémoires aversives telles que le cortex préfrontal et l'hippocampe ne seraient pas perturbées dans ce modèle génétique.

Le striatum recevant des projections glutamatergiques du cortex, de l'hippocampe et de l'amygdale basolatérale, n'émet aucune projection cholinergique, et les interneurones cholinergiques qui le constituent sont sa seule source d'ACh.

D'après certaines études, la région ventrale du striatum serait importante dans les mémoires aversives et en particulier dans l'extinction (Holtzman-Assif et al., 2010; Rodriguez-Romaguera et al., 2012; Whittle et al., 2013). Une récente étude a mis en évidence l'existence d'un circuit BLA-NAc participant à la régulation des processus de mémoires aversives. La stimulation optogénétique des terminaisons glutamatergiques présynaptiques de la BLA dans le NAc, aussi bien que l'administration de récompenses au cours de l'apprentissage d'extinction entraînent une diminution du niveau de *freezing* au cours du rappel par la présentation du SC, et une diminution du niveau de corticostérone plasmatique suggérant la réduction des états de stress (Correia et al., 2016). Par ailleurs, la stimulation optogénétique de ce circuit augmente l'activité de l'IL, tandis que son couplage à une infusion de muscimol (un agoniste du GABA) dans le NAc réduit l'activité de l'IL. Cela suggère que le circuit BLA-NAc projette vers l'IL via les neurones de projection du NAc (Correia et al., 2016). D'après notre hypothèse, le muscimol aurait ici l'effet inverse de celui observé par l'absence de VGLUT3 dans les interneurones cholinergiques du NAc, à savoir une augmentation de l'excitation des MSNs. Cette augmentation de la stimulation des MSNs pourrait entraîner l'augmentation de l'activité des neurones principaux de l'IL par un système de déshinhibition via leurs projections sur les interneurones de l'IL. Ainsi, l'absence de VGLUT3 dans le striatum conduirait à une augmentation de l'activation de la voie facilitant l'extinction. On pourrait alors supposer que

les neurones glutamatergiques projetant dans le striatum pourrait être des neurones d'extinction favorisant la voie faisant intervenir l'IL. En revanche, il ne semble pas y avoir de connexions réciproques du NAc vers la BLA (Correia et al., 2016).

Cette hypothèse semble être en désaccord avec les résultats observés chez les $VGLUT3^{\text{floX-ChATCRE}}$ qui présentent une diminution de leur performance dans l'apprentissage d'extinction (via l'indice de progression).

Cependant, les interneurons cholinergiques VGLUT3 positifs ne sont pas les seuls neurones ciblés par cette approche. L'autre population neuronale touchée chez ces animaux pouvant potentiellement jouer un rôle dans l'établissement des mémoires aversives est la population de neurones de projections cholinergiques VGLUT3 positifs du BF vers la BLA. Des études ont montré que des lésions des neurones de projections cholinergiques du BF vers la BLA entraînent des perturbations du conditionnement de peur contextuelle (Power and McGaugh, 2002). D'autre part, d'autres résultats ont mis en évidence que l'inactivation optogénétique de ces projections entraîne une diminution de l'acquisition de la peur conditionnée et de la mémoire élémentaire. En revanche, leur activation génère une résistance à l'extinction (Jiang, 2016).

D'après l'hypothèse émise pour les souris $VGLUT3^{-/-}$ dans le phénotype de facilitation d'extinction, la perte de VGLUT3 dans les neurones de projections VGLUT3 positifs du BF conduirait à une augmentation de la libération d'ACh dans la BLA. On s'attend alors à observer une diminution de l'apprentissage d'extinction. En effet, le seul phénotype observé chez les souris $VGLUT3^{\text{floX-ChATCRE}}$ est une altération de la cinétique d'apprentissage d'extinction visible via l'analyse de l'indice de progression, suggérant que le processus d'extinction est légèrement moins efficace.

Ainsi, il est possible que les deux voies impliquées dans les processus de mémoires aversives interviennent : 1) la voie facilitant l'extinction par l'augmentation de la désinhibition des neurones principaux de l'IL via les projections GABergiques du NAc, et 2) celle des états de haut niveau de peur à travers l'activation des neurones de peur par les projections du BF. L'activation de ces deux voies régulant des processus mnésiques aversifs opposés pourrait expliquer l'absence de phénotype observée pour les mémoires contextuelle et élémentaire et le faible phénotype observé pour la mémoire d'extinction chez les souris $VGLUT3^{\text{floX-ChATCRE}}$. Il apparaît que le NAc projette également mais de façon plus modérée sur le PL (Correia et al., 2016). Ces connexions pourraient favoriser la voie des états de haut niveau de peur et expliquer la balance préférentielle mais faible vers une diminution de la mémoire d'extinction chez les souris $VGLUT3^{\text{floX-ChATCRE}}$.

L'absence de phénotype au sein de certaines lignées pourrait également s'expliquer par la nécessité du recrutement de plusieurs sous-systèmes. En effet, il se pourrait que l'invalidation de VGLUT3 dans un sous-système ne soit pas suffisante pour perturber l'efficacité des processus comportementaux. Ainsi, pour voir l'effet de VGLUT3, l'addition de l'invalidation de VGLUT3 dans au moins deux sous-systèmes pourrait s'avérer nécessaire.

D'autre part, on peut également penser qu'il existerait des compensations développementales de VGLUT3. En effet, le rôle présumé de VGLUT3 est un rôle de modulateur de la transmission neuronale. Il est possible que de nouveaux mécanismes de régulation et notamment des rétro-contrôles négatifs, se mettent en place ou bien que ceux déjà existants soient renforcés.

Etant donné que les VGLUTs partagent un grand nombre de propriétés similaires, la question de la présence d'un transporteur vésiculaire du glutamate autre que VGLUT3 dans les neurones invalidés pourrait se poser. Il serait alors intéressant de vérifier la présence de VGLUT1 et VGLUT2 dans les neurones où la présence de VGLUT3 a été identifiée au sein de nos différentes lignées.

Pour vérifier d'un point de vue comportemental si l'invalidation de VGLUT3 dans chacun des sous-systèmes n'affecte pas les phénotypes comportementaux étudiés, et être plus spécifique par le ciblage d'une population neuronale VGLUT3 positive précise, j'ai choisi d'utiliser par la suite une stratégie d'injection virale.

*Etude II : Caractérisation Comportementale
de VGLUT3 dans l'amygdale basolatérale*

CHAPITRE III :
INVALIDATION SPECIFIQUE DE VGLUT3 DANS LES TERMINAISONS CHOLINERGIQUES
OU GABAERGIQUES DE L'AMYGDALE BASOLATERALE : IMPLICATION DANS LES
MEMOIRES EMOTIONNELLES

I/ Introduction

Afin de déterminer si l'absence de phénotype observée chez les souris invalidées pour VGLUT3 par construction génétique est due à l'approche utilisée et pour définir plus spécifiquement le rôle de VGLUT3 dans différentes populations neuronales ciblées, j'ai choisi d'opter pour une approche virale permettant de cibler l'invalidation de VGLUT3 dans un premier temps dans les terminaisons GABAergiques et dans un deuxième temps dans les terminaisons cholinergiques de l'amygdale basolatérale.

D'après ma caractérisation anatomique, la nature des neurones possédant VGLUT3 dans l'amygdale basolatérale est GABAergique. Ainsi, la première cible choisie pour les injections virales a été la population d'interneurones GABAergiques VGLUT3 positifs de l'amygdale basolatérale (**Figure 67**).

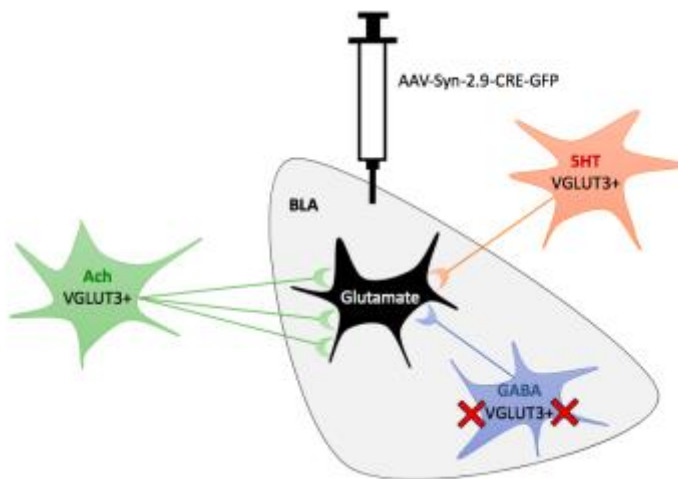


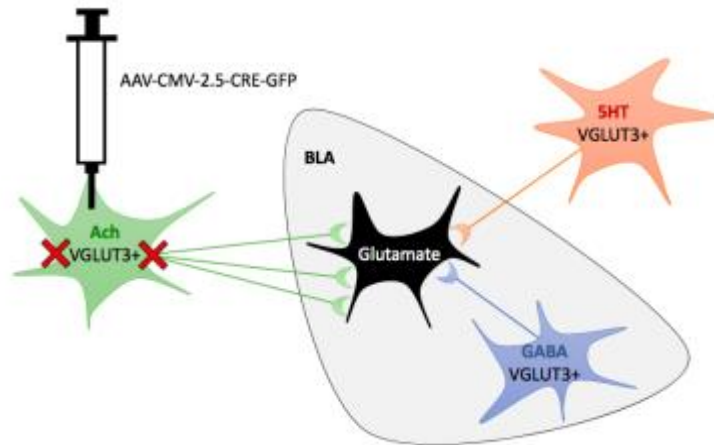
Figure 67 : Schéma illustrant l'invalidation de VGLUT3 dans les interneurones GABAergiques VGLUT3 positifs de la BLA.

Le virus AAV-Syn-2.9-CRE-GFP est injecté dans la BLA des souris $VGLUT3^{flox/flox}$ afin d'invalider VGLUT3 dans les interneurones GABAergiques VGLUT3 positifs.

D'autre part, la majorité des terminaisons VGLUT3 positives de l'amygdale basolatérale sont cholinergiques selon mon étude anatomique. De plus, d'après l'étude de Nickerson Poulin, la majorité des neurones de projection cholinergiques VGLUT3 positif proviennent du BF (Nickerson Poulin et al., 2006). Je me suis donc intéressée au rôle de VGLUT3 dans ces neurones de projection cholinergiques en ciblant par injection virale le BF (**Figure 68**).

Figure 68 : Schéma illustrant l'inactivation de VGLUT3 dans les neurones cholinergiques VGLUT3 positifs de la BLA.

Le virus AAV-CMV-2.5-CRE-GFP est injecté dans le BF des souris VGLUT3^{flox/flox} afin d'invalider VGLUT3 dans les neurones cholinergiques VGLUT3 positifs.



Après avoir réalisé les mêmes tâches comportementales que celles précédemment décrites pour la caractérisation des différentes lignées génétiques, j'ai effectué la vérification anatomique des injections afin d'observer le pourcentage de diminution d'expression de VGLUT3 dans les zones d'intérêt et valider mes résultats comportementaux.

II/ Matériel et Méthodes

II.1/ Animaux

Les souris utilisées pour cette approche sont les souris de la lignée VGLUT3^{flox/flox}. A l'aide d'un virus possédant la CRE, l'exon 2 de notre gène d'intérêt VGLUT3 encadré par des sites LoxP va être excisé rendant la protéine VGLUT3 non fonctionnelle (**Figure 69**).

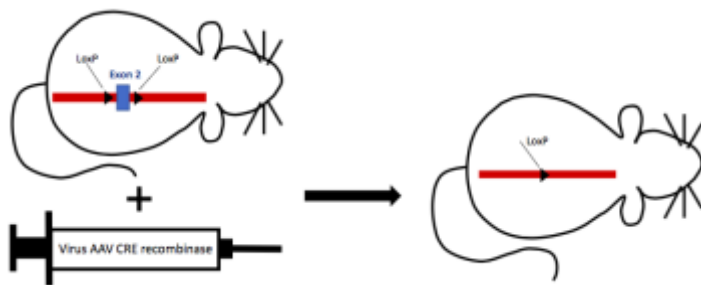


Figure 69 : Schéma illustrant l'inactivation de VGLUT3 par le système CRE-LOX.

Les souris invalidées pour VGLUT3 sont celles injectées avec le virus CRE-GFP, leurs contrôles sont injectées avec le virus possédant uniquement la GFP.

II.2/ Etudes comportementales

Le nombre de souris utilisées pour chacun des tests comportementaux est de 24 (VGLUT3^{flox:flox}:AAV2.9-GFP, n=12 ; VGLUT3^{flox/flox}:AAV2.9-CRE-GFP, n=12).

Pour le FC et l'extinction, le stimulus discret utilisé est le son.

L'ensemble des informations concernant les protocoles utilisés est détaillé dans le Matériel et Méthodes Générales (cf pages 123-126).

III/ Résultats

III.1/ Invalidation de VGLUT3 dans les interneurons GABAergiques de l'amygdale basolatérale

III.1.a) Validation des injections

Après avoir testé différents virus et au regard des résultats publiés dans la littérature, le virus AAV Syn-2.9 a été choisi pour inactiver VGLUT3 dans les interneurons GABAergiques VGLUT3 positifs de l'amygdale basolatérale (Holehonnur et al., 2014).

Les injections ont été validées par immunohistochimie dirigée contre VGLUT3. Les résultats de la quantification montrent que la diminution de l'expression de VGLUT3 est autour de 30% dans l'amygdale basolatérale pour chacune des souris incluses dans les résultats des tests comportementaux (**Figure 70** ; données non présentées).

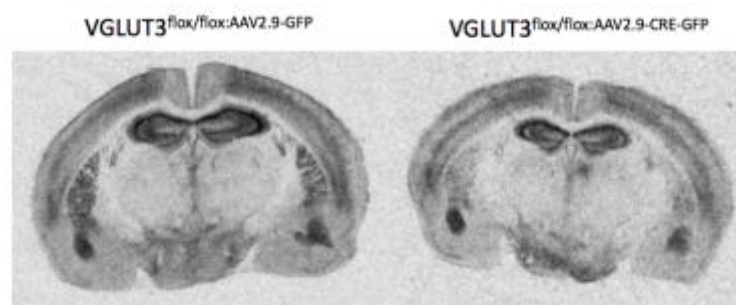


Figure 70 : Souris VGLUT3^{flox/flox} injectées avec le virus AAV2.9-CRE-GFP ou AAV2.9-GFP dans la BLA.

III.1.b) Activité locomotrice

L'activité locomotrice horizontale spontanée ainsi que l'activité verticale présentent une différence significative entre les souris injectées avec le virus CRE-GFP et celles injectées avec le virus GFP (**Figure 71 A** ; $F(1,24)=4,475$, $p=0,0450$, ANOVA à mesures répétées, **B** ; $F(1,24)=7,485$, $p=0,0450$, $p=0,0115$, ANOVA à mesures répétées).

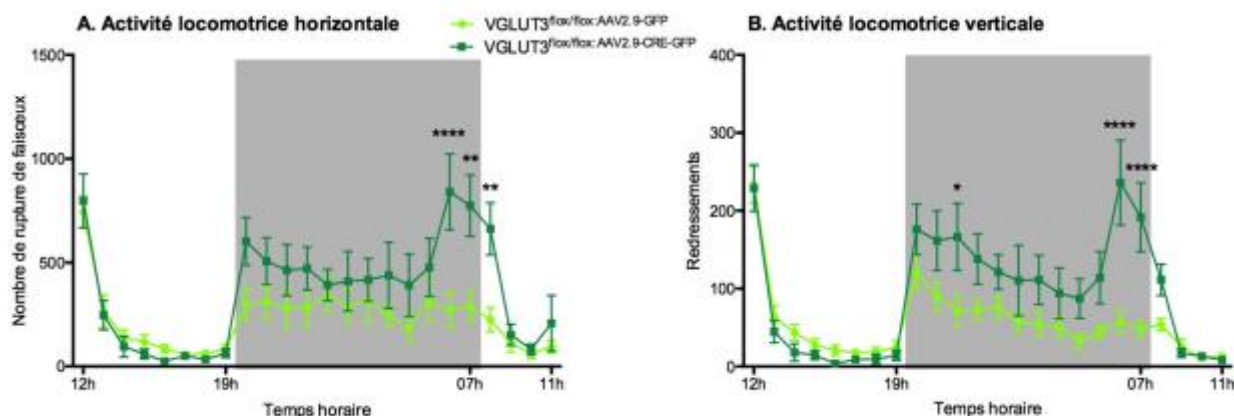


Figure 71 : Activité locomotrice spontanée chez les souris injectées dans la BLA.

Les activités locomotrices horizontale et verticale des souris $VGLUT3^{flox/flox:AAV2.9-CRE-GFP}$ semblent plus importantes que celles des souris $VGLUT3^{flox/flox:AAV2.9-GFP}$.

L'inactivation de VGLUT3 dans les interneurons GABAergiques VGLUT3 positifs de la BLA entraîne une augmentation de l'activité locomotrice pendant la phase nocturne, avec un rebond particulièrement marqué en fin de nuit (autour de 6h du matin).

III.1.c) Anxiété

Pour tester l'anxiété, les résultats issus du test de l'Open Field montrent que les souris $VGLUT3^{flox/flox:AAV2.9-CRE-GFP}$ passent moins de temps dans la zone centrale, qui est la zone anxiogène, par rapport à leurs contrôles (**Figure 72 A** ; $p=0,0426$, unpaired t test avec correction de Welch) ce qui impliquerait que les souris $VGLUT3^{flox/flox:AAV2.9-CRE-GFP}$ sont plus anxieuses que les contrôles.

Toutefois, les souris invalidées présentent moins d'inactivité que les contrôles dans la zone centrale tout en parcourant la même distance (**Figure 72 A** ; indice d'inactivité dans la zone centrale : $p=0,0003$, distance parcourue dans la zone centrale : $p=0,7399$, unpaired t test avec correction de Welch). Cela suggère que les souris invalidées parcourent plus rapidement la zone anxiogène que leurs contrôles. Dans la zone périphérique, on remarque que le temps passé et la distance parcourue sont plus importants chez les souris $VGLUT3^{flox/flox:AAV2.9-CRE-GFP}$ (**Figure**

72 A ; temps passé dans la zone périphérique : $p=0,0454$, distance parcourue dans la zone périphérique : $p=0,0464$, unpaired t test avec correction de Welch), et que l'indice d'inactivité n'est pas différent (**Figure 72 A** ; indice d'inactivité dans la zone périphérique : $p=0,0899$, unpaired t test avec correction de Welch), reflétant l'hyperlocomotion identifiée grâce à l'actimétrie. L'ensemble de ces résultats en OF suggère que l'inactivation de VGLUT3 entraîne l'apparition d'un phénotype de type anxieux par l'augmentation de la vitesse d'exploration dans la zone anxiogène.

Cependant, lorsque l'on teste ces souris en EPM, on remarque que les souris invalidées passent plus de temps dans cette zone anxiogène et entrent plus fréquemment dans les bras ouverts (**Figure 72 B** ; % temps passé dans les bras ouverts, $p=0,0063$; % nombre d'entrées dans les bras ouverts, $p=0,0092$, unpaired t test avec correction de Welch). La distance parcourue dans les bras ouverts est également plus importante chez les souris $VGLUT3^{\text{flo}/\text{flo}} : \text{AAV2.9-CRE-GFP}$ et l'indice d'inactivité n'est pas différent (**Figure 72 B** : distance parcourue dans les bras ouverts : $p=0,0121$, indice d'inactivité dans les bras ouverts $p=0,2826$, unpaired t test avec correction de Welch) ce qui signifierait que l'augmentation de temps passé dans les bras ouverts n'est pas due à un comportement de *freezing* des souris. On observe également que le comportement des deux groupes n'est pas différent dans les bras fermés (**Figure 72 B** ; % temps passé distance parcourue dans les bras : $p=0,1260$, distance parcourue dans les bras fermés : $p=0,9649$, indice d'inactivité dans les bras fermés, $p=0,4382$, unpaired t test avec correction de Welch) montrant l'absence de phénotype hyperlocomoteur.

L'augmentation de la fréquentation et du temps passé dans les bras ouverts irait dans le sens d'un phénotype de type anxieux diminué chez les animaux invalidés.

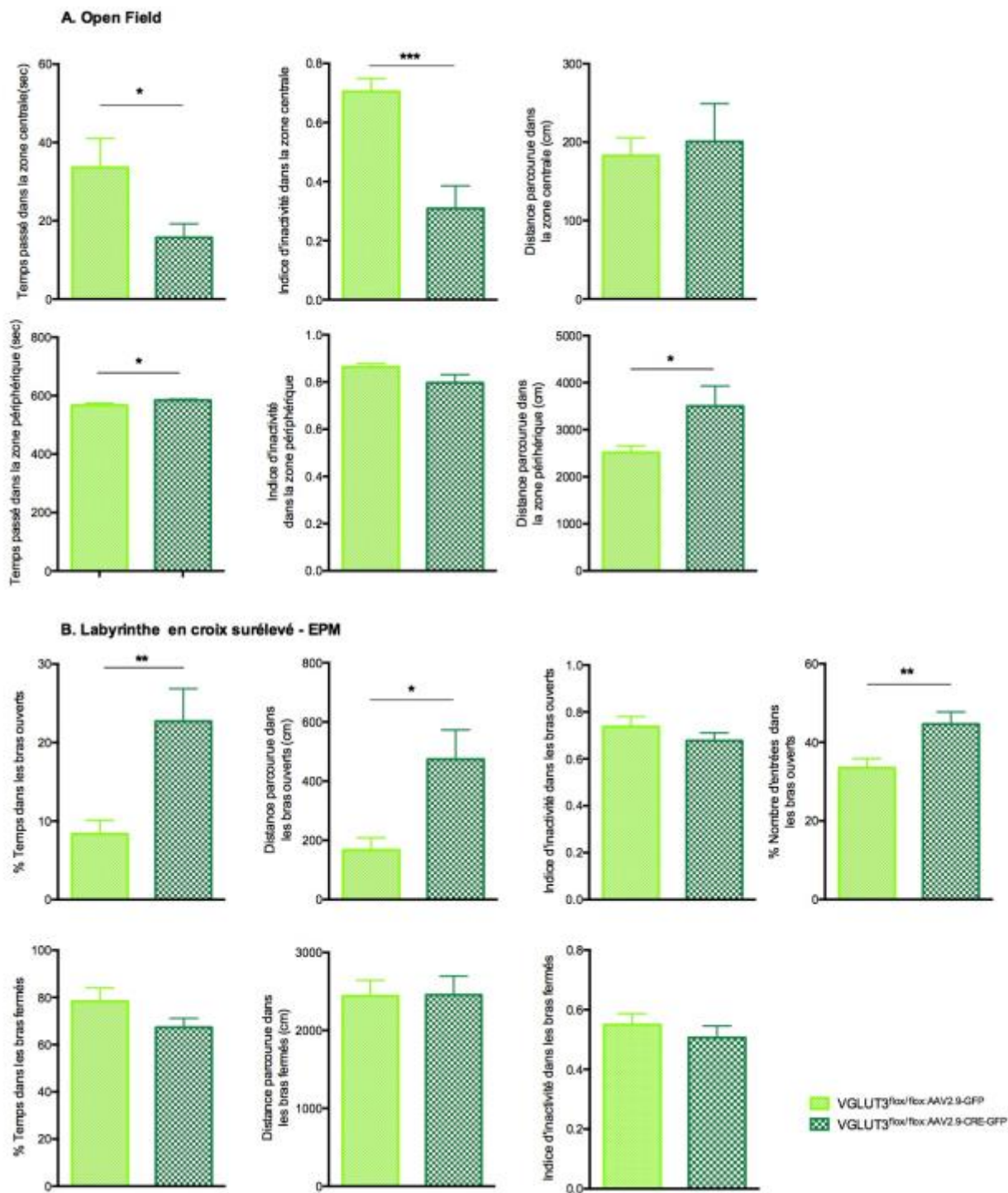


Figure 72 : Etude du phénotype anxieux chez les souris invalidées pour VGLUT3 dans la BLA.

A) Au cours du test de l'Open Field, la vitesse d'exploration dans la zone anxiogène est augmentée chez les souris VGLUT3^{flox/flox}:AAV2.9-CRE-GFP. B) Lors du test d'EPM, les souris invalidées montrent une fréquentation plus importante de la zone anxiogène que leurs contrôles.

III.1.d) Test du conditionnement de peur - FC

Les résultats de peur conditionnée sont présentés dans la **Figure 73**. En ce qui concerne le jour du conditionnement, les souris montrent un apprentissage similaire avec cependant une expression du comportement de peur plus forte chez les souris VGLUT3^{flox/flox:AAV2.9-CRE-GFP} après la première présentation son-choc (**Figure 73 A** ; $F(1,24)=3,997$, $p=0,0570$, ANOVA à mesures répétées ; à 180 sec : $t(192)=0,6554$, test de comparaison multiple de Sidak) laissant penser que l'association entre ces deux stimuli serait plus forte chez ces souris.

Toutefois, lorsque l'on analyse les mémoires aversives, on remarque que les souris invalidées pour VGLUT3 présentent un niveau de freezing plus faible que les souris contrôles pour la mémoire contextuelle (**Figure 73 B** ; cinétique de gauche : $F(1,24)=5,626$, $p=0,0261$, ANOVA à mesures répétées ; moyenne : $p=0,0258$, unpaired t test avec correction de Welch ; histogramme de droite: de 0-180 sec : $t(48)=2,566$, de 180-360 sec : $t(48)=1,410$, test de comparaison multiple de Sidak) et pour la mémoire élémentaire (**Figure 73 C** ; histogramme de droite, présentation du son : $t(48)=2,716$, test de comparaison multiple de Sidak). L'association son-choc est plus faible chez les souris invalidées que les souris contrôles (**Figure 73 C** ; histogramme de droite : VGLUT3^{flox/flox:AAV2.9-GFP} : $t(24)=7,364$, VGLUT3^{flox/flox:AAV2.9-CRE-GFP} : $t(24)=3,091$, test de comparaison multiple de Sidak).

D'autre part, lorsque l'on compare par groupe l'exploration libre des trois premières minutes dans le test au contexte par rapport à celles du test au contexte modifié, on s'aperçoit que les souris invalidées ne présentent pas de différence de *freezing* suggérant une défaillance dans l'association du contexte au SI par rapport aux souris contrôles (**Figure 73 D** ; VGLUT3^{flox/flox:AAV2.9-GFP} : $t(24)=5,614$, VGLUT3^{flox/flox:AAV2.9-CRE-GFP} : $t(24)=1,857$, test de comparaison multiple de Sidak).

D'après ces résultats, l'invalidation de VGLUT3 dans les interneurons GABAergiques de la BLA entraîne un déficit d'association contextuelle et une diminution de la mémoire élémentaire.

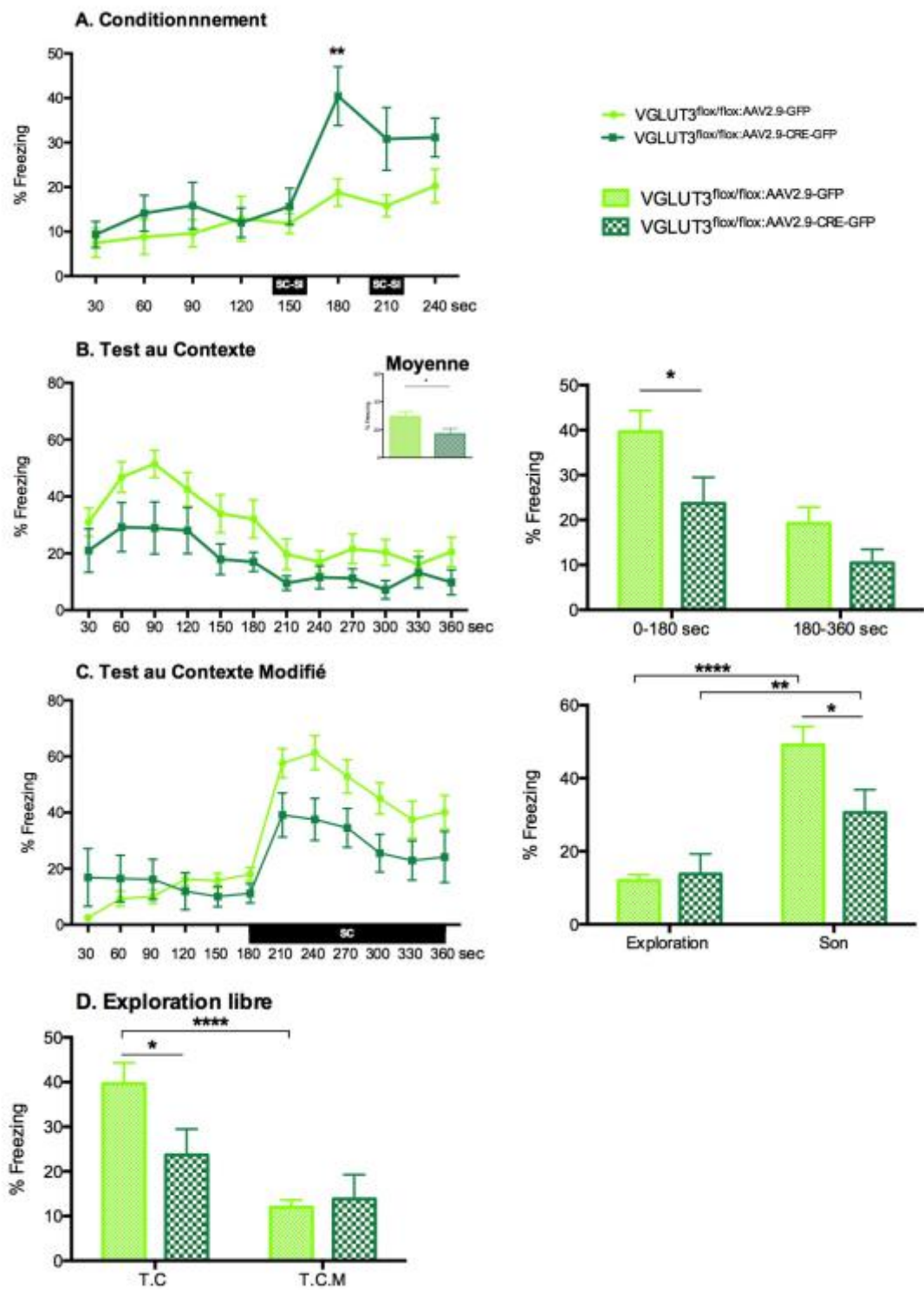


Figure 73 : Conditionnement de peur chez les souris invalidées pour VGLUT3 dans la BLA.

A) La courbe d'apprentissage est similaire entre les deux groupes de souris. B-C) Les mémoires contextuelle et élémentaire diminuent chez les souris VGLUT3^{flox/flox}:AAV2.9-CRE-GFP par rapport aux souris VGLUT3^{flox/flox}:AAV2.9-GFP. L'association son-choc est moins forte pour les souris invalidées.

III.1.e) Test d'Extinction de conditionnement de peur

Après 8 jours d'extinction, on remarque que les deux groupes de souris présentent un niveau de *freezing* identique aux alentours de 28% et proche du niveau basal attendu de 20% (**Figure 74 A-B**). En revanche, on observe que les souris $VGLUT3^{\text{flox/flox-AAV2.9-CRE-GFP}}$ n'arrivent pas atteindre le même taux de *freezing* que les souris $VGLUT3^{\text{flox/flox-AAV2.9-GFP}}$ même après 10 présentations du son-choc lors des premières présentations du son le jour 2 (**Figure 74 B** ; $t(168)=3,409$, test de comparaison multiple de Sidak). Comme illustré sur la **Figure 74 B**, les souris contrôles $VGLUT3^{\text{flox/flox-AAV2.9-GFP}}$ présentent une courbe d'extinction attendue avec une diminution progressive du niveau de *freezing* suite aux présentations successives du son (J2 vs. J8, $t(144)=7,371$, test de comparaison multiple de Sidak), alors que les les souris $VGLUT3^{\text{flo/floxx-AAV2.9-CRE-GFP}}$ ne présentent aucune évolution significative de leur niveau de *freezing* (J2 vs. J8, $t(144)=2,002$, test de comparaison multiple de Sidak).

Lorsque l'on teste le renouvellement de la peur (*fear renewal*) dans l'environnement du conditionnement, on remarque que les souris invalidées pour $VGLUT3$ présentent un niveau de *freezing* plus bas que les contrôles (**Figure 74 D** ; cinétique de gauche : $F(1,24)=7,316$, $p=0,0124$, ANOVA à mesures répétées ; histogramme de droite : S1-S5 : $t(48)=2,021$, S6-S10 : $t(48)=2,930$, test de comparaison multiple de Sidak). Etant donné que ces animaux n'ont jamais atteint le niveau du groupe contrôle, cette différence est très certainement due à un déficit associatif plus qu'à un déficit de rappel mnésique.

Il est intéressant de noter que l'expression du *freezing* lors de l'exploration libre de l'environnement au cours des deux premières minutes de tests (de J2 à J8, avant l'émission des sons) n'est pas différent entre les deux groupe (**Figure 74 C** ; $F(1,14)=0,8285$, $p=0,3781$, ANOVA à mesures répétées) mais évolue au cours de l'extinction ($F(7,98)=3,254$, $p=0,0038$, ANOVA à mesures répétées). Lors du J15, le taux de *freezing* au contexte d'origine est relativement haut (de l'ordre de 40% ; $VGLUT3^{\text{flox/flox-AAV2.9-GFP}}$: $t(98)=3,557$, $VGLUT3^{\text{flox/flox-AAV2.9-CRE-GFP}}$: $t(98)=2,154$, test de comparaison multiple de Sidak) pour les deux groupes et ne présente pas de différence significative entre les deux groupes de souris ($t(112)=1,027$, test de comparaison multiple de Sidak).

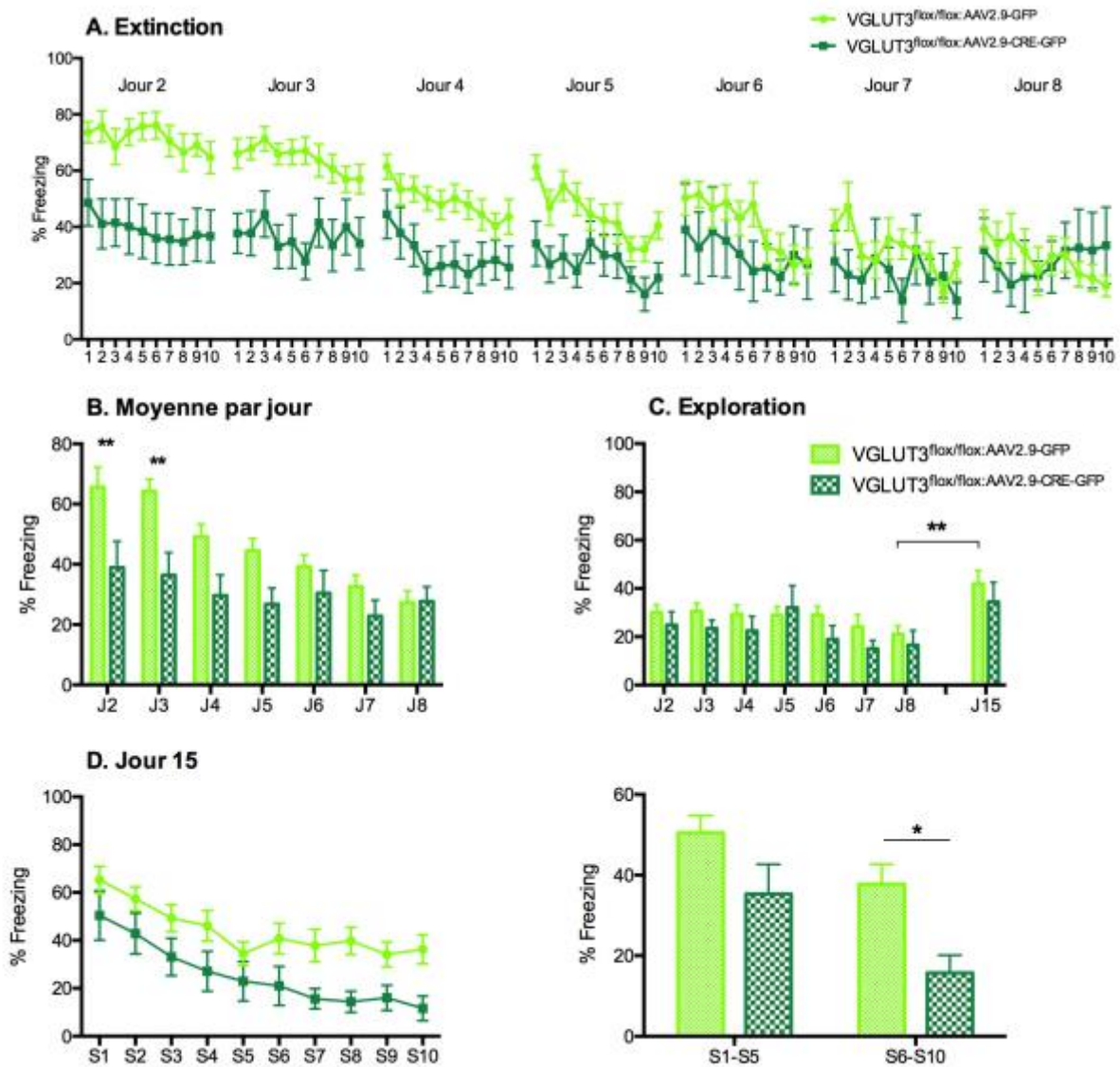


Figure 74 : Extinction de peur chez les souris injectées dans l'amygdale basolatérale.

A-B) L'apprentissage d'extinction ne semble pas avoir lieu chez les souris $VGLUT3^{flox/flox}:AAV2.9-CRE-GFP$ contrairement au souris $VGLUT3^{flox/flox}:AAV2.9-GFP$. B) Le rappel de la mémoire de peur dans le contexte original du conditionnement est plus faible chez les souris $VGLUT3^{flox/flox}:AAV2.9-CRE-GFP$. C) Le niveau de *freezing* lors des deux premières minutes d'exploration du jour 2-8 et lors du jour 15 n'est pas différent entre les souris contrôles et mutantes.

L'inactivation de VGLUT3 dans les interneurons GABAergiques de la BLA semble réduire l'association permettant l'apprentissage d'extinction.

III.2/ Invalidation spécifique de pour VGLUT3 dans les neurones cholinergiques du *basal forebrain*

III.2.a) Validation des injections

L'inactivation de VGLUT3 des neurones cholinergiques du basal forebrain a été réalisé grâce à l'injection du virus AAV-CMV 2.5 dans le *basal forebrain* (cf page 122).

Les injections ont été validées par immunoautoradiographie dirigée contre VGLUT3 (**Figure 75**). Les résultats de la quantification montrent que la diminution de l'expression de VGLUT3 est autour de 60% dans le *basal forebrain* pour chacune des souris incluses dans les résultats des tests comportementaux (données non présentées), ce qui correspond au niveau d'expression de VGLUT3 dans les terminaisons cholinergiques amygdaliennes (cf résultats d'anatomie *Etude I, Chapitre II*, page 136).



Figure 75 : Souris VGLUT3^{flox/flox} injectées avec le virus AAV2.5-CRE-GFP ou AAV2.5-GFP dans le BF.

III.2.b) Activité locomotrice

Comme illustré sur la **Figure 76**, l'activité de locomotion spontanée horizontale (**A**) et l'activité verticale (**B**) analysées ne sont pas significativement différentes entre les souris VGLUT3^{flox-AAV2.5-CRE-GFP} et les souris VGLUT3^{flox-AAV2.5-GFP} (**Figure 76 A** ; $F(1,22)=0,1027$, $p=0,7517$, **B** : $F(1,22)=0,1475$, $p=0,7046$, ANOVA à mesures répétées).

L'inactivation de VGLUT3 dans les neurones cholinergiques de projection VGLUT3 positifs du BF ne perturbe pas l'activité locomotrice des animaux.

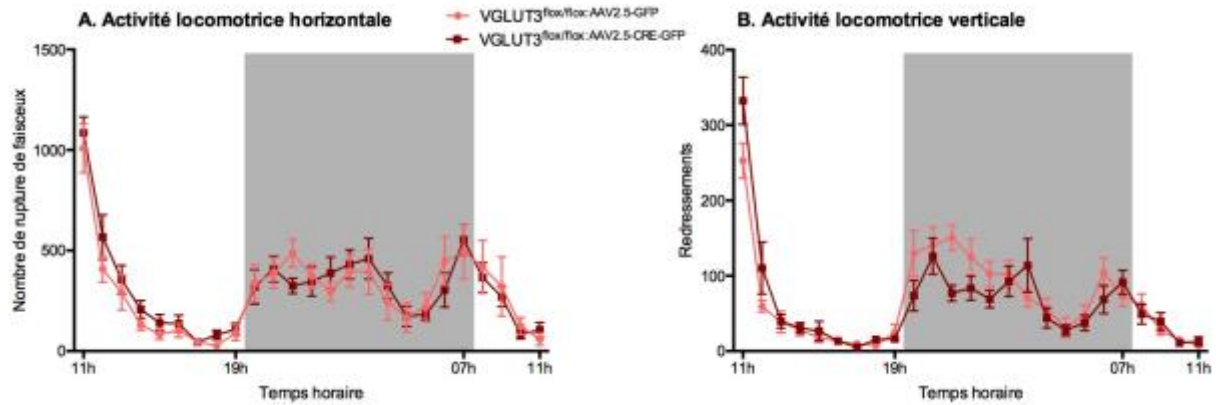


Figure 76 : Activité locomotrice spontanée chez les souris injectées dans le BF testée en actimétrie.

L'activité locomotrice horizontale entre les souris $VGLUT3^{flox/flox}:AAV2.5-CRE-GFP$ et $VGLUT3^{flox/flox}:AAV2.5-GFP$ n'est pas différente, tout comme l'activité locomotrice verticale.

III.2.c) Anxiété

Pour les tests d'anxiété, les résultats ne révèlent aucune différence entre les deux groupes de souris en OF (**Figure 77 A** ; temps passé dans la zone centrale : $p=0,1890$, distance parcourue dans la zone centrale : $p=0,0891$, distance parcourue dans la zone périphérique : $p=0,2836$, unpaired t test avec correction de Welch), et en EPM (**Figure 77 B** ; %nombre d'entrées dans les bras ouverts : $p=0,6887$, %temps passé dans les bras ouverts : $p=0,8117$, nombre total d'entrées : $p=0,9283$, unpaired t test avec correction de Welch).

L'inactivation de VGLUT3 dans les neurones cholinergiques VGLUT3 positifs du BF n'affecte pas les phénotypes de type anxieux de ces souris.

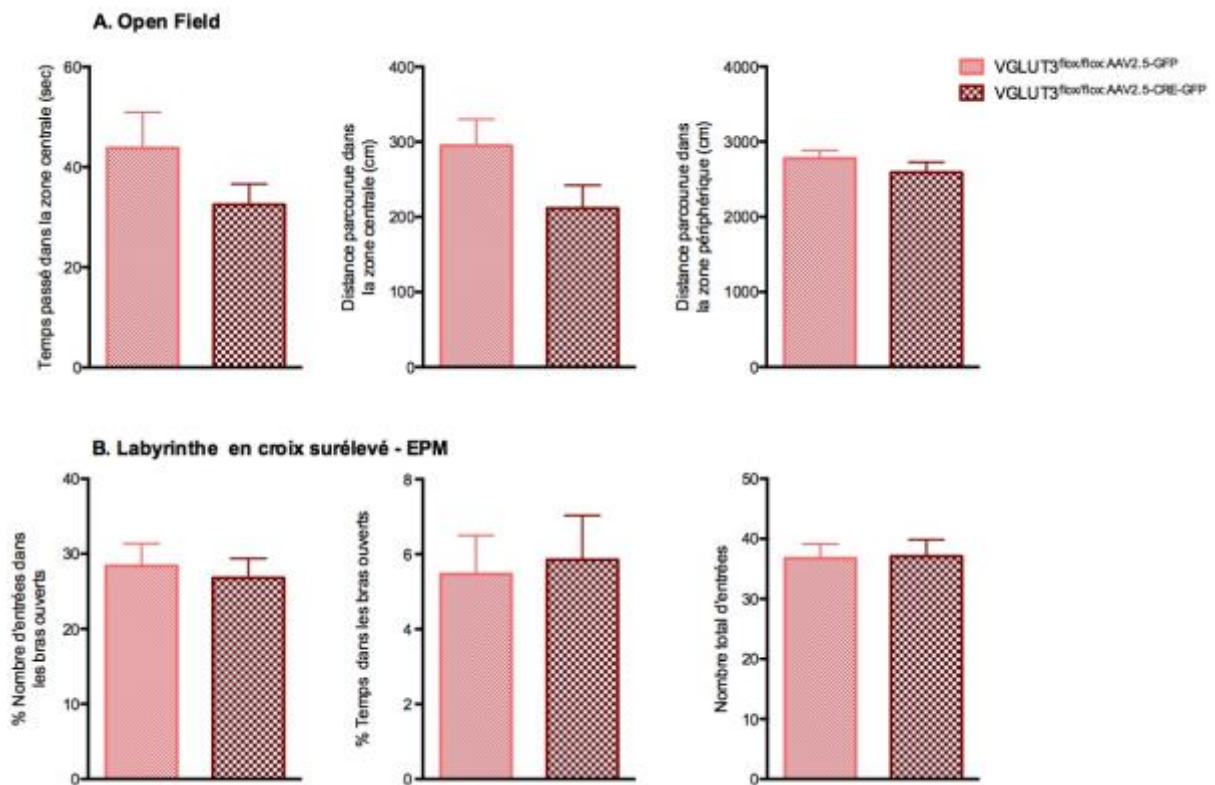


Figure 77 : Etude du phénotype anxieux chez les souris invalidées pour VGLUT3 dans le BF.

L'invalidation de VGLUT3 dans le BF ne semble pas entraîner l'apparition de phénotype de type anxieux chez ces animaux en Open Field (A) et EPM (B).

III.2.d) Test du conditionnement de peur - FC

Lors du paradigme de peur conditionné, les animaux présentent un apprentissage similaire (**Figure 78 A** ; $F(1,22)=0,03026$, $p=0,8635$, ANOVA à mesures répétées), toutefois, les résultats des souris invalidées pour VGLUT3 montrent une augmentation significative du taux de *freezing* lors du test au contexte (**Figure 78 B** ; histogramme de droite, $p=0,0079$, unpaired t test avec correction de Welch) mais également au cours du test au contexte modifié (**Figure 78 C** ; histogramme de droite : $F(1,20)=5,673$, $p=0,0273$, ANOVA à mesures répétées) par rapport aux souris contrôles.

Ainsi, cette invalidation de VGLUT3 dans les neurones cholinergiques VGLUT3 positif du *basal forebrain* a pour conséquence d'augmenter les mémoires contextuelle et élémentaire et ainsi potentialiser les processus d'apprentissage aversif.

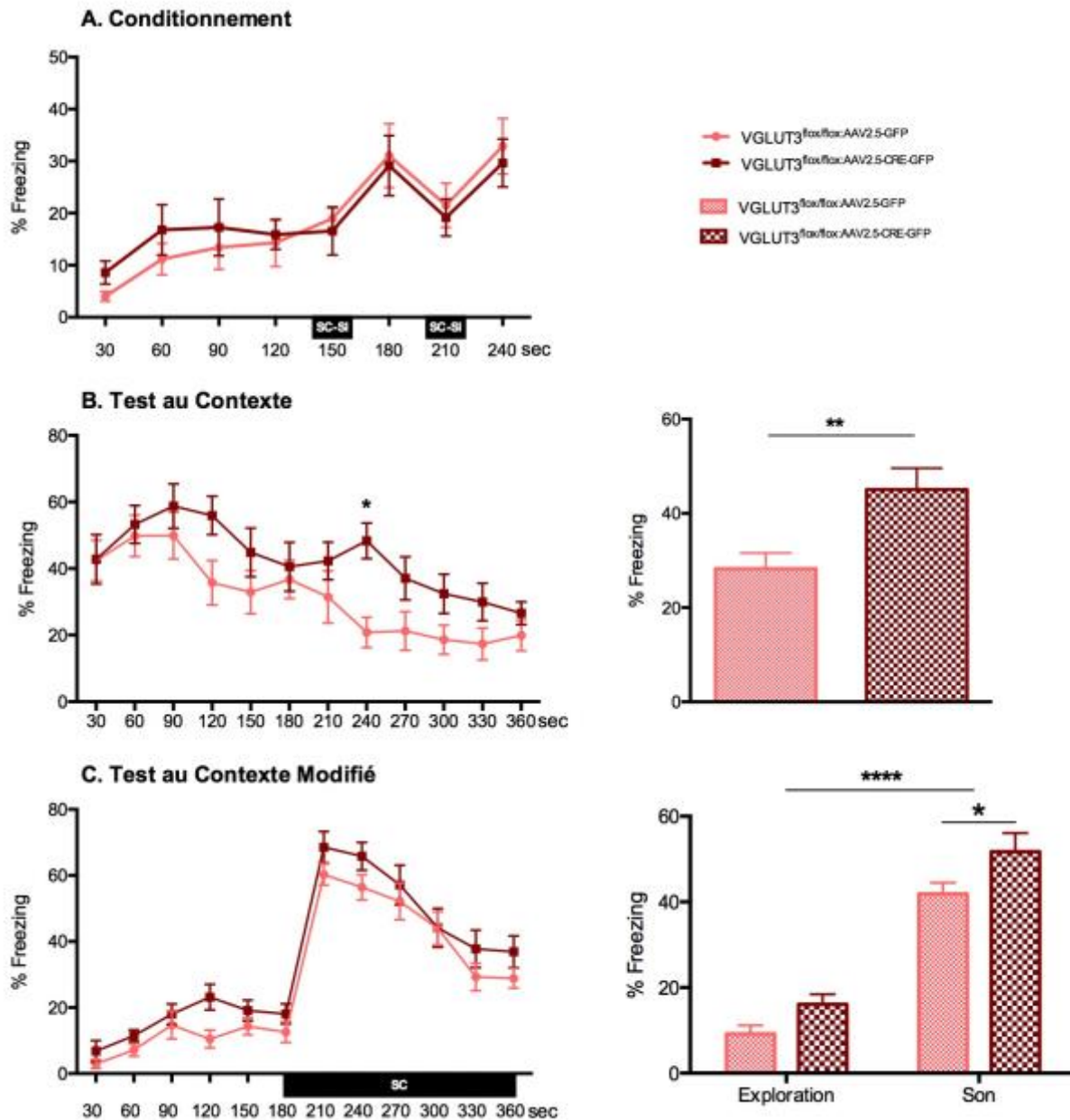


Figure 78 : Conditionnement de peur chez les souris invalidées pour VGLUT3 dans le BF.

A) La courbe d'apprentissage de conditionnement de peur est similaire entre les deux groupes de souris. B-C) Les mémoires contextuelle et élémentaire sont plus fortes chez les souris VGLUT3^{flx/flx}:AAV2.5-CRE-GFP par rapport à leurs contrôles. L'association son-choc a bien eu lieu pour les deux groupes ($p < 0,0001$, ANOVA à mesures répétées).

III.2.e) Test d'Extinction de conditionnement de peur

La **Figure 79** présente les résultats du test d'extinction. Nous constatons que les deux groupes de souris présentent un apprentissage d'extinction avec un retour à un niveau basal de *freezing* au jour 8 (**Figure 79 A** ; $F(69,1518)=27,49$, $p<0,0001$, ANOVA à mesures répétées). Si l'on regarde plus attentivement les premiers jours (**Figure 79 A-B**), on s'aperçoit que le niveau de *freezing* des souris $VGLUT3^{\text{floX/floX:AAV2.5-CRE-GFP}}$ reste plus haut que celui des souris contrôles ce qui signifierait que l'apprentissage d'extinction nécessite plus de temps à s'opérer chez les souris $VGLUT3^{\text{floX/floX:AAV2.5-CRE-GFP}}$ que chez leurs contrôles (**Figure 79 A** ; $F(1,22)=5,991$, $p=0,0228$, ANOVA à mesures répétées). L'analyse des données moyennées par jour (**Figure 79 B**) met en évidence l'évolution du *freezing* au cours du temps ($F(6,132)=87,43$, $p<0,0001$, ANOVA à mesures répétées) ainsi qu'une différence significative entre les deux groupes d'animaux ($F(1,22)=5,991$, $p=0,0228$, ANOVA à mesures répétées). Le test post hoc révèle un plus fort taux de *freezing* pour les souris invalidées uniquement pour le J3 ($t(154)=3,203$, test de comparaison multiple de Sidak).

La mémoire au conditionnement initial n'est quant à elle pas impactée suite à cette inactivation virale ($F(1,22)=0,1968$, $p=0,6616$, ANOVA à mesures répétées) comme nous pouvons le constater sur la **Figure 79 D**. En revanche, il est intéressant de noter que lors du conditionnement d'extinction (J2 à J8), l'expression du *freezing* lors de l'exploration de l'environnement avant la présentation des chocs est significativement plus importante chez les animaux injectés avec la CRE que chez leurs contrôles (**Figure 79 C** ; $F(1,22)=8,678$, $p=0,0075$, ANOVA à mesures répétées) et que celui-ci évolue au cours de l'extinction (**Figure 79 C** ; $F(7,154)=10,60$, $p<0,0001$, ANOVA à mesures répétées). A J15, aucune différence n'est observée entre les deux groupes (**Figure 79 C** ; $t(176)=2,359$, test de comparaison multiple de Sidak) avec une tendance à une moyenne plus importante chez le groupe CRE comme observée lors du test au contexte. La mémoire contextuelle liée à l'association au SI est réactivée chez les deux groupes de souris (**Figure 79 C** ; J8-J15 : $VGLUT3^{\text{floX/floX:AAV2.5-GFP}}$: $t(154)=4,248$, $VGLUT3^{\text{floX/floX:AAV2.5-CRE-GFP}}$: $t(154)=5,676$, test de comparaisons multiples de Sidak).

Ainsi, l'invalidation constitutive de VGLUT3 dans les neurones cholinergiques $VGLUT3$ positif du basal forebrain semble ralentir le phénomène d'extinction de peur.

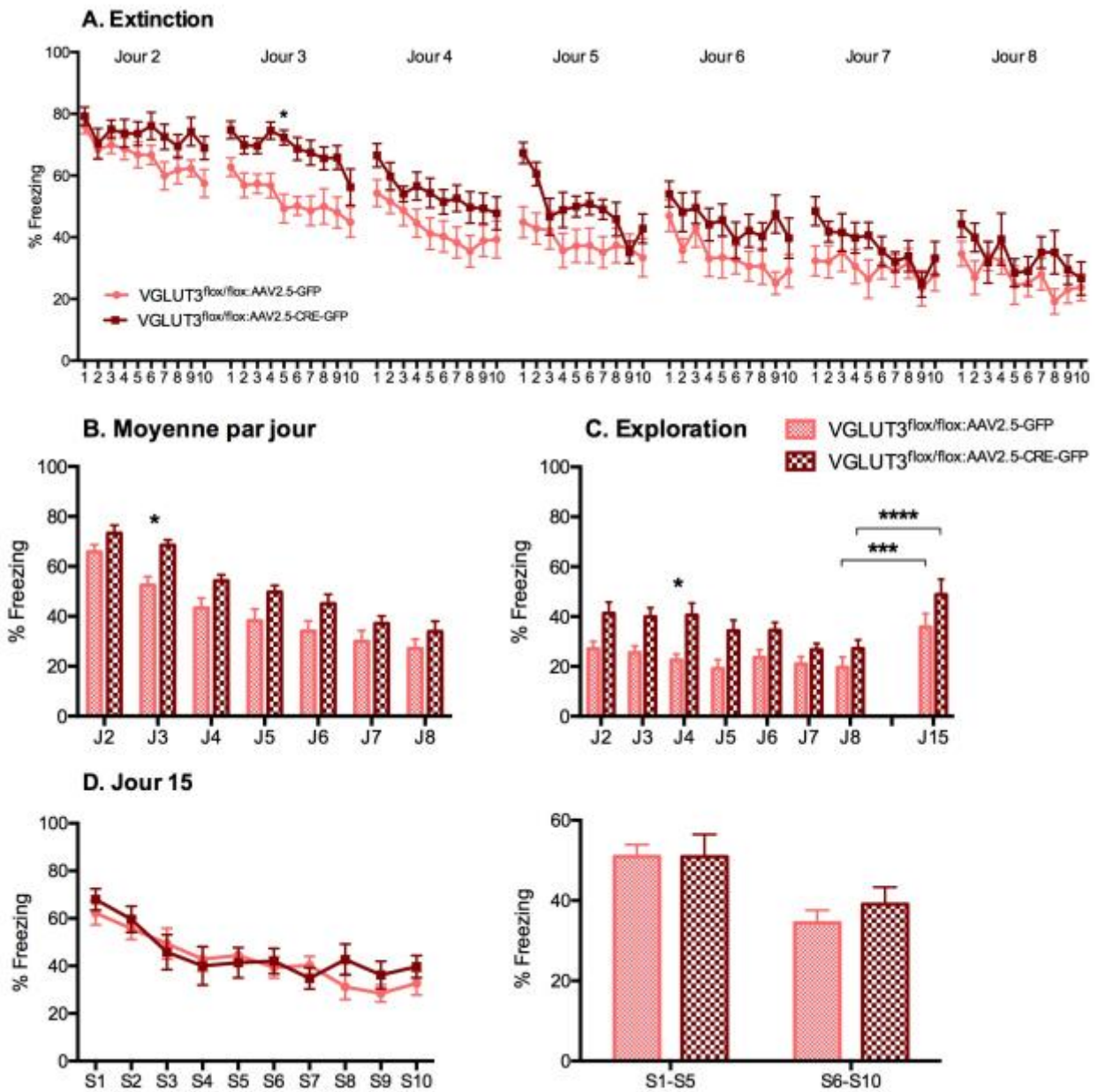


Figure 79 : Extinction de peur chez les souris injectées dans le BF.

A-B) L'apprentissage d'extinction est plus lent chez les souris VGLUT3^{flx/flx}:AAV2.5-CRE-GFP par rapport aux souris VGLUT3^{flx/flx}:AAV2.5-GFP. C) Le rappel de la mémoire de peur dans le contexte original du conditionnement est le même chez les deux groupes. D) Le niveau de *freezing* lors des deux premières minutes d'exploration du jour 2-8 et lors du jour 15 n'est pas différent entre les souris contrôles et mutantes.

IV/ Discussion

Avec cette approche virale, j'ai voulu étudier plus spécifiquement le rôle joué par les terminaisons VGLUT3 positives GABAergiques et cholinergiques lors de la mise en place de mémoires émotionnelles.

Dans un premier temps, j'ai déterminé l'effet de ces invalidations sur la locomotion et l'anxiété des animaux.

L'invalidation de VGLUT3 dans les interneurons GABA de la BLA entraîne une hyperlocomotion dans la fin de la phase nocturne. D'après notre hypothèse, ce phénotype pourrait être dû à l'altération des connexions existants entre la BLA et le striatum par l'augmentation présumé de la transmission GABAergique via la perte de VGLUT3 dans la BLA.

Chez les souris VGLUT3^{flox-ChATCRE} et chez les souris VGLUT3^{-/-}, une hyperlocomotion est observée pendant la phase nocturne consécutive à l'absence de VGLUT3 dans les interneurons cholinergiques conduisant à l'augmentation supposée de l'excitation des MSNs. Il se pourrait qu'un autre type d'hyperlocomotion en fin de phase nocturne caractérise ces souris invalidées dans la BLA. Ce phénotype pourrait être induit par l'augmentation de la stimulation des MSNs par des neurones principaux de la BLA qui pourraient être déshinibées par les interneurons GABA VGLUT3 positifs.

D'autre part, les souris VGLUT3^{flox/flox:AAV2.5-CRE-GFP} présentent une augmentation de la vitesse d'exploration en zone anxiogène dans le test de l'OF et une plus forte fréquentation des bras ouverts lors du test de l'EPM suggérant que ce compartiment initialement considéré comme anxiogène, serait anxiolytique pour ces souris. Cela laisse penser à une augmentation de la prise de risque chez ces animaux. Ces résultats observés en OF et EPM semblent - de prime abord - contradictoires. Toutefois, une étude a montré que des lésions bilatérales de l'amygdale chez les singes adultes entraînent une diminution de peur suite à la présentation de stimuli menaçants tel qu'un serpent. Ces mêmes lésions réalisées chez de jeunes singes déclenchent également une diminution de peur face à un élément menaçant, mais conduisent à une augmentation du niveau de peur lorsque ces animaux sont placés dans un nouvel environnement social (Amaral, 2003). Selon le contexte anxiogène, l'amygdale pourrait alors moduler les réponses associées au stress et permettrait d'évaluer l'environnement et ses potentiels dangers par l'intervention du système GABAergique.

Les souris invalidées pour VGLUT3 dans les neurones cholinergiques du BF ne présentent pas de phénotype locomoteur et de type anxieux particulier. Ces neurones de projection ne semblent pas intervenir dans ces types de comportements.

Par la suite, l'étude des mémoires émotionnelles a été réalisée et amène à un premier constat : l'invalidation de VGLUT3 dans les interneurons GABAergiques VGLUT3 positifs de la BLA ou celle dans les neurones cholinergiques VGLUT3 positifs de projection du BF perturbe les processus mnésiques aversifs.

En effet, chez les souris injectées dans la BLA, on observe une diminution des mémoires aversives et une absence d'extinction. En revanche, les souris injectées dans le BF se caractérisent par une augmentation des mémoires aversives de peur et d'extinction. Ainsi, ces phénotypes semblent impliquer des processus partiellement opposés dans l'établissement des mémoires de peur.

D'autre part, les phénotypes décrits avec ces invalidations ciblées sont différents de ceux obtenus chez les souris VGLUT3^{-/-} et les modèles génétiques précédemment présentés.

Les souris invalidées pour VGLUT3 dans les interneurons GABAergiques de la BLA présentent une diminution des mémoires élémentaire et contextuelle ainsi qu'une absence d'extinction. Ces phénotypes ne sont retrouvés chez aucun autre modèle murin utilisé.

Etant donné que les courbes d'apprentissage sont similaires entre les souris injectées et les souris contrôles, le faible niveau de *freezing* observé au cours des tests contextuel et élémentaire ne semble pas dû à un problème lors de l'acquisition de peur conditionnée.

Tout d'abord si l'on pousse un peu plus loin les analyses, en regardant uniquement les 3 premières minutes du test au contexte afin de pouvoir ensuite les comparer aux 3 premières minutes du test au contexte modifié, on retrouve la différence significative entre les groupes et un effet du temps (respectivement $t(48)=2,482$ et $F(1,24)=26,79$, $p<0,0001$, ANOVA à mesures répétées avec test de comparaison multiple de Sidak). Si l'on compare maintenant ces données à celles obtenues lors de l'exploration dans le test au contexte modifié, on note que les souris contrôles passent significativement plus de temps en *freezing* dans le contexte de conditionnement que dans celui modifié ($t(24)=5,614$, test de comparaison multiple de Sidak) alors que les souris injectées présentent le même taux de *freezing* dans les deux cas ($t(24)=1,857$, test de comparaison multiple de Sidak). Cette analyse nous permet de questionner la validité du conditionnement au contexte effectué par les souris CRE.

Cette diminution d'expression de peur peut alors s'expliquer par la faible activation des neurones de peur de la BLA au cours du rappel des mémoires contextuelle et élémentaire.

En effet, le rappel fait intervenir les neurones de peur et leurs connexions avec le PL du CPFm par la voie des états de haut niveau de peur (Duvarci and Pare, 2014; Senn et al., 2014; Vogel et al., 2016).

L'augmentation de l'inhibition induite par la perte de VGLUT3 dans les interneurones GABAergiques CCK-VGLUT3 positifs entraînerait une augmentation de la transmission GABAergique qui pourrait induire une forte inhibition des neurones de peur.

Etonnement, les conséquences de cette diminution d'activité des neurones de peur ne sont pas observées comportementalement chez les souris VGLUT3^{-/-}. En effet, bien que l'augmentation inhibitrice s'exerce également sur ces mêmes neurones chez les souris VGLUT3^{-/-} par les contacts synaptiques réalisés avec les interneurones GABAergiques CCK-VGLUT3 positifs, de fortes afférences excitatrices provenant du BF et de l'hippocampe pourraient contrebalancer l'inhibition GABAergique. Le renforcement de ces afférences pourrait être conséquent à la perte de VGLUT3 dans les fibres cholinergiques de projection VGLUT3 positives du BF et l'augmentation de la désinhibition des neurones principaux de l'hippocampe (cf *Discussion, Etude II, Chapitre I*, sur les souris VGLUT3^{-/-}, page 155). Cela permettrait de maintenir un niveau d'activité important des neurones de peur.

En revanche, les neurones de peur des souris injectées dans la BLA ne seraient pas soumis à cette augmentation de la transmission cholinergique ni aux renforcements des connexions hippocampiques mais uniquement à l'augmentation de l'inhibition.

Par ailleurs, une absence d'extinction est observée chez ces animaux. Une étude a mis en évidence l'apparition de ce même type de phénotype suite à l'infusion de muscimol, un agoniste GABA dans la BLA conduisant à une augmentation de la transmission GABAergique (Sierra-Mercado et al., 2011). D'après notre hypothèse, chez les souris invalidées dans la BLA, la perte de VGLUT3 entraînerait également une augmentation de la transmission inhibitrice. Cette variation d'inhibition pourrait alors être à l'origine de l'apparition de ce phénotype. Cela pourrait suggérer que les neurones d'extinction ne sont pas activés. En effet, il est possible que le faible niveau d'activation des neurones de peur ne permette pas le switch entre le circuit impliqué dans les états de haut niveau de peur vers celui de l'extinction. L'existence d'un seuil d'activation des neurones de peur pourrait permettre la balance et le basculement vers la voie facilitant l'extinction à travers la modulation des circuits locaux d'inhibition.

Si l'on reconsidère l'absence de phénotype comportemental observé chez les souris VGLUT3^{fllox-VIAATCRE}, et compte tenu de l'importance de l'implication des interneurones

GABAergiques VGLUT3 positifs de la BLA mis en lumière par la stratégie virale d'invalidation de VGLUT3 dans cette population neuronale, l'explication de la mise en place de compensations développementales serait favorisée.

Par ailleurs, lorsque l'on **inactive VGLUT3 dans le neurones cholinergiques VGLUT3 positif du BF**, on obtient presque exactement l'effet miroir de l'invalidation de VGLUT3 dans l'amygdale basolatérale.

En effet, les souris injectées dans le BF afin d'invalider VGLUT3 dans les projections cholinergiques se caractérisent par une augmentation de leurs mémoires aversives contextuelle et élémentaire, ainsi qu'une résistance initiale à l'extinction. Les seuls neurones cholinergiques exprimant VGLUT3 dans le BF connus à ce jour projettent dans la BLA (Nickerson Poulin et al., 2006). Ainsi, l'inactivation de VGLUT3 semble spécifique des terminaisons cholinergiques VGLUT3 positives du BF dans la BLA. Cela suggère que les phénotypes comportementaux observés sont conséquents à cette invalidation spécifique.

Des études récentes ont montré que l'activation optogénétique des fibres cholinergiques du BF projetant dans la BLA au cours du conditionnement entraîne une résistance à l'extinction (Jiang, 2016). Cette activation suggère une augmentation de libération d'ACh dans la BLA. D'après le rôle établi de VGLUT3, en réponse à un stimulus, la libération d'ACh des neurones VGLUT3 positifs sera ponctuellement plus importante puis très rapidement inhibée par la présence du feedback négatif médié par le glutamate (Fasano et al., 2017; Gras et al., 2008). L'absence de VGLUT3 aurait alors comme conséquence une augmentation de la durée de la transmission cholinergique via la perte de ce feedback négatif, faisant apparaître VGLUT3 comme un modulateur de la transmission cholinergique afin d'empêcher des excitations trop longues qui pourraient devenir excitotoxiques.

Les souris $VGLUT3^{flox/flox;AAV2.5-CRE-GFP}$ ne possèdent plus ce verrou de sécurité ce qui entraîne une transmission excessive d'ACh dans la BLA nous permettant de nous retrouver dans une situation similaire –mais toutefois bien moindre- à l'activation optogénétique des fibres cholinergiques du BF.

De plus, l'activation optogénétique de ces mêmes projections induit une augmentation de la transmission glutamatergique et de la LTP au sein de la BLA. D'autre part, l'inhibition optogénétique de ces projections entraîne une diminution des mémoires élémentaire et contextuel (Jiang, 2016). Chez les souris $VGLUT3^{flox/flox;AAV2.5-CRE-GFP}$, la stimulation persistante induite par l'ACh pourrait entraîner une augmentation de la transmission

glutamatergique et de la LTP favorisant la consolidation des mémoires aversives et expliquant l'augmentation des mémoires contextuelle et élémentaires.

D'autre part, l'apprentissage de peur conditionnée n'est pas perturbé par l'activation optogénétique des fibres cholinergiques du BF (Jiang et al., 2016) tout comme par l'inactivation de VGLUT3 dans les fibres cholinergiques du BF comme nous pouvons le constater sur la **Figure 78 A**. L'augmentation des mémoires aversives suite au rappel serait conséquente à une meilleure consolidation de la mémoire. Il est alors possible qu'une autre population neuronale que les neurones de la LA (impliqués dans l'acquisition de peur conditionnée) soient ciblés. En effet, étant donné la forte expression de peur observée, il semble que les neurones de peur de la BLA soient recrutés et établissent préférentiellement des connections avec les neurones cholinergiques de projection du BF.

Par ailleurs, les projections cholinergiques mises en jeu proviennent du noyau basal de Meynert (NBM) dans le BF. Les projections de ce noyau n'innervent pas que la BLA, mais également le PL, structure du CPFm impliqué également dans le circuit d'expression de peur (Knox, 2016). On peut supposer alors qu'il existerait une connexion triangulaire NBM-BLA-PL régulant les hauts niveaux de peur.

Un autre argument appuyant cette hypothèse est l'absence d'effet sur la mémoire d'extinction lors de l'inhibition optogénétique des fibres cholinergiques du BF projetant dans la BLA (Jiang et al., 2016). En revanche, le blocage des mAChR et des nAChR dans la BLA entraîne une diminution du niveau de *freezing* pour les mémoires élémentaire et d'extinction (Jiang et al., 2016). Cela suggère qu'il existe une autre population cholinergique de projection impliqué plus particulièrement dans le processus d'extinction qui cible les neurones d'extinction de la BLA. Ainsi, les projections cholinergiques VGLUT3 positives provenant du BF favoriserait la voie d'expression de peur à travers l'activation des neurones de peur de la BLA entraînant une augmentation des mémoires aversives et une résistance à l'extinction, alors qu'une autre population seraient préférentiellement en contact avec les neurones d'extinction de la BLA facilitant l'extinction. Ces interprétations sont en accord avec l'hypothèse émise pour les souris VGLUT3^{-/-} concernant le rôle des projections cholinergiques VGLUT3 positives du BF dans la BLA.

VGLUT3 au sein des projections cholinergiques du BF aurait un rôle modulateur dans la transmission ACh afin d'éviter une sur-stimulation des neurones de la BLA impliqués dans le circuit d'expression de peur faisant intervenir le NBM, la BLA et le PL.

Points Importants :

Etude II : Caractérisation Comportementale de VGLUT3 dans l'amygdale basolatérale

Résultats :

- **L'inactivation constitutive** de VGLUT3 dans le SNC : les souris VGLUT3^{-/-}
 - ⇒ Généralisation contextuelle
 - ⇒ Mémoire contextuelle plus stable
 - ⇒ Facilitation de l'extinction.

- **L'inactivation constitutive** de VGLUT3 dans les neurones sérotoninergiques, GABAergiques ou cholinergiques : les souris VGLUT3^{flox-SERTCRE, flox-VIAATCRE, ou flox-ChATCRE}
 - ⇒ Mémoires contextuelle et élémentaire non perturbées
 - ⇒ Extinction globalement non perturbée, avec cependant un ralentissement de la cinétique d'extinction chez les souris VGLUT3^{flox-ChATCRE}.

- **L'inactivation locale** de VGLUT3 dans les interneurons GABAergiques de la BLA : les souris VGLUT3^{flox/flox:AAV2.9}
 - ⇒ Mémoires contextuelle et élémentaire défailantes/altérées
 - ⇒ Absence d'extinction.

- **L'inactivation locale** de VGLUT3 dans les neurones de projection cholinergiques VGLUT3 positifs du BF : les souris VGLUT3^{lox/flox:AAV2.5}
 - ⇒ Mémoires contextuelle et élémentaire augmentées
 - ⇒ Résistance initiale à l'extinction.

Discussion :

- VGLUT3 permettrait de réguler les voies des états de haut niveau de peur et d'extinction à travers sa présence dans les circuits locaux d'inhibition et les différentes afférences de la BLA.

DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALES

Les travaux menés au cours de ma thèse m'ont permis d'obtenir un certain nombre de résultats permettant d'approfondir le rôle de VGLUT3 et d'explorer son implication dans les processus aversifs et en particulier dans les mémoires de peur conditionnée à travers la caractérisation anatomique des neurones et des terminaisons exprimant VGLUT3, et l'étude comportementale des différents phénotypes consécutif à la perte de VGLUT3 dans des régions définies.

La première partie de mon étude portant sur la détermination de la **nature des neurones et terminaisons VGLUT3 positives** a permis de mieux définir anatomiquement la place de VGLUT3.

Il apparaît que VGLUT3 est exprimé uniquement dans une sous-population d'interneurones GABAergiques de la BLA. Cette population représente moins de 10% de la population GABAergique totale dans la BLA. Ces interneurones sont des interneurones « en panier » GABA-VGLUT3 et CCK positifs. Une autre étude confirme ces résultats et montrent que ces neurones expriment également les récepteurs CB1 (Omiya et al., 2015).

Le rôle principal de VGLUT3 identifié est celui l'impliquant dans la synergie vésiculaire. En effet, il a été montré que le glutamate libéré par la présence de VGLUT3 sur les VS permet de potentialiser l'accumulation du NT principal du neurone (Amilhon et al., 2010; Gras et al., 2002).

Toutefois, cette action ne semble pas la seule attribuée à VGLUT3. En effet, des récepteurs métabotropiques de type III au glutamate sont exprimés à la surface de la membrane présynaptique. La fixation du glutamate à ces récepteurs entraîne l'inhibition du relargage des NT conférant à VGLUT3 une action modulatrice sur la transmission chimique par l'existence de ce rétrocontrôle inhibiteur (Fasano et al., 2017).

D'autre part, un autre système de régulation a été mis en évidence par la présence de CCK et des récepteurs CB1 dans les interneurones GABAergiques VGLUT3 positifs. En effet, la libération de CCK et du glutamate, via leur fixation sur leurs récepteurs respectifs présents sur l'élément postsynaptique, CCK2R et mGluR5 va entraîner l'augmentation de la synthèse de 2-AG, l'endocannabinoïde majeur synthétisé par l'enzyme DGL α . Le 2-AG va alors se fixer au récepteur CB1 présynaptique conduisant à l'inhibition de la libération des NT (Omiya et al., 2015).

Ainsi, suite à l'arrivée d'un stimulus, VGLUT3 va permettre l'augmentation de la libération de NT dans la fente synaptique de façon transitoire avant l'action des deux rétrocontrôles inhibiteurs (**Figure 80**).

Si l'on considère alors le cas d'une synapse GABAergique ayant perdu VGLUT3, on s'attend à la perte de la potentialisation de l'accumulation des NT entraînant une diminution de la quantité de NT libéré par vésicule fusionnée à la membrane. Néanmoins, étant donné que les rétrocontrôles négatifs n'entrent plus en jeu, la libération finale de GABA serait plus importante sur une fenêtre temporelle plus longue (Fasano et al., 2017). Dans le contexte du réseau amygdalien, VGLUT3 serait un acteur important des circuits locaux d'inhibition permettant de réguler et moduler la transmission GABAergique.

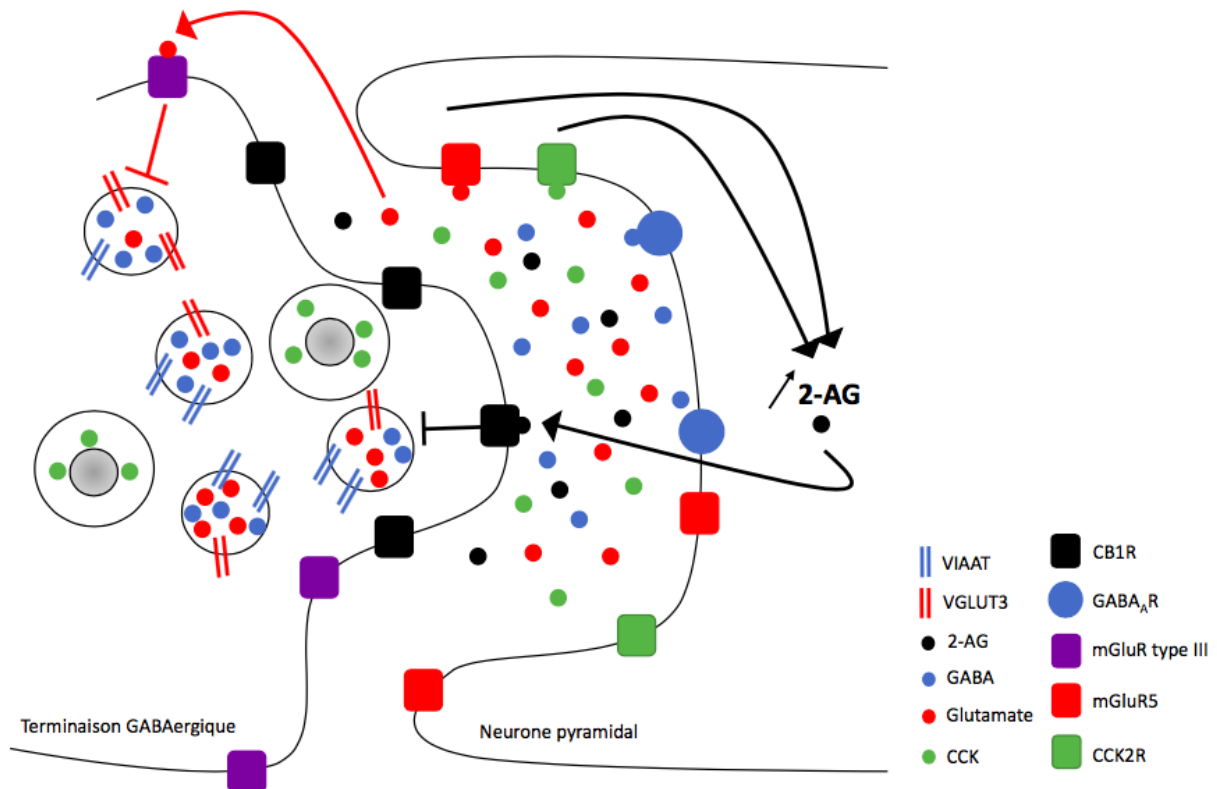


Figure 80 : Schéma de la synapse GABAergique VGLUT3 positive dans la BLA.

La flèche rouge correspond au rétrocontrôle exercé par le glutamate sur la libération des NT de l'élément présynaptique. Les flèches noires représentent la voie impliquée dans le rétrocontrôle mené par les endocannabinoïdes.

D'autre part, les terminaisons VGLUT3 positives présentes dans la BLA semblent être de natures différentes : GABAergiques, sérotoninergiques et cholinergiques. Il apparaît que la majorité des terminaisons VGLUT3 positives sont cholinergiques et proviendraient du BF (Nickerson Poulin et al., 2006). Les projections sérotoninergiques de la BLA seraient majoritairement du raphé dorsal et de façon plus éparse du noyau médian (Abrams et al., 2004; Jacobs et al., 1978; Vertes, 2004). Quant aux terminaisons GABAergiques, les seuls neurones GABAergiques identifiés aujourd'hui comme projetant dans la BLA sont les interneurons

localisés dans la capsule externe, les ICM_L (Marowsky et al., 2005). Ces interneurons étant exclusivement GABAergiques, cela suggère que les terminaisons GABAergiques VGLUT3 positives correspondent à l'arborisation axonale des 10% d'interneurons « en panier » GABA-VGLUT3-CCK-CB1 positifs.

Il existe ainsi une source endogène (interneurons GABAergiques) et deux sources exogènes (neurones de projection 5HT et ACh) de VGLUT3 dans la BLA.

D'un point de vue fonctionnel, tout comme les interneurons GABA-VGLUT3-CCK-CB1 positifs, l'absence de VGLUT3 pourrait amener à une augmentation de la libération d'ACh et de 5-HT par la perte du rétrocontrôle négatif réalisé par les récepteurs présynaptiques du glutamate dans les terminaisons ACh et 5-HT.

Là aussi, VGLUT3 pourrait être un modulateur de l'excitation des neurones principaux de la BLA à travers la régulation de la libération des NT provenant des afférences de l'amygdale basolatérale.

Cette hypothèse pourrait être vérifiée en effectuant des expériences d'électrophysiologie. On pourrait, par exemple, par la technique de *patch-clamp*, mesurer l'amplitude et la fréquence des mIPSCs dans la BLA suite au blocage des PA par le TTX, ou bien par le blocage des récepteurs ionotropiques AMPA/Kaïnate par le DNQX, et celui des récepteurs métabotropiques NMDA avec l'AP-5. A cela, l'analyse des mIPSCs évoqués peut être ajoutée.

La deuxième partie de mon travail a consisté à définir le **rôle de VGLUT3 dans les processus mnésiques associés à la peur conditionnée**. Pour ce faire, mon premier modèle d'étude porte sur l'inactivation constitutive de VGLUT3 dans tous les neurones VGLUT3 positifs à travers les souris VGLUT3^{-/-}. Trois phénotypes comportementaux majeurs sont observés : 1/ une généralisation contextuelle, 2/ une mémoire contextuelle plus stable, et 3/ une facilitation de l'extinction.

La généralisation au contexte qui correspond à une défaillance de discrimination entre un environnement neutre et un environnement associé à une valence aversive, fait principalement intervenir deux structures : le noyau basomédial de la BLA (BMA), et l'hippocampe dorsal (Ehrlich et al., 2009; Lee et al., 2013).

En effet, le noyau basomédial joue un rôle essentiel dans la différenciation des environnements. Il reçoit des afférences provenant du CPF médio-ventrale (comprenant la région IL) qui favorise l'extinction. De plus, son activation entraîne une diminution des niveaux de *freezing* et d'anxiété (Adhikari et al., 2015). On peut alors supposer que l'augmentation de

l'inhibition des neurones principaux du BMA est impliquée dans l'altération des circuits menant à la généralisation contextuelle.

Par ailleurs, l'hippocampe dorsal est un acteur majeur dans la séparation de pattern et la discrimination de différents contextes spatiaux à travers la formation d'ensembles de neurones distincts répondant et représentant des contextes spécifiques (Frankland et al., 1998; Guzowski et al., 2004). Il a été montré que des lésions des fibres cholinergiques du BF projetant dans l'hippocampe dorsal entraîne une généralisation contextuelle (Knox and Keller, 2016). Cela suggère que l'activité des neurones principaux est diminuée par l'inhibition de la transmission cholinergique dans l'hippocampe dorsal.

Il semble ainsi que l'altération de l'activité des neurones principaux de la BMA et de l'hippocampe dorsal par la diminution de leur excitation est impliquée dans le processus de généralisation de la mémoire contextuelle (**Figure 81**). Cette altération pourrait être causée par des contacts synaptiques formés par les interneurons GABAergiques VGLUT3 positifs présents dans la BMA et l'hippocampe sur les neurones principaux (Fasano et al., 2017). Ainsi, l'augmentation massive de GABA dans la BMA et l'hippocampe consécutive à la perte de VGLUT3 entraînerait l'inactivation des neurones pyramidaux. Ces défaillances d'activité pourraient perturber les potentielles connexions entre l'hippocampe dorsal et l'amygdale établies au cours du conditionnement de peur.

Cependant, cette interprétation concernant la présence d'une généralisation contextuelle peut être discutée. En effet, lors des trois premières minutes d'exploration au cours du test au contexte modifié, on remarque que le niveau de *freezing* est important chez les souris VGLUT3^{-/-} par rapport à celui de leurs contrôles. Ce *freezing* pourrait refléter :

- 1) le taux de *freezing* de base tel observé dans le contexte de conditionnement lors des premiers jours d'habituation, ce comportement pourrait alors s'apparenter à une forme de néophobie,
- 2) ou bien une généralisation au contexte.

Avec les données actuelles, il est difficile de conclure. Pour avoir une idée plus claire du phénomène existant, il faudrait habituer également les animaux au contexte modifié. Cela permettra de voir si les souris VGLUT3^{-/-} atteignent le même niveau de *freezing* au cours des deux premières minutes d'exploration lors du test au contexte modifié que leurs contrôles, ou bien si elles généralisent. Un autre point important réside dans l'utilisation du stimulus lumineux comme SC qui conduit à un conditionnement faible. Les variations de *freezing* sont moins importantes, ce qui complexifie les interprétations.

Ainsi, notre hypothèse portant sur la généralisation au contexte peut être développée et approfondie par l'utilisation d'autres paradigmes comportementaux, dont notamment celui

utilisé par Kaouane et ses collaborateurs portant sur la composante amnésique du TSPT (cf *Introduction V.2*), page 104; Kaouane et al., 2012). En effet, la généralisation contextuelle étant un phénotype observé dans ce type de trouble anxieux, cela nous permettrait de mieux définir les comportements mesurés.

Par ailleurs, les souris VGLUT3^{-/-} montrent une mémoire contextuelle plus stable. Ce processus mnésique fait également intervenir l'amygdale et l'hippocampe dorsale (Davis et al., 2007; Kenney et al., 2012; Rogers and Kesner, 2004). Cette augmentation mnésique pourrait être due à une augmentation de l'activation des neurones de peur de la BLA qui projettent dans la région PL du CPFm impliquée dans les états de haut niveau de peur (Ehrlich et al., 2009; Herry et al., 2008; Lee et al., 2013; Senn et al., 2014; Vogel et al., 2016). L'activité plus importante des neurones de peur pourrait être induite par le renforcement d'afférences provenant de structures extérieures, et notamment du BF et de l'hippocampe dorsale. En effet, l'inactivation de VGLUT3 par l'approche virale dans les neurones de projection cholinergiques du BF entraîne une résistance à l'extinction et une augmentation des mémoires contextuelle et élémentaire. L'activation optogénétique des fibres cholinergiques du BF projetant dans la BLA conduit également à une résistance à l'extinction et à une augmentation de la transmission glutamatergique dans la BLA (Jiang et al., 2016). Ainsi, la perte de VGLUT3 dans les projections cholinergiques du BF des souris VGLUT3^{-/-} pourrait augmenter l'excitation des neurones de peur facilitant les réponses de peur. Cette hypothèse pourrait être vérifiée par l'utilisation de la technique *in vivo* d'optogénétique. Dans le contexte de peur conditionnée, la stimulation ou l'inhibition des terminaisons cholinergiques VGLUT3 positives projetant dans la BLA avec ou sans la présence de VGLUT3 permettraient d'une part, de voir les comportements de peur résultants, et d'autre part d'enregistrer l'activité des neurones principaux de la BLA.

Par ailleurs, les projections cholinergiques du BF mises en jeu proviennent du noyau basal de Meynert (NBM) qui n'innervent pas que la BLA. En effet, les fibres cholinergiques du NBM projettent également vers le PL (Knox, 2016). Il pourrait alors exister alors une connexion triangulaire NBM-BLA-PL régulant les hauts niveaux de peur (**Figure 81**).

En ce qui concerne l'hippocampe dorsal, les neurones principaux de l'hippocampe dorsal pourraient être plus fortement activées en raison de la plus forte désinhibition générée

par l'absence de VGLUT3 dans les interneurons GABAergiques CCK-VGLUT3 positifs présents dans l'hippocampe (El Mestikawy et al., 2011).

Ainsi, l'apparition d'une mémoire contextuelle plus importante et stable serait due à l'augmentation de l'activation des neurones de peur impliqués dans la voie des états de haut niveau de peur consécutive à l'augmentation de la transmission GABAergique générée par l'absence de VGLUT3.

Les souris VGLUT3^{-/-} semblent présenter une meilleure mémoire d'extinction. Des études ont mis en évidence que l'apprentissage d'extinction s'accompagne d'une augmentation de l'inhibition locale dans la BLA (Ehrlich et al., 2009). Chez nos souris VGLUT3^{-/-}, l'augmentation excessive de l'inhibition GABAergique par la perte de VGLUT3 dans les interneurons GABAergiques CCK-VGLUT3 positifs stimulerait fortement la voie impliquée dans l'extinction à travers les connexions entre les neurones d'extinction et les neurones principaux de l'IL entraînant la facilitation de l'extinction. Elle pourrait alors entraîner l'augmentation de l'activation des neurones d'extinction, et participer au switch entre l'activité des neurones de peur vers celle des neurones d'extinction (Herry et al., 2008).

Cette activation de neurones d'extinction pourrait passer par leur désinhibition. En effet, des systèmes de désinhibition des neurones principaux de la BLA ont déjà été identifiés faisant intervenir les interneurons PV et SOM (Wolff et al., 2014). Ainsi, une forte désinhibition des neurones d'extinction pourrait s'opérer à travers l'inhibition des interneurons projetant sur ces neurones d'extinction par les interneurons GABA-CCK-VGLUT3. Les neurones d'extinction peuvent alors activer la région IL du CPFm.

De plus, une étude a mis en évidence que la stimulation des afférences du CPFm projetant vers la BLA, induit une inhibition des cellules principales probablement par l'activation d'interneurons GABAergiques (Rosenkranz and Grace, 2002b). On peut alors supposer que les neurones principaux de l'IL activent en retour les interneurons GABA-CCK-VGLUT3 de la BLA qui vont fortement inhiber les neurones de peur par l'augmentation de la transmission GABAergique due à l'absence de VGLUT3 et ainsi favoriser la voie de l'extinction (**Figure 81**).

Par ailleurs les résultats obtenus par l'invalidation de VGLUT3 dans les interneurons GABAergiques VGLUT3 positifs dans la BLA vont dans le même sens. En effet, on observe une diminution des mémoires contextuelle et élémentaire. Cette diminution pourrait expliquer l'augmentation de l'inhibition GABAergique induite par la perte de VGLUT3 conduisant à une forte inhibition des neurones de peur.

Toutefois, cette diminution d'activité des neurones de peur n'est pas retrouvée chez les souris VGLUT3^{-/-} qui compenserait l'augmentation de l'inhibition GABAergique par l'augmentation de l'excitation neuronale dans la BLA via les afférences extérieures du BF et de l'hippocampe.

D'autre part, un autre circuit impliqué dans le processus d'extinction a été mis en évidence à travers les souris invalidées pour VGLUT3 dans le système cholinergique. La stimulation optogénétique des terminaisons glutamatergiques présynaptiques de la BLA projetant dans le NAc entraîne une augmentation de l'activité de l'IL. En revanche, cette même stimulation couplée à une infusion de muscimol dans le NAc conduit à une diminution de l'activité de l'IL suggérant que les connexions avec l'IL s'établissent par l'intermédiaire des projections striatales (Correia et al., 2016). Il se pourrait alors que le circuit BLA-NAc favorise le phénomène d'extinction par la déshinhibition des neurones principaux de l'IL via les projections GABAergiques des MSNs sur les interneurons de l'IL. On pourrait également supposer que les projections glutamatergiques de la BLA vers le NAc proviendraient des neurones d'extinction facilitant la voie impliquant l'IL (**Figure 81**).

L'absence de VGLUT3 chez les souris VGLUT3^{flox-ChATCRE} entraînerait à l'inverse du muscimol une augmentation de la stimulation des MSNs projetant dans l'IL favorisant l'apprentissage d'extinction. Cette voie serait un argument supplémentaire pour justifier la facilitation de l'extinction observée chez nos souris VGLUT3^{-/-}.

Ainsi, à travers ce réseau, la réalisation du switch entre l'activité des neurones de peur et d'extinction pourrait être observée conduisant à l'observation des phénotypes comportementaux chez nos différentes lignées et particulièrement chez les souris VGLUT3^{-/-}.

En somme, VGLUT3 semble jouer un rôle clé dans la régulation des processus mnésiques associés aux mémoires de peur au sein du réseau amygdalien.

En effet, au sein de la terminaison synaptique, VGLUT3 régulerait la quantité de NT accumulés dans les VS par la synergie vésiculaire, mais il permettrait également de moduler le nombre de vésicules destinées à fusionner avec la membrane plasmique à travers les rétrocontrôles négatifs direct permis par la fixation du glutamate libéré sur leurs récepteurs métabotropiques présynaptiques, mais aussi indirect par la mise en jeu des récepteurs CB1. Il participerait ainsi à la régulation de l'excitation des neurones principaux de la BLA en évitant l'apparition d'excitations excitotoxiques.

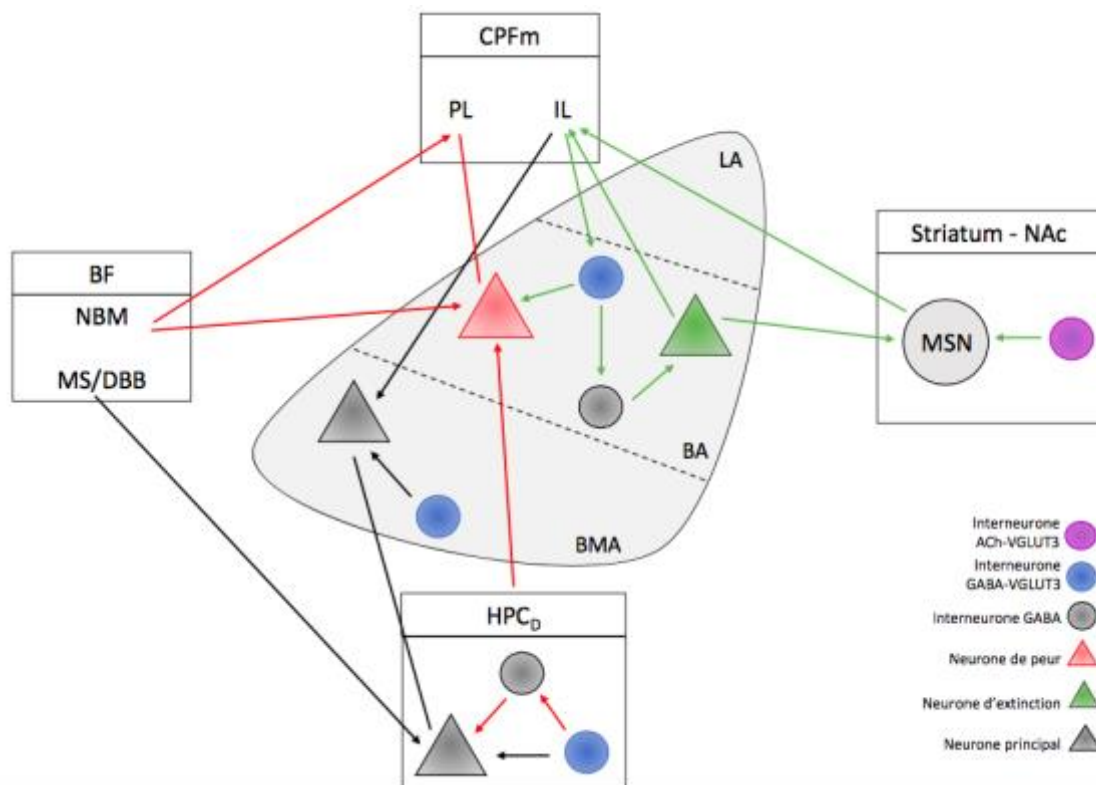


Figure 81 : Modèle des mécanismes de la voie de la peur et de la voie d’extinction.

Les flèches et segments rouges illustrent la voie des états de haut niveau de peur. Les connexions en vert représentent la voie facilitant l’extinction, tandis que celles en noir correspondent aux liens établis entre les structures impliquées dans la généralisation contextuelle. Le sens des flèches représente la direction des projections. Les segments sans tête de flèche symbolisent des connexions réciproques entre les régions cérébrales.

D’autre part, son action est largement étendue à travers son expression dans les différents sous-systèmes, et notamment dans les interneurons GABAergiques de la BLA. En effet, sa présence au sein de ces interneurons lui confère un rôle important dans les circuits locaux d’inhibition contrôlant et régulant l’activité des neurones de peur et d’extinction impliqués dans les mémoires aversives de la peur conditionnée.

Des altérations de VGLUT3 semblent pouvoir mener à des symptômes caractéristiques du trouble de stress post-traumatique. Des études plus approfondies sur ces phénotypes permettrait de mieux comprendre le rôle de VGLUT3 dans le TSPT et ainsi de développer une nouvelle voie d’approche dans le traitement thérapeutique de cette pathologie.

RÉFÉRENCES

A

- Abrams, J.K., Johnson, P.L., Hollis, J.H., and Lowry, C.A. (2004). Anatomic and functional topography of the dorsal raphe nucleus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1018, 46–57.
- Adhikari, A., Lerner, T.N., Finkelstein, J., Pak, S., Jennings, J.H., Davidson, T.J., Ferenczi, E., Gunaydin, L.A., Mirzabekov, J.J., Ye, L., et al. (2015). Basomedial amygdala mediates top-down control of anxiety and fear. *Nature* 527, 179–185.
- Adolphs, R. (2013). The Biology of Fear. *Curr. Biol.* CB 23, R79–R93.
- Adolphs, R., Tranel, D., Damasio, H., and Damasio, A.R. (1995). Fear and the human amygdala. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 15, 5879–5891.
- Adolphs, R., Tranel, D., Hamann, S., Young, A.W., Calder, A.J., Phelps, E.A., Anderson, A., Lee, G.P., and Damasio, A.R. (1999). Recognition of facial emotion in nine individuals with bilateral amygdala damage. *Neuropsychologia* 37, 1111–1117.
- AGGLETON, John P. (1992). The functional effects of amygdala lesions in humans: A comparison with findings from monkeys. Wiley-Liss.
- Aihara, Y., Mashima, H., Onda, H., Hisano, S., Kasuya, H., Hori, T., Yamada, S., Tomura, H., Yamada, Y., Inoue, I., et al. (2000). Molecular cloning of a novel brain-type Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter. *J. Neurochem.* 74, 2622–2625.
- Albayram, Ö., Passlick, S., Bilkei-Gorzo, A., Zimmer, A., and Steinhäuser, C. (2016). Physiological impact of CB1 receptor expression by hippocampal GABAergic interneurons. *Pflugers Arch.* 468, 727–737.
- Alheid, G.F. (2003). Extended Amygdala and Basal Forebrain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 985, 185–205.
- Alheid, G.F., and Heimer, L. (1988). New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: the striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata. *Neuroscience* 27, 1–39.
- Almqvist, J., Huang, Y., Laaksonen, A., Wang, D.-N., and Hovmöller, S. (2007). Docking and homology modeling explain inhibition of the human vesicular glutamate transporters. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 16, 1819–1829.
- Anagnostaras, S. G., Gale, G. D., & Fanselow, M. S. (2001). Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances. *Hippocampus*, 11(1), 8-17.
- Amano, T., Unal, C.T., and Paré, D. (2010). Synaptic correlates of fear extinction in the amygdala. *Nat. Neurosci.* 13, 489–494.
- Amano, T., Duvarci, S., Popa, D., and Pare, D. (2011). THE FEAR CIRCUIT REVISITED: CONTRIBUTIONS OF THE BASAL AMYGDALA NUCLEI TO CONDITIONED FEAR. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 15481–15489.

Amaral, D.G. (2003). The Amygdala, Social Behavior, and Danger Detection. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1000, 337–347.

Amat, J., Matus-Amat, P., Watkins, L.R., and Maier, S.F. (1998). Escapable and inescapable stress differentially alter extracellular levels of 5-HT in the basolateral amygdala of the rat. *Brain Res.* 812, 113–120.

Amilhon, B., Lepicard, E., Renoir, T., Mongeau, R., Popa, D., Poirel, O., Miot, S., Gras, C., Gardier, A.M., Gallego, J., et al. (2010). VGLUT3 (vesicular glutamate transporter type 3) contribution to the regulation of serotonergic transmission and anxiety. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 2198–2210.

Amorapanth, P., LeDoux, J.E., and Nader, K. (2000). Different lateral amygdala outputs mediate reactions and actions elicited by a fear-arousing stimulus. *Nat. Neurosci.* 3, 74–79.

Anagnostaras, S.G., Gale, G.D., and Fanselow, M.S. (2001). Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances. *Hippocampus* 11, 8–17.

Andero, R., and Ressler, K.J. (2012). Fear extinction and BDNF: translating animal models of PTSD to the clinic. *Genes Brain Behav.* 11, 503–512.

Anderson, C.M., and Swanson, R.A. (2000). Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32, 1–14.

Anderson, S.A., Qiu, M., Bulfone, A., Eisenstat, D.D., Meneses, J., Pedersen, R., and Rubenstein, J.L. (1997). Mutations of the homeobox genes *Dlx-1* and *Dlx-2* disrupt the striatal subventricular zone and differentiation of late born striatal neurons. *Neuron* 19, 27–37.

Anggono, V., and Huganir, R.L. (2012). Regulation of AMPA Receptor Trafficking and Synaptic Plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 22, 461–469.

Anglada-Figueroa, D., and Quirk, G.J. (2005). Lesions of the basal amygdala block expression of conditioned fear but not extinction. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 9680–9685.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, et al. (2013). Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5®). American Psychiatric Pub.

Armony, J.L., Quirk, G.J., and LeDoux, J.E. (1998). Differential effects of amygdala lesions on early and late plastic components of auditory cortex spike trains during fear conditioning. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 18, 2592–2601.

Armstrong, N., Jasti, J., Beich-Frandsen, M., and Gouaux, E. (2006). Measurement of conformational changes accompanying desensitization in an ionotropic glutamate receptor. *Cell* 127, 85–97.

Aso, E., Ozaita, A., Valdizán, E.M., Ledent, C., Pazos, A., Maldonado, R., and Valverde, O. (2008). BDNF impairment in the hippocampus is related to enhanced despair behavior in CB1 knockout mice. *J. Neurochem.* 105, 565–572.

Atoji, Y., and Karim, M.R. (2014). Expression of vesicular glutamate transporter 3 mRNA in

the brain and retina of the pigeon. *J. Chem. Neuroanat.* 61–62, 124–131.

Azad, S.C., Eder, M., Marsicano, G., Lutz, B., Zieglgänsberger, W., and Rammes, G. (2003). Activation of the cannabinoid receptor type 1 decreases glutamatergic and GABAergic synaptic transmission in the lateral amygdala of the mouse. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 10, 116–128.

B

Bai, L., Zhang, X., and Ghishan, F.K. (2003). Characterization of vesicular glutamate transporter in pancreatic α - and β -cells and its regulation by glucose. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 284, G808–G814.

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

Barkus, C., Line, S.J., Huber, A., Capitao, L., Lima, J., Jennings, K., Lowry, J., Sharp, T., Bannerman, D.M., and McHugh, S.B. (2014). Variation in Serotonin Transporter Expression Modulates Fear-Evoked Hemodynamic Responses and Theta-Frequency Neuronal Oscillations in the Amygdala. *Biol. Psychiatry* 75, 901–908.

Bath, K.G., Jing, D.Q., Dincheva, I., Neeb, C.C., Pattwell, S.S., Chao, M.V., Lee, F.S., and Ninan, I. (2012). BDNF Val66Met impairs fluoxetine-induced enhancement of adult hippocampus plasticity. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 37, 1297–1304.

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

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

Bellocchio, E.E., Reimer, R.J., Fremerey, R.T., and Edwards, R.H. (2000). Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science* 289, 957–960.

Belzung, C., and Philippot, P. (2007). Anxiety from a Phylogenetic Perspective: Is there a Qualitative Difference between Human and Animal Anxiety?

Ben-Ari, Y. (2002). Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 728–739.

Van den Berg, C.J., and Garfinkel, D. (1971). A simulation study of brain compartments. Metabolism of glutamate and related substances in mouse brain. *Biochem. J.* 123, 211–218.

Bergado-Acosta, J.R., Sangha, S., Narayanan, R.T., Obata, K., Pape, H.-C., and Stork, O. (2008). Critical role of the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase in consolidation and generalization of Pavlovian fear memory. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 15, 163–171.

- Bergstrom, H.C., and Johnson, L.R. (2014). An organization of visual and auditory fear conditioning in the lateral amygdala. *Neurobiol. Learn. Mem.* *116*, 1–13.
- Bernard, J.F., and Besson, J.M. (1990). The spino(trigemino)pontoamygdaloid pathway: electrophysiological evidence for an involvement in pain processes. *J. Neurophysiol.* *63*, 473–490.
- Bernard, J.-F., Alden, M., and Besson, J.-M. (1993). The organization of the efferent projections from the pontine parabrachial area to the amygdaloid complex: A phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L) study in the rat. *J. Comp. Neurol.* *329*, 201–229.
- Bezzi, P., Gundersen, V., Galbete, J.L., Seifert, G., Steinhäuser, C., Pilati, E., and Volterra, A. (2004). Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat. Neurosci.* *7*, 613–620.
- Bienvenu, T.C.M., Busti, D., Magill, P.J., Ferraguti, F., and Capogna, M. (2012). Cell-type-specific recruitment of amygdala interneurons to hippocampal theta rhythm and noxious stimuli in vivo. *Neuron* *74*, 1059–1074.
- Bigos, K.L., Pollock, B.G., Aizenstein, H.J., Fisher, P.M., Bies, R.R., and Hariri, A.R. (2008). Acute 5-HT reuptake blockade potentiates human amygdala reactivity. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *33*, 3221–3225.
- Billups, B. (2005). Colocalization of vesicular glutamate transporters in the rat superior olivary complex. *Neurosci. Lett.* *382*, 66–70.
- Binder, E.B., Bradley, R.G., Liu, W., Epstein, M.P., Deveau, T.C., Mercer, K.B., Tang, Y., Gillespie, C.F., Heim, C.M., Nemeroff, C.B., et al. (2008). Association of FKBP5 Polymorphisms and Childhood Abuse With Risk of Posttraumatic Stress Disorder Symptoms in Adults. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* *299*, 1291–1305.
- Bissière, S., Humeau, Y., and Lüthi, A. (2003). Dopamine gates LTP induction in lateral amygdala by suppressing feedforward inhibition. *Nat. Neurosci.* *6*, 587–592.
- Blaesse, P., Ehrhardt, S., Friauf, E., and Nothwang, H.G. (2005). Developmental pattern of three vesicular glutamate transporters in the rat superior olivary complex. *Cell Tissue Res.* *320*, 33–50.
- Blanchard, D.C., and Blanchard, R.J. (1972). Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. *J. Comp. Physiol. Psychol.* *81*, 281–290.
- Blechert, J., Michael, T., Vriends, N., Margraf, J., and Wilhelm, F.H. (2007). Fear conditioning in posttraumatic stress disorder: evidence for delayed extinction of autonomic, experiential, and behavioural responses. *Behav. Res. Ther.* *45*, 2019–2033.
- Bocchio, M., Fucsina, G., Oikonomidis, L., McHugh, S.B., Bannerman, D.M., Sharp, T., and Capogna, M. (2015). Increased Serotonin Transporter Expression Reduces Fear and Recruitment of Parvalbumin Interneurons of the Amygdala. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *40*, 3015–3026.

- Bocchio, M., McHugh, S.B., Bannerman, D.M., Sharp, T., and Capogna, M. (2016). Serotonin, Amygdala and Fear: Assembling the Puzzle. *Front. Neural Circuits* *10*.
- Bole, D.G., and Ueda, T. (2005). Inhibition of Vesicular Glutamate Uptake by Rose Bengal-Related Compounds: Structure–Activity Relationship. *Neurochem. Res.* *30*, 363–369.
- Bolte, S., and Cordelières, F.P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* *224*, 213–232.
- Boulland, J.-L., Qureshi, T., Seal, R.P., Rafiki, A., Gundersen, V., Bergersen, L.H., Fremereau, R.T., Edwards, R.H., Storm-Mathisen, J., and Chaudhry, F.A. (2004). Expression of the vesicular glutamate transporters during development indicates the widespread corelease of multiple neurotransmitters. *J. Comp. Neurol.* *480*, 264–280.
- Bouton, M.E. (2002). Context, ambiguity, and unlearning: sources of relapse after behavioral extinction. *Biol. Psychiatry* *52*, 976–986.
- Bouton, M.E. (2004). Context and behavioral processes in extinction. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* *11*, 485–494.
- Bouton, M.E., Westbrook, R.F., Corcoran, K.A., and Maren, S. (2006). Contextual and temporal modulation of extinction: behavioral and biological mechanisms. *Biol. Psychiatry* *60*, 352–360.
- Bowers, M.E., and Ressler, K.J. (2015). Interaction between the cholecystokinin and endogenous cannabinoid systems in cued fear expression and extinction retention. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *40*, 688–700.
- Bowman, E.J., Siebers, A., and Altendorf, K. (1988). Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *85*, 7972–7976.
- Bradley, R.G., Binder, E.B., Epstein, M.P., Tang, Y., Nair, H.P., Liu, W., Gillespie, C.F., Berg, T., Evces, M., Newport, D.J., et al. (2008). Influence of child abuse on adult depression: moderation by the corticotropin-releasing hormone receptor gene. *Arch. Gen. Psychiatry* *65*, 190–200.
- Brewin, C.R. (2001). A cognitive neuroscience account of posttraumatic stress disorder and its treatment. *Behav. Res. Ther.* *39*, 373–393.
- Brewin, C.R., and Holmes, E.A. (2003). Psychological theories of posttraumatic stress disorder. *Clin. Psychol. Rev.* *23*, 339–376.
- Brischoux, F., Chakraborty, S., Brierley, D.I., and Ungless, M.A. (2009). Phasic excitation of dopamine neurons in ventral VTA by noxious stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 4894–4899.
- Brooks, D.C., and Bouton, M.E. (1993). A retrieval cue for extinction attenuates spontaneous recovery. *J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Process.* *19*, 77–89.

Brown, S., and Schafer, E.A. (1888). An Investigation into the Functions of the Occipital and Temporal Lobes of the Monkey's Brain. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 179, 303–327.

Browning, M., Reid, C., Cowen, P.J., Goodwin, G.M., and Harmer, C.J. (2007). A single dose of citalopram increases fear recognition in healthy subjects. *J. Psychopharmacol. Oxf. Engl.* 21, 684–690.

Burghardt, N.S., Sullivan, G.M., McEwen, B.S., Gorman, J.M., and LeDoux, J.E. (2004). The selective serotonin reuptake inhibitor citalopram increases fear after acute treatment but reduces fear with chronic treatment: a comparison with tianeptine. *Biol. Psychiatry* 55, 1171–1178.

Burghardt, N.S., Bush, D.E.A., McEwen, B.S., and LeDoux, J.E. (2007). Acute selective serotonin reuptake inhibitors increase conditioned fear expression: blockade with a 5-HT_{2C} receptor antagonist. *Biol. Psychiatry* 62, 1111–1118.

Burgos-Robles, A., Vidal-Gonzalez, I., Santini, E., and Quirk, G.J. (2007). Consolidation of fear extinction requires NMDA receptor-dependent bursting in the ventromedial prefrontal cortex. *Neuron* 53, 871–880.

Bush, D.E.A., Caparosa, E.M., Gekker, A., and Ledoux, J. (2010). Beta-adrenergic receptors in the lateral nucleus of the amygdala contribute to the acquisition but not the consolidation of auditory fear conditioning. *Front. Behav. Neurosci.* 4, 154.

Busti, D., Geracitano, R., Whittle, N., Dalezios, Y., Mańko, M., Kaufmann, W., Sätzler, K., Singewald, N., Capogna, M., and Ferraguti, F. (2011). Different fear states engage distinct networks within the intercalated cell clusters of the amygdala. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 5131–5144.

Buzsáki, G., and Draguhn, A. (2004). Neuronal oscillations in cortical networks. *Science* 304, 1926–1929.

C

Cahoy, J.D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L.C., Zamanian, J.L., Christopherson, K.S., Xing, Y., Lubischer, J.L., Krieg, P.A., Krupenko, S.A., et al. (2008). A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 264–278.

Calabresi, P., Centonze, D., Gubellini, P., Pisani, A., and Bernardi, G. (2000). Acetylcholine-mediated modulation of striatal function. *Trends Neurosci.* 23, 120–126.

Cannich, A., Wotjak, C.T., Kamprath, K., Hermann, H., Lutz, B., and Marsicano, G. (2004). CB1 cannabinoid receptors modulate kinase and phosphatase activity during extinction of conditioned fear in mice. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 11, 625–632.

Cannon, W.B., Cannon, W.G., Cannon, W.B., Cannon, W.B., Cannon, W., Cannon, W.B., and Cannon, B. (1927). The James-Lange Theory of Emotions A Critical Examination and an Alternative Theory.

- Capogna, M. (2014). GABAergic cell type diversity in the basolateral amygdala. *Curr. Opin. Neurobiol.* 26, 110–116.
- Casado, M., Isope, P., and Ascher, P. (2002). Involvement of presynaptic N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar long-term depression. *Neuron* 33, 123–130.
- Case, D.T., and Gillespie, D.C. (2011). Pre- and postsynaptic properties of glutamatergic transmission in the immature inhibitory MNTB-LSO pathway. *J. Neurophysiol.* 106, 2570–2579.
- Cassell, M.D., and Wright, D.J. (1986). Topography of projections from the medial prefrontal cortex to the amygdala in the rat. *Brain Res. Bull.* 17, 321–333.
- Chen, Z.-Y., Jing, D., Bath, K.G., Ieraci, A., Khan, T., Siao, C.-J., Herrera, D.G., Toth, M., Yang, C., McEwen, B.S., et al. (2006). Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior. *Science* 314, 140–143.
- Chhatwal, J.P., Myers, K.M., Ressler, K.J., and Davis, M. (2005a). Regulation of gephyrin and GABAA receptor binding within the amygdala after fear acquisition and extinction. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 502–506.
- Chhatwal, J.P., Davis, M., Maguschak, K.A., and Ressler, K.J. (2005b). Enhancing cannabinoid neurotransmission augments the extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 30, 516–524.
- Chhatwal, J.P., Stanek-Rattiner, L., Davis, M., and Ressler, K.J. (2006). Amygdala BDNF signaling is required for consolidation but not encoding of extinction. *Nat. Neurosci.* 9, 870–872.
- Chhatwal, J.P., Gutman, A.R., Maguschak, K.A., Bowser, M.E., Yang, Y., Davis, M., and Ressler, K.J. (2009). Functional interactions between endocannabinoid and CCK neurotransmitter systems may be critical for extinction learning. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 34, 509–521.
- Chiang, C., and Aston-Jones, G. (1993). Response of locus coeruleus neurons to footshock stimulation is mediated by neurons in the rostral ventral medulla. *Neuroscience* 53, 705–715.
- Choi, D.C., Maguschak, K.A., Ye, K., Jang, S.-W., Myers, K.M., and Ressler, K.J. (2010a). Prelimbic cortical BDNF is required for memory of learned fear but not extinction or innate fear. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 2675–2680.
- Choi, D.C., Rothbaum, B.O., Gerardi, M., and Ressler, K.J. (2010b). Pharmacological enhancement of behavioral therapy: focus on posttraumatic stress disorder. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 2, 279–299.
- Choquet, D., and Triller, A. (2013). The dynamic synapse. *Neuron* 80, 691–703.
- Chua, J.J.E., Kindler, S., Boyken, J., and Jahn, R. (2010). The architecture of an excitatory synapse. *J. Cell Sci.* 123, 819–823.

Ciocchi, S., Herry, C., Grenier, F., Wolff, S.B.E., Letzkus, J.J., Vlachos, I., Ehrlich, I., Sprengel, R., Deisseroth, K., Stadler, M.B., et al. (2010). Encoding of conditioned fear in central amygdala inhibitory circuits. *Nature* 468, 277–282.

Cohen, H., Kozlovsky, N., Alona, C., Matar, M.A., and Joseph, Z. (2012). Animal model for PTSD: From clinical concept to translational research. *Neuropharmacology* 62, 715–724.

Collins, D.R., and Paré, D. (2000). Differential Fear Conditioning Induces Reciprocal Changes in the Sensory Responses of Lateral Amygdala Neurons to the CS+ and CS-. *Learn. Mem.* 7, 97–103.

Commons, K.G. (2009). Locally collateralizing glutamate neurons in the dorsal raphe nucleus responsive to substance P contain vesicular glutamate transporter 3 (VGLUT3). *J. Chem. Neuroanat.* 38, 273–281.

Conn, P.J., and Pin, J.P. (1997). Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37, 205–237.

Correia, S.S., McGrath, A.G., Lee, A., Graybiel, A.M., and Goosens, K.A. (2016). Amygdala-ventral striatum circuit activation decreases long-term fear. *ELife* 5.

Courtin, J., Chaudun, F., Rozeske, R.R., Karalis, N., Gonzalez-Campo, C., Wurtz, H., Abdi, A., Baufreton, J., Bienvenu, T.C.M., and Herry, C. (2014). Prefrontal parvalbumin interneurons shape neuronal activity to drive fear expression. *Nature* 505, 92–96.

Curtis, D.R., Phillis, J.W., and Watkins, J.C. (1960). The chemical excitation of spinal neurones by certain acidic amino acids. *J. Physiol.* 150, 656–682.

D

Dagnino-Subiabre, A., Pérez, M.Á., Terreros, G., Cheng, M.Y., House, P., and Sapolsky, R. (2012). Corticosterone treatment impairs auditory fear learning and the dendritic morphology of the rat inferior colliculus. *Hear. Res.* 294, 104–113.

Danbolt, N.C. (2001). Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* 65, 1–105.

Daniels, R.W., Collins, C.A., Gelfand, M.V., Dant, J., Brooks, E.S., Krantz, D.E., and DiAntonio, A. (2004). Increased expression of the *Drosophila* vesicular glutamate transporter leads to excess glutamate release and a compensatory decrease in quantal content. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 10466–10474.

Daniels, R.W., Collins, C.A., Chen, K., Gelfand, M.V., Featherstone, D.E., and DiAntonio, A. (2006). A single vesicular glutamate transporter is sufficient to fill a synaptic vesicle. *Neuron* 49, 11–16.

Daniels, R.W., Miller, B.R., and DiAntonio, A. (2011). Increased vesicular glutamate transporter expression causes excitotoxic neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* 41, 415–420.

Daoudal, G., and Debanne, D. (2003). Long-term plasticity of intrinsic excitability: learning rules and mechanisms. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 10, 456–465.

- Darwin, C. (1872-1965). "The Expression of the Emotions in Man and Animals." Chicago: University of Chicago Press.
- Davidson, null, and Irwin, null (1999). The functional neuroanatomy of emotion and affective style. *Trends Cogn. Sci.* 3, 11–21.
- Davidson, J.R.T., Stein, D.J., Shalev, A.Y., and Yehuda, R. (2004). Posttraumatic stress disorder: acquisition, recognition, course, and treatment. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 16, 135–147.
- Davis, J.A., Kenney, J.W., and Gould, T.J. (2007). Hippocampal $\alpha 4\beta 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Involvement in the Enhancing Effect of Acute Nicotine on Contextual Fear Conditioning. *J. Neurosci.* 27, 10870–10877.
- Deacon, T.W., Pakzaban, P., and Isacson, O. (1994). The lateral ganglionic eminence is the origin of cells committed to striatal phenotypes: neural transplantation and developmental evidence. *Brain Res.* 668, 211–219.
- Deakin, J.F., and Graeff, F.G. (1991). 5-HT and mechanisms of defence. *J. Psychopharmacol. Oxf. Engl.* 5, 305–315.
- Dejean, C., Courtin, J., Karalis, N., Chaudun, F., Wurtz, H., Bienvenu, T.C.M., and Herry, C. (2016). Prefrontal neuronal assemblies temporally control fear behaviour. *Nature* 535, 420–424.
- Descarries, L., Bérubé-Carrière, N., Riad, M., Bo, G.D., Mendez, J.A., and Trudeau, L.-E. (2008). Glutamate in dopamine neurons: synaptic versus diffuse transmission. *Brain Res. Rev.* 58, 290–302.
- Desmedt, A., Marighetto, A., and Piazza, P.-V. (2015). Abnormal Fear Memory as a Model for Posttraumatic Stress Disorder. *Biol. Psychiatry* 78, 290–297.
- Dickie, E.W., Brunet, A., Akerib, V., and Armony, J.L. (2008). An fMRI investigation of memory encoding in PTSD: influence of symptom severity. *Neuropsychologia* 46, 1522–1531.
- Dong, H.W., Petrovich, G.D., and Swanson, L.W. (2001). Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 38, 192–246.
- Disorders. American Psychiatric Association. (1994). American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental.
- Domjan, M. (2006). The principles of learning and behavior: Active learning edition. 5. Belmont, California: Thomson, Wadsworth.
- Dudai, Y. (2004). The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu. Rev. Psychol.* 55, 51–86.
- Dumont, E.C., Martina, M., Samson, R.D., Drolet, G., and Paré, D. (2002). Physiological properties of central amygdala neurons: species differences. *Eur. J. Neurosci.* 15, 545–552.

Duvarci, S., and Paré, D. (2007). Glucocorticoids enhance the excitability of principal basolateral amygdala neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 4482–4491.

Duvarci, S., and Pare, D. (2014). Amygdala microcircuits controlling learned fear. *Neuron* 82, 966–980.

Duvarci, S., Popa, D., and Paré, D. (2011). Central amygdala activity during fear conditioning. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 289–294.

E-F

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

Egan, M.F., Kojima, M., Callicott, J.H., Goldberg, T.E., Kolachana, B.S., Bertolino, A., Zaitsev, E., Gold, B., Goldman, D., Dean, M., et al. (2003). The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* 112, 257–269.

Ehlers, A., and Clark, D.M. (2000). A cognitive model of posttraumatic stress disorder. *Behav. Res. Ther.* 38, 319–345.

Ehlers, A., Suendermann, O., Boellinghaus, I., Vossbeck-Elsebusch, A., Gamer, M., Briddon, E., Martin, M.W., and Glucksman, E. (2010). Heart rate responses to standardized trauma-related pictures in acute posttraumatic stress disorder. *Int. J. Psychophysiol. Off. J. Int. Organ. Psychophysiol.* 78, 27–34.

Ehrlich, I., Humeau, Y., Grenier, F., Ciochi, S., Herry, C., and Lüthi, A. (2009). Amygdala Inhibitory Circuits and the Control of Fear Memory. *Neuron* 62, 757–771.

Ekman, P. (1992). An Argument for Basic Emotions. *Cogn. Emot.* 6, 169–200.

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

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

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

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

Etkin, A., and Wager, T.D. (2007). Functional neuroimaging of anxiety: a meta-analysis of emotional processing in PTSD, social anxiety disorder, and specific phobia. *Am. J. Psychiatry* 164, 1476–1488.

- Eybalin, M. (1993). Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea. *Physiol. Rev.* *73*, 309–373.
- F B Krasne, and Glanzman, and D.L. (1995). What We can Learn from Invertebrate Learning. *Annu. Rev. Psychol.* *46*, 585–624.
- Faber, E.S.L., and Sah, P. (2002). Physiological role of calcium-activated potassium currents in the rat lateral amygdala. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *22*, 1618–1628.
- Fanselow, M.S. (1994). Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear. *Psychon. Bull. Rev.* *1*, 429–438.
- Fareed, A., Eilender, P., Haber, M., Bremner, J., Whitfield, N., & Drexler, K. (2013). Comorbid posttraumatic stress disorder and opiate addiction: a literature review. *Journal of addictive diseases*, *32*(2), 168-179.
- Fasano, C., Rocchetti, J., Pietrajtis, K., Zander, J.-F., Manseau, F., Sakae, D.Y., Marcus-Sells, M., Ramet, L., Morel, L.J., Carrel, D., et al. (2017). Regulation of the Hippocampal Network by VGLUT3-Positive CCK- GABAergic Basket Cells. *Front. Cell. Neurosci.* *11*, 140.
- Fattorini, G., Verderio, C., Melone, M., Giovedì, S., Benfenati, F., Matteoli, M., and Conti, F. (2009). VGLUT1 and VGAT are sorted to the same population of synaptic vesicles in subsets of cortical axon terminals. *J. Neurochem.* *110*, 1538–1546.
- Felix-Ortiz, A.C., Beyeler, A., Seo, C., Leppla, C.A., Wildes, C.P., and Tye, K.M. (2013). BLA to vHPC inputs modulate anxiety-related behaviors. *Neuron* *79*, 658–664.
- Ferraguti, F., and Shigemoto, R. (2006). Metabotropic glutamate receptors. *Cell Tissue Res.* *326*, 483–504.
- Filho, J.C., Hazel, S.J., Anderstam, B., Bergström, J., Lewitt, M., and Hall, K. (1999). Effect of protein intake on plasma and erythrocyte free amino acids and serum IGF-I and IGF-BP-1 levels in rats. *Am. J. Physiol.* *277*, E693-701.
- Fonberg, E. (1965). Effect of partial destruction of the amygdaloid complex on the emotional-defensive behaviour of dogs. *Bull. Acad. Pol. Sci. [Biol.]* *13*, 429–432.
- Fonnum, F. (1984). Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.* *42*, 1–11.
- Fonnum, F., Fykse, E.M., and Roseth, S. (1998). Chapter 7 Uptake of glutamate into synaptic vesicles. *Prog. Brain Res.* *116*, 87–101.
- Francati, V., Vermetten, E., and Bremner, J.D. (2007). Functional neuroimaging studies in posttraumatic stress disorder: review of current methods and findings. *Depress. Anxiety* *24*, 202–218.
- Frankland, P.W., Cestari, V., Filipkowski, R.K., McDonald, R.J., and Silva, A.J. (1998). The dorsal hippocampus is essential for context discrimination but not for contextual conditioning.

Behav. Neurosci. *112*, 863–874.

Freneau, R.T., Troyer, M.D., Pahner, I., Nygaard, G.O., Tran, C.H., Reimer, R.J., Bellocchio, E.E., Fortin, D., Storm-Mathisen, J., and Edwards, R.H. (2001). The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron* *31*, 247–260.

Freneau, R.T., Burman, J., Qureshi, T., Tran, C.H., Proctor, J., Johnson, J., Zhang, H., Sulzer, D., Copenhagen, D.R., Storm-Mathisen, J., et al. (2002). The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 14488–14493.

Freneau, R.T., Kam, K., Qureshi, T., Johnson, J., Copenhagen, D.R., Storm-Mathisen, J., Chaudhry, F.A., Nicoll, R.A., and Edwards, R.H. (2004). Vesicular glutamate transporters 1 and 2 target to functionally distinct synaptic release sites. *Science* *304*, 1815–1819.

Freund, T.F., and Buzsáki, G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* *6*, 347–470.

Frey, U., Frey, S., Schollmeier, F., and Krug, M. (1996). Influence of actinomycin D, a RNA synthesis inhibitor, on long-term potentiation in rat hippocampal neurons in vivo and in vitro. *J. Physiol.* *490* (Pt 3), 703–711.

Frigerio, F., Casimir, M., Carobbio, S., and Maechler, P. (2008). Tissue specificity of mitochondrial glutamate pathways and the control of metabolic homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta* *1777*, 965–972.

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

Fyk-Kolodziej, B., Shimano, T., Gong, T.-W., and Holt, A.G. (2011). Vesicular Glutamate Transporters: Spatio-Temporal Plasticity following Hearing Loss. *Neuroscience* *178*, 218–239.
Gagnon, D., and Parent, M. (2014). Distribution of VGLUT3 in Highly Collateralized Axons from the Rat Dorsal Raphe Nucleus as Revealed by Single-Neuron Reconstructions. *PLOS ONE* *9*, e87709.

G

Gardner, A.J., and Griffiths, J. (2014). Propranolol, post-traumatic stress disorder, and intensive care: incorporating new advances in psychiatry into the ICU. *Crit. Care* *18*.

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

Geracitano, R., Kaufmann, W.A., Szabo, G., Ferraguti, F., and Capogna, M. (2007). Synaptic heterogeneity between mouse paracapsular intercalated neurons of the amygdala. *J. Physiol.* *585*, 117–134.

Geracitano, R., Fischer, D., Kasugai, Y., Ferraguti, F., and Capogna, M. (2012). Functional expression of the GABA(A) receptor $\alpha 2$ and $\alpha 3$ subunits at synapses between intercalated

medial paracapsular neurons of mouse amygdala. *Front. Neural Circuits* 6, 32.

Gielen, M. (2010). Fonctionnement des récepteurs-canaux du glutamate - Des protéines responsables de la transmission synaptique excitatrice. *médecine/sciences* 26, 65–72.

Gillespie, C.F., Bradley, B., Mercer, K., Smith, A.K., Conneely, K., Gapen, M., Weiss, T., Schwartz, A.C., Cubells, J.F., and Ressler, K.J. (2009). Trauma exposure and stress-related disorders in inner city primary care patients. *Gen. Hosp. Psychiatry* 31, 505–514.

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

Gleason, K.K., Dondeti, V.R., Hsia, H.-L.J., Cochran, E.R., Gumulak-Smith, J., and Saha, M.S. (2003). The vesicular glutamate transporter 1 (xVGLut1) is expressed in discrete regions of the developing *Xenopus laevis* nervous system. *Gene Expr. Patterns GEP* 3, 503–507.

Goddard, G.V. (1964). FUNCTIONS OF THE AMYGDALA. *Psychol. Bull.* 62, 89–109.

Godlewska, B.R., Norbury, R., Selvaraj, S., Cowen, P.J., and Harmer, C.J. (2012). Short-term SSRI treatment normalises amygdala hyperactivity in depressed patients. *Psychol. Med.* 42, 2609–2617.

Gong, J., Jellali, A., Mutterer, J., Sahel, J.A., Rendon, A., and Picaud, S. (2006). Distribution of vesicular glutamate transporters in rat and human retina. *Brain Res.* 1082, 73–85.

Gonul, A.S., Kitis, O., Eker, M.C., Eker, O.D., Ozan, E., and Coburn, K. (2011). Association of the brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism with hippocampus volumes in drug-free depressed patients. *World J. Biol. Psychiatry* 12, 110–118.

Goosens, K.A. (2011). Hippocampal Regulation of Aversive Memories. *Curr. Opin. Neurobiol.* 21, 460–466.

Goosens, K.A., and Maren, S. (2001). Contextual and auditory fear conditioning are mediated by the lateral, basal, and central amygdaloid nuclei in rats. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 8, 148–155.

Goosens, K.A., and Maren, S. (2003). Pretraining NMDA receptor blockade in the basolateral complex, but not the central nucleus, of the amygdala prevents savings of conditional fear. *Behav. Neurosci.* 117, 738–750.

Goosens, K.A., Hobin, J.A., and Maren, S. (2003). Auditory-evoked spike firing in the lateral amygdala and Pavlovian fear conditioning: mnemonic code or fear bias? *Neuron* 40, 1013–1022.

Gras, C., Herzog, E., Bellenchi, G.C., Bernard, V., Ravassard, P., Pohl, M., Gasnier, B., Giros, B., and El Mestikawy, S. (2002). A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 5442–5451.

Gras, C., Vinatier, J., Amilhon, B., Guerci, A., Christov, C., Ravassard, P., Giros, B., and El Mestikawy, S. (2005). Developmentally regulated expression of VGLUT3 during early post-

natal life. *Neuropharmacology* 49, 901–911.

Gras, C., Amilhon, B., Lepicard, E.M., Poirel, O., Vinatier, J., Herbin, M., Dumas, S., Tzavara, E.T., Wade, M.R., Nomikos, G.G., et al. (2008). The vesicular glutamate transporter VGLUT3 synergizes striatal acetylcholine tone. *Nat. Neurosci.* 11, 292–300.

Gray, E.G. (1959). Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex. *J. Anat.* 93, 420–433.

Gray, E.G. (1969). Electron microscopy of excitatory and inhibitory synapses: a brief review. *Prog. Brain Res.* 31, 141–155.

Greba, Q., Gifkins, A., and Kokkinidis, L. (2001). Inhibition of amygdaloid dopamine D2 receptors impairs emotional learning measured with fear-potentiated startle. *Brain Res.* 899, 218–226.

Green, K.T., Calhoun, P.S., Dennis, M.F., Mid-Atlantic Mental Illness Research, Education and Clinical Center Workgroup, and Beckham, J.C. (2010). Exploration of the resilience construct in posttraumatic stress disorder severity and functional correlates in military combat veterans who have served since September 11, 2001. *J. Clin. Psychiatry* 71, 823–830.

Griffin, M.G. (2008). A prospective assessment of auditory startle alterations in rape and physical assault survivors. *J. Trauma. Stress* 21, 91–99.

Grillon, C., Levenson, J., and Pine, D.S. (2007). A single dose of the selective serotonin reuptake inhibitor citalopram exacerbates anxiety in humans: a fear-potentiated startle study. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 32, 225–231.

Grimes, W.N., Seal, R.P., Oesch, N., Edwards, R.H., and Diamond, J.S. (2011). Genetic targeting and physiological features of VGLUT3+ amacrine cells. *Vis. Neurosci.* 28, 381–392.

Guarraci, F.A., Frohardt, R.J., and Kapp, B.S. (1999). Amygdaloid D1 dopamine receptor involvement in Pavlovian fear conditioning. *Brain Res.* 827, 28–40.

Guzowski, J.F., Knierim, J.J., and Moser, E.I. (2004). Ensemble Dynamics of Hippocampal Regions CA3 and CA1. *Neuron* 44, 581–584.

H

Hackett, J.T., and Ueda, T. (2015). Glutamate Release. *Neurochem. Res.* 40, 2443–2460.

Hajcak, G., Castille, C., Olvet, D.M., Dunning, J.P., Roohi, J., and Hatchwell, E. (2009). Genetic variation in brain-derived neurotrophic factor and human fear conditioning. *Genes Brain Behav.* 8, 80–85.

Halgren, E., Walter, R.D., Cherlow, D.G., and Crandall, P.H. (1978). Mental phenomena evoked by electrical stimulation of the human hippocampal formation and amygdala. *Brain J. Neurol.* 101, 83–117.

Hall, E. (1972). The amygdala of the cat: a Golgi study. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. Vienna Austria* 1948 134, 439–458.

Han, J.-H., Kushner, S.A., Yiu, A.P., Cole, C.J., Matynia, A., Brown, R.A., Neve, R.L., Guzowski, J.F., Silva, A.J., and Josselyn, S.A. (2007). Neuronal competition and selection during memory formation. *Science* 316, 457–460.

Han, J.-H., Kushner, S.A., Yiu, A.P., Hsiang, H.-L.L., Buch, T., Waisman, A., Bontempi, B., Neve, R.L., Frankland, P.W., and Josselyn, S.A. (2009). Selective erasure of a fear memory. *Science* 323, 1492–1496.

Harteringer, J., and Jahn, R. (1993). An anion binding site that regulates the glutamate transporter of synaptic vesicles. *J. Biol. Chem.* 268, 23122–23127.

Haubensak, W., Kunwar, P., Cai, H., Ciocchi, S., Wall, N., Ponnusamy, R., Biag, J., Dong, H.-W., Deisseroth, K., Callaway, E.M., et al. (2010). Genetic dissection of an amygdala microcircuit that gates conditioned fear. *Nature* 468, 270–276.

Haverkamp, S., and Wässle, H. (2004). Characterization of an amacrine cell type of the mammalian retina immunoreactive for vesicular glutamate transporter 3. *J. Comp. Neurol.* 468, 251–263.

Hayashi, T. (1954). Effects of Sodium Glutamate on the Nervous System. *Keio J. Med.* 3, 183–192.

Hayashi, M., Morimoto, R., Yamamoto, A., and Moriyama, Y. (2003). Expression and localization of vesicular glutamate transporters in pancreatic islets, upper gastrointestinal tract, and testis. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 51, 1375–1390.

Hediger, M.A., Clémentçon, B., Burrier, R.E., and Bruford, E.A. (2013). The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): introduction. *Mol. Aspects Med.* 34, 95–107.

Heimer, L., and Van Hoesen, G.W. (2006). The limbic lobe and its output channels: implications for emotional functions and adaptive behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 30, 126–147.

Heine, M., Groc, L., Frischknecht, R., Béique, J.-C., Lounis, B., Rumbaugh, G., Huganir, R.L., Cognet, L., and Choquet, D. (2008). Surface mobility of postsynaptic AMPARs tunes synaptic transmission. *Science* 320, 201–205.

Heldt, S.A., and Ressler, K.J. (2007). Training-induced changes in the expression of GABAA-associated genes in the amygdala after the acquisition and extinction of Pavlovian fear. *Eur. J. Neurosci.* 26, 3631–3644.

Heldt, S.A., Stanek, L., Chhatwal, J.P., and Ressler, K.J. (2007). Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *Mol. Psychiatry* 12, 656–670.

Hensler, J.G. (2006). Serotonergic modulation of the limbic system. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 30, 203–214.

- Herkenham, M., and Pert, C.B. (1982). Light microscopic localization of brain opiate receptors: a general autoradiographic method which preserves tissue quality. *J. Neurosci.* *2*, 1129–1149.
- Herring, B.E., Silm, K., Edwards, R.H., and Nicoll, R.A. (2015). Is Aspartate an Excitatory Neurotransmitter? *J. Neurosci.* *35*, 10168–10171.
- Herry, C., and Johansen, J.P. (2014). Encoding of fear learning and memory in distributed neuronal circuits. *Nat. Neurosci.* *17*, 1644–1654.
- Herry, C., Ciocchi, S., Senn, V., Demmou, L., Müller, C., and Lüthi, A. (2008). Switching on and off fear by distinct neuronal circuits. *Nature* *454*, 600–606.
- Herry, C., Ferraguti, F., Singewald, N., Letzkus, J.J., Ehrlich, I., and Lüthi, A. (2010). Neuronal circuits of fear extinction. *Eur. J. Neurosci.* *31*, 599–612.
- Herzog, E., Bellenchi, G.C., Gras, C., Bernard, V., Ravassard, P., Bedet, C., Gasnier, B., Giros, B., and El Mestikawy, S. (2001). The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, RC181.
- Herzog, E., Gilchrist, J., Gras, C., Muzerelle, A., Ravassard, P., Giros, B., Gaspar, P., and El Mestikawy, S. (2004). Localization of VGLUT3, the vesicular glutamate transporter type 3, in the rat brain. *Neuroscience* *123*, 983–1002.
- Hetrick, S.E., Purcell, R., Garner, B., and Parslow, R. (2010). Combined pharmacotherapy and psychological therapies for post traumatic stress disorder (PTSD). *Cochrane Database Syst. Rev.* CD007316.
- Higashijima, S.-I., Mandel, G., and Fetcho, J.R. (2004a). Distribution of prospective glutamatergic, glycinergic, and GABAergic neurons in embryonic and larval zebrafish. *J. Comp. Neurol.* *480*, 1–18.
- Higashijima, S.-I., Schaefer, M., and Fetcho, J.R. (2004b). Neurotransmitter properties of spinal interneurons in embryonic and larval zebrafish. *J. Comp. Neurol.* *480*, 19–37.
- Higley, M.J., Soler-Llavina, G.J., and Sabatini, B.L. (2009). Cholinergic modulation of multivesicular release regulates striatal synaptic potency and integration. *Nat. Neurosci.* *12*, 1121–1128.
- Hinoi, E., Fujimori, S., Takarada, T., Taniura, H., and Yoneda, Y. (2002). Facilitation of glutamate release by ionotropic glutamate receptors in osteoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *297*, 452–458.
- Hioki, H., Fujiyama, F., Nakamura, K., Wu, S.-X., Matsuda, W., and Kaneko, T. (2004). Chemically specific circuit composed of vesicular glutamate transporter 3- and preprotachykinin B-producing interneurons in the rat neocortex. *Cereb. Cortex N. Y. N* *1991* *14*, 1266–1275.
- Hioki, H., Nakamura, H., Ma, Y.-F., Konno, M., Hayakawa, T., Nakamura, K.C., Fujiyama, F., and 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.

Hnasko, T.S., Chuhma, N., Zhang, H., Goh, G.Y., Sulzer, D., Palmiter, R.D., Rayport, S., and Edwards, R.H. (2010). Vesicular glutamate transport promotes dopamine storage and glutamate corelease in vivo. *Neuron* *65*, 643–656.

Hoge, C.W., Terhakopian, A., Castro, C.A., Messer, S.C., and Engel, C.C. (2007). Association of posttraumatic stress disorder with somatic symptoms, health care visits, and absenteeism among Iraq war veterans. *Am. J. Psychiatry* *164*, 150–153.

Holehonnur, R., Luong, J.A., Chaturvedi, D., Ho, A., Lella, S.K., Hosek, M.P., and Ploski, J.E. (2014). Adeno-associated viral serotypes produce differing titers and differentially transduce neurons within the rat basal and lateral amygdala. *BMC Neurosci.* *15*, 28.

Holland, null, and Gallagher, null (1999). Amygdala circuitry in attentional and representational processes. *Trends Cogn. Sci.* *3*, 65–73.

Holtzman-Assif, O., Laurent, V., and Westbrook, R.F. (2010). Blockade of dopamine activity in the nucleus accumbens impairs learning extinction of conditioned fear. *Learn. Mem.* *17*, 71–75.

Hopkins, D.A., and Holstege, G. (1978). Amygdaloid projections to the mesencephalon, pons and medulla oblongata in the cat. *Exp. Brain Res.* *32*, 529–547.

Horvath, F.E. (1963). Effects of basolateral amygdalectomy on three types of avoidance behavior in cats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* *56*, 380–389.

Houyoux, N., Wattiez, R., and Ris, L. (2017). A proteomic analysis of contextual fear conditioned rats reveals dynamic modifications in neuron and oligodendrocyte protein expression in the dentate gyrus. *Eur. J. Neurosci.*

Hruska, M., and Dalva, M.B. (2012). Ephrin regulation of synapse formation, function and plasticity. *Mol. Cell. Neurosci.* *50*, 35–44.

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

Hübner, C., Bosch, D., Gall, A., Lüthi, A., and Ehrlich, I. (2014). Ex vivo dissection of optogenetically activated mPFC and hippocampal inputs to neurons in the basolateral amygdala: implications for fear and emotional memory. *Front. Behav. Neurosci.* *8*, 64.

I-J

Ishikawa, T., Sahara, Y., and Takahashi, T. (2002). A single packet of transmitter does not saturate postsynaptic glutamate receptors. *Neuron* *34*, 613–621.

Izquierdo, I. (1989). Different forms of post-training memory processing. *Behav. Neural Biol.* *51*, 171–202.

Izquierdo, I., Barros, D.M., Mello e Souza, T., de Souza, M.M., Izquierdo, L.A., and Medina, J.H. (1998). Mechanisms for memory types differ. *Nature* 393, 635–636.

Izquierdo, I., Medina, J.H., Vianna, M.R., Izquierdo, L.A., and Barros, D.M. (1999). Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav. Brain Res.* 103, 1–11.

Izquierdo, L.A., Barros, D.M., Vianna, M.R.M., Coitinho, A., deDavid e Silva, T., Choi, H., Moletta, B., Medina, J.H., and Izquierdo, I. (2002). Molecular pharmacological dissection of short- and long-term memory. *Cell. Mol. Neurobiol.* 22, 269–287.

Izumi, T., Ohmura, Y., Futami, Y., Matsuzaki, H., Kubo, Y., Yoshida, T., and Yoshioka, M. (2012). Effects of serotonergic terminal lesion in the amygdala on conditioned fear and innate fear in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 696, 89–95.

Jackson, J., Bland, B.H., and Antle, M.C. (2009). Nonserotonergic projection neurons in the midbrain raphe nuclei contain the vesicular glutamate transporter VGLUT3. *Synap. N. Y. N* 63, 31–41.

Jacobs, B.L., Foote, S.L., and Bloom, F.E. (1978). Differential projections of neurons within the dorsal raphe nucleus of the rat: a horseradish peroxidase (HRP) study. *Brain Res.* 147, 149–153.

Jacobsen, K.X., Höistad, M., Staines, W.A., and Fuxe, K. (2006). The distribution of dopamine D1 receptor and mu-opioid receptor 1 receptor immunoreactivities in the amygdala and interstitial nucleus of the posterior limb of the anterior commissure: relationships to tyrosine hydroxylase and opioid peptide terminal systems. *Neuroscience* 141, 2007–2018.

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

James, W. (1890). *The principles of psychology* (New York : Holt).

Janak, P.H., and Tye, K.M. (2015). From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature* 517, 284–292.

Jasnow, A.M., Ressler, K.J., Hammack, S.E., Chhatwal, J.P., and Rainnie, D.G. (2009). Distinct subtypes of cholecystokinin (CCK)-containing interneurons of the basolateral amygdala identified using a CCK promoter-specific lentivirus. *J. Neurophysiol.* 101, 1494–1506.

Jennings, K.A., Loder, M.K., Sheward, W.J., Pei, Q., Deacon, R.M.J., Benson, M.A., Olverman, H.J., Hastie, N.D., Harmar, A.J., Shen, S., et al. (2006). Increased expression of the 5-HT transporter confers a low-anxiety phenotype linked to decreased 5-HT transmission. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 8955–8964.

Jiang, L., Kundu, S., Lederman, J.D., López-Hernández, G.Y., Ballinger, E.C., Wang, S., Talmage, D.A., and Role, L.W. (2016). Cholinergic Signaling Controls Conditioned Fear Behaviors and Enhances Plasticity of Cortical-Amygdala Circuits. *Neuron* 90, 1057–1070.

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

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

Johnson, P.L., Molosh, A., Fitz, S.D., Arendt, D., Deehan, G.A., Federici, L.M., Bernabe, C., Engleman, E.A., Rodd, Z.A., Lowry, C.A., et al. (2015). Pharmacological depletion of serotonin in the basolateral amygdala complex reduces anxiety and disrupts fear conditioning. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 138, 174–179.

Johnston, J.B. (1923). Further contributions to the study of the evolution of the forebrain. *J. Comp. Neurol.* 35, 337–481.

Jolkkonen, E., and Pitkänen, A. (1998). Intrinsic connections of the rat amygdaloid complex: projections originating in the central nucleus. *J. Comp. Neurol.* 395, 53–72.

Jovanovic, T., and Ressler, K.J. (2010). How the neurocircuitry and genetics of fear inhibition may inform our understanding of PTSD. *Am. J. Psychiatry* 167, 648–662.

Jovanovic, T., Norrholm, S.D., Fennell, J.E., Keyes, M., Fiallos, A.M., Myers, K.M., Davis, M., and Duncan, E.J. (2009). Posttraumatic stress disorder may be associated with impaired fear inhibition: relation to symptom severity. *Psychiatry Res.* 167, 151–160.

Juge, N., Muroyama, A., Hiasa, M., Omote, H., and Moriyama, Y. (2009). Vesicular inhibitory amino acid transporter is a Cl⁻/gamma-aminobutyrate Co-transporter. *J. Biol. Chem.* 284, 35073–35078.

Juge, N., Gray, J.A., Omote, H., Miyaji, T., Inoue, T., Hara, C., Uneyama, H., Edwards, R.H., Nicoll, R.A., and Moriyama, Y. (2010). Metabolic control of vesicular glutamate transport and release. *Neuron* 68, 99–112.

Jüngling, K., Seidenbecher, T., Sosulina, L., Lesting, J., Sangha, S., Clark, S.D., Okamura, N., Duangdao, D.M., Xu, Y.-L., Reinscheid, R.K., et al. (2008). Neuropeptide S-mediated control of fear expression and extinction: role of intercalated GABAergic neurons in the amygdala. *Neuron* 59, 298–310.

K

Kamal, A.M., and Tömböl, T. (1975). Golgi studies on the amygdaloid nuclei of the cat. *J. Hirnforsch.* 16, 175–201.

Kanai, Y., and Hediger, M.A. (2004). The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects. *Pflugers Arch.* 447, 469–479.

Kandel, E., Schwartz, J., and Jessell, T. (2000). *Principles of Neural Science, Fourth Edition* (McGraw-Hill Companies, Incorporated).

- Kaneko, T., Fujiyama, F., and Hioki, H. (2002). Immunohistochemical localization of candidates for vesicular glutamate transporters in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* *444*, 39–62.
- Kaouane, N., Porte, Y., Vallée, M., Brayda-Bruno, L., Mons, N., Calandreau, L., Marighetto, A., Piazza, P.V., and Desmedt, A. (2012). Glucocorticoids can induce PTSD-like memory impairments in mice. *Science* *335*, 1510–1513.
- Karpova, N.N., Pickenhagen, A., Lindholm, J., Tiraboschi, E., Kuleskaya, N., Ágústsdóttir, A., Antila, H., Popova, D., Akamine, Y., Sullivan, R., et al. (2011). Fear Erasure in Mice Requires Synergy Between Antidepressant Drugs and Extinction Training. *Science* *334*, 1731–1734.
- Katona, I., Rancz, E.A., Acsady, L., Ledent, C., Mackie, K., Hajos, N., and Freund, T.F. (2001). Distribution of CB1 cannabinoid receptors in the amygdala and their role in the control of GABAergic transmission. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, 9506–9518.
- Kawahara, H., Yoshida, M., Yokoo, H., Nishi, M., and Tanaka, M. (1993). Psychological stress increases serotonin release in the rat amygdala and prefrontal cortex assessed by in vivo microdialysis. *Neurosci. Lett.* *162*, 81–84.
- Kemp, J.M., and Powell, T.P. (1971). The structure of the caudate nucleus of the cat: light and electron microscopy. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *262*, 383–401.
- Kenney, J.W., Raybuck, J.D., and Gould, T.J. (2012). Nicotinic receptors in the dorsal and ventral hippocampus differentially modulate contextual fear conditioning. *Hippocampus* *22*, 1681–1690.
- Kew, J.N.C., and Kemp, J.A. (2005). Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl.)* *179*, 4–29.
- King FA. (1958). Effect of septal and amygdaloid lesions on emotional behaviour and conditioned avoidance responses in the rat. *J. Nerv. Ment. Dis.* *126*, 57–63
- Kim, S.H., and Ryan, T.A. (2009). Synaptic vesicle recycling at CNS synapses without AP-2. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *29*, 3865–3874.
- Kim, D., Paré, D., and Nair, S.S. (2013). Assignment of model amygdala neurons to the fear memory trace depends on competitive synaptic interactions. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *33*, 14354–14358.
- Kim, J., Lee, S., Park, K., Hong, I., Song, B., Son, G., Park, H., Kim, W.R., Park, E., Choe, H.K., et al. (2007). Amygdala depotentiation and fear extinction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 20955–20960.
- Klüver, H, and Bucy, PC. (1937). “«Psychic blindness» and other symptoms following bilateral temporal lobectomy in rhesus monkeys.” *Am J Physiol.* *119*, 352-353.
- Knapska, E., and Maren, S. (2009). Reciprocal patterns of c-Fos expression in the medial prefrontal cortex and amygdala after extinction and renewal of conditioned fear. *Learn. Mem.*

Cold Spring Harb. N 16, 486–493.

Knobloch, H.S., Charlet, A., Hoffmann, L.C., Eliava, M., Khrulev, S., Cetin, A.H., Osten, P., Schwarz, M.K., Seeburg, P.H., Stoop, R., et al. (2012). Evoked axonal oxytocin release in the central amygdala attenuates fear response. *Neuron* 73, 553–566.

Knox, D. (2016). The role of basal forebrain cholinergic neurons in fear and extinction memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 133, 39–52.

Knox, D., and Keller, S.M. (2016). Cholinergic neuronal lesions in the medial septum and vertical limb of the diagonal bands of Broca induce contextual fear memory generalization and impair acquisition of fear extinction. *Hippocampus* 26, 718–726.

Kohda, K., Harada, K., Kato, K., Hoshino, A., Motohashi, J., Yamaji, T., Morinobu, S., Matsuoka, N., and Kato, N. (2007). Glucocorticoid receptor activation is involved in producing abnormal phenotypes of single-prolonged stress rats: A putative post-traumatic stress disorder model. *Neuroscience* 148, 22–33.

Köhr, G. (2006). NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution. *Cell Tissue Res.* 326, 439–446.

Kolk, B.A. van der (1994). The Body Keeps the Score: Memory and the Evolving Psychobiology of Posttraumatic Stress. *Harv. Rev. Psychiatry* 1, 253–265.

Kosofsky, B.E., and Molliver, M.E. (1987). The serotonergic innervation of cerebral cortex: different classes of axon terminals arise from dorsal and median raphe nuclei. *Synap. N. Y. N* 1, 153–168.

Krebs, H.A. (1935). Metabolism of amino-acids. *Biochem. J.* 29, 1951–1969.

Krettek, J.E., and Price, J.L. (1978). A description of the amygdaloid complex in the rat and cat with observations on intra-amygdaloid axonal connections. *J. Comp. Neurol.* 178, 255–280.

Kudo, T., Uchigashima, M., Miyazaki, T., Konno, K., Yamasaki, M., Yanagawa, Y., Minami, M., and Watanabe, M. (2012). Three types of neurochemical projection from the bed nucleus of the stria terminalis to the ventral tegmental area in adult mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 18035–18046.

L

Laake, J.H., Slyngstad, T.A., Haug, F.M., and Ottersen, O.P. (1995). Glutamine from glial cells is essential for the maintenance of the nerve terminal pool of glutamate: immunogold evidence from hippocampal slice cultures. *J. Neurochem.* 65, 871–881.

Lafenêtre, P., Chaouloff, F., and Marsicano, G. (2007). The endocannabinoid system in the processing of anxiety and fear and how CB1 receptors may modulate fear extinction. *Pharmacol. Res.* 56, 367–381.

Landry, M., Bouali-Benazzouz, R., El Mestikawy, S., Ravassard, P., and Nagy, F. (2004). Expression of vesicular glutamate transporters in rat lumbar spinal cord, with a note on dorsal

root ganglia. *J. Comp. Neurol.* *468*, 380–394.

Lang, P.J., Davis, M., and Ohman, A. (2000). Fear and anxiety: animal models and human cognitive psychophysiology. *J. Affect. Disord.* *61*, 137–159.

Lanius, R.A., Bluhm, R., Lanius, U., and Pain, C. (2006). A review of neuroimaging studies in PTSD: heterogeneity of response to symptom provocation. *J. Psychiatr. Res.* *40*, 709–729.

LeDoux, J. (2003). The emotional brain, fear, and the amygdala. *Cell. Mol. Neurobiol.* *23*, 727–738.

LeDoux, J. (2007). The amygdala. *Curr. Biol.* *CB 17*, R868–874.

LeDoux, J.E., Ruggiero, D.A., and Reis, D.J. (1985). Projections to the subcortical forebrain from anatomically defined regions of the medial geniculate body in the rat. *J. Comp. Neurol.* *242*, 182–213.

LeDoux, J.E., Cicchetti, P., Xagoraris, A., and Romanski, L.M. (1990a). The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *10*, 1062–1069.

LeDoux, J.E., Farb, C., and Ruggiero, D.A. (1990b). Topographic organization of neurons in the acoustic thalamus that project to the amygdala. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *10*, 1043–1054.

Lee, R.Y., Sawin, E.R., Chalfie, M., Horvitz, H.R., and Avery, L. (1999). EAT-4, a homolog of a mammalian sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter, is necessary for glutamatergic neurotransmission in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *19*, 159–167.

Lee, S., Kim, S.-J., Kwon, O.-B., Lee, J.H., and Kim, J.-H. (2013). Inhibitory networks of the amygdala for emotional memory. *Front. Neural Circuits* *7*.

Lee, S., Chen, L., Chen, M., Ye, M., Seal, R.P., and Zhou, Z.J. (2014). An Unconventional Glutamatergic Circuit in the Retina Formed by vGluT3 Amacrine Cells. *Neuron* *84*, 708–715.

Lemtiri-Chlieh, F., and Levine, E.S. (2010). BDNF evokes release of endogenous cannabinoids at layer 2/3 inhibitory synapses in the neocortex. *J. Neurophysiol.* *104*, 1923–1932.

Leung, H.T., Holmes, N.M., and Westbrook, R.F. (2016). An appetitive conditioned stimulus enhances fear acquisition and impairs fear extinction. *Learn. Mem.* *23*, 113–120.

Li, D., Hérault, K., Silm, K., Evrard, A., Wojcik, S., Oheim, M., Herzog, E., and Ropert, N. (2013a). Lack of evidence for vesicular glutamate transporter expression in mouse astrocytes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *33*, 4434–4455.

Li, H., Penzo, M.A., Taniguchi, H., Kopec, C.D., Huang, Z.J., and Li, B. (2013b). Experience-dependent modification of a central amygdala fear circuit. *Nat. Neurosci.* *16*, 332–339.

Li, W.-J., Yu, H., Yang, J.-M., Gao, J., Jiang, H., Feng, M., Zhao, Y.-X., and Chen, Z.-Y. (2010). Anxiolytic effect of music exposure on BDNF^{Met/Met} transgenic mice. *Brain Res.*

1347, 71–79.

Liberzon, I., Krstov, M., and Young, E.A. (1997). Stress-restress: Effects on ACTH and fast feedback. *Psychoneuroendocrinology* 22, 443–453.

Liguz-Leczna, M., and Skangiel-Kramska, J. (2007). Vesicular glutamate transporters (VGLUTs): the three musketeers of glutamatergic system. *Acta Neurobiol. Exp. (Warsz.)* 67, 207–218.

Likhtik, E., Stujenske, J.M., Topiwala, M.A., Harris, A.Z., and Gordon, J.A. (2014). Prefrontal entrainment of amygdala activity signals safety in learned fear and innate anxiety. *Nat. Neurosci.* 17, 106–113.

Lin, L.H., and Talman, W.T. (2005). Nitroergic neurons in rat nucleus tractus solitarius express vesicular glutamate transporter 3. *J. Chem. Neuroanat.* 29, 179–191.

Lin, H.-C., Mao, S.-C., and Gean, P.-W. (2009). Block of gamma-aminobutyric acid-A receptor insertion in the amygdala impairs extinction of conditioned fear. *Biol. Psychiatry* 66, 665–673.

Lin, L.-H., Nitschke, D., Jin, J., Tian, X., Chu, Y., Sigmund, C., and Talman, W.T. (2012). Decreased expression of neuronal nitric oxide synthase in the nucleus tractus solitarius inhibits sympathetically mediated baroreflex responses in rat. *J. Physiol.* 590, 3545–3559.

Line, S.J., Barkus, C., Rawlings, N., Jennings, K., McHugh, S., Sharp, T., and Bannerman, D.M. (2014). Reduced sensitivity to both positive and negative reinforcement in mice over-expressing the 5-hydroxytryptamine transporter. *Eur. J. Neurosci.* 40, 3735–3745.

Linke, R., Braune, G., and Schwegler, H. (2000). Differential projection of the posterior paralaminar thalamic nuclei to the amygdaloid complex in the rat. *Exp. Brain Res.* 134, 520–532.

Liu, I.Y.C., Lyons, W.E., Mamounas, L.A., and Thompson, R.F. (2004). Brain-derived neurotrophic factor plays a critical role in contextual fear conditioning. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 7958–7963.

Liu, X., Ramirez, S., Pang, P.T., Puryear, C.B., Govindarajan, A., Deisseroth, K., and Tonegawa, S. (2012). Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall. *Nature* 484, 381–385.

Livneh, U., and Paz, R. (2012a). Aversive-bias and stage-selectivity in neurons of the primate amygdala during acquisition, extinction, and overnight retention. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 8598–8610.

Livneh, U., and Paz, R. (2012b). Amygdala-prefrontal synchronization underlies resistance to extinction of aversive memories. *Neuron* 75, 133–142.

Logan, W.J., and Snyder, S.H. (1972). High affinity uptake systems for glycine, glutamic and aspartic acids in synaptosomes of rat central nervous tissues. *Brain Res.* 42, 413–431.

Lonsdorf, T.B., Weike, A.I., Golkar, A., Schalling, M., Hamm, A.O., and Öhman, A. (2010).

Amygdala-dependent fear conditioning in humans is modulated by the BDNFval66met polymorphism. *Behav. Neurosci.* *124*, 9–15.

Lopez de Armentia, M., and Sah, P. (2004). Firing properties and connectivity of neurons in the rat lateral central nucleus of the amygdala. *J. Neurophysiol.* *92*, 1285–1294.

Louvar, H., Maccari, S., Ducrocq, F., Thomas, P., and Darnaudéry, M. (2005). Long-term behavioural alterations in female rats after a single intense footshock followed by situational reminders. *Psychoneuroendocrinology* *30*, 316–324.

Lovett-Barron, M., Turi, G.F., Kaifosh, P., Lee, P.H., Bolze, F., Sun, X.-H., Nicoud, J.-F., Zemelman, B.V., Sternson, S.M., and Losonczy, A. (2012). Regulation of neuronal input transformations by tunable dendritic inhibition. *Nat. Neurosci.* *15*, 423–430, S1-3.

Lowry, C.A., Johnson, P.L., Hay-Schmidt, A., Mikkelsen, J., and Shekhar, A. (2005). Modulation of anxiety circuits by serotonergic systems. *Stress Amst. Neth.* *8*, 233–246.

Lüscher, C., and Malenka, R.C. (2012). NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *4*.

Lutz, B. (2007). The endocannabinoid system and extinction learning. *Mol. Neurobiol.* *36*, 92–101.

M

MacLean, P.D. (1949). Psychosomatic disease and the visceral brain; recent developments bearing on the Papez theory of emotion. *Psychosom. Med.* *11*, 338–353.

MacNeil, M.A., and Masland, R.H. (1998). Extreme diversity among amacrine cells: implications for function. *Neuron* *20*, 971–982.

Maechler, P., and Wollheim, C.B. (1999). Mitochondrial glutamate acts as a messenger in glucose-induced insulin exocytosis. *Nature* *402*, 685–689.

Mahan, A.L., and Ressler, K.J. (2012). Fear conditioning, synaptic plasticity and the amygdala: implications for posttraumatic stress disorder. *Trends Neurosci.* *35*, 24–35.

Maier, S.F. (2001). Exposure to the stressor environment prevents the temporal dissipation of behavioral depression/learned helplessness. *Biol. Psychiatry* *49*, 763–773.

Maison, P., Walker, D.J., Walsh, F.S., Williams, G., and Doherty, P. (2009). BDNF regulates neuronal sensitivity to endocannabinoids. *Neurosci. Lett.* *467*, 90–94.

Marc, R.E., and Liu, W. (2000). Fundamental GABAergic amacrine cell circuitries in the retina: nested feedback, concatenated inhibition, and axosomatic synapses. *J. Comp. Neurol.* *425*, 560–582.

Marcaggi, P., and Coles, J.A. (2001). Ammonium in nervous tissue: transport across cell membranes, fluxes from neurons to glial cells, and role in signalling. *Prog. Neurobiol.* *64*, 157–183.

- Maren, S. (2003). The amygdala, synaptic plasticity, and fear memory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 985, 106–113.
- Maren, S., Phan, K.L., and Liberzon, I. (2013). The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 417–428.
- Markram, H., Lübke, J., Frotscher, M., and Sakmann, B. (1997). Regulation of synaptic efficacy by coincidence of postsynaptic APs and EPSPs. *Science* 275, 213–215.
- Marowsky, A., Yanagawa, Y., Obata, K., and Vogt, K.E. (2005). A specialized subclass of interneurons mediates dopaminergic facilitation of amygdala function. *Neuron* 48, 1025–1037.
- Marsicano, G., Wotjak, C.T., Azad, S.C., Bisogno, T., Rammes, G., Cascio, M.G., Hermann, H., Tang, J., Hofmann, C., Zieglgänsberger, W., et al. (2002). The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* 418, 530–534.
- Martina, M., Royer, S., and Paré, D. (1999). Physiological properties of central medial and central lateral amygdala neurons. *J. Neurophysiol.* 82, 1843–1854.
- Martínez-García, F., Martínez-Marcos, A., and Lanuza, E. (2002). The pallial amygdala of amniote vertebrates: evolution of the concept, evolution of the structure. *Brain Res. Bull.* 57, 463–469.
- Mascagni, F., and McDonald, A.J. (2003). Immunohistochemical characterization of cholecystokinin containing neurons in the rat basolateral amygdala. *Brain Res.* 976, 171–184.
- Mascagni, F., and McDonald, A.J. (2007). A Novel Subpopulation of 5-HT_{3A} Receptor Immunoreactive Interneurons in the Rat Basolateral Amygdala. *Neuroscience* 144, 1015–1024.
- Masland, R.H. (2012). The neuronal organization of the retina. *Neuron* 76, 266–280.
- Maycox, P.R., Deckwerth, T., Hell, J.W., and Jahn, R. (1988). Glutamate uptake by brain synaptic vesicles. Energy dependence of transport and functional reconstitution in proteoliposomes. *J. Biol. Chem.* 263, 15423–15428.
- McDonald, A. J. (1992). Cell types and intrinsic connections of the amygdala. *The amygdala: Neurobiological aspects of emotion, memory, and mental dysfunction*, p. 67-96.
- McDonald, A.J. (1998). Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog. Neurobiol.* 55, 257–332.
- McDonald, A.J. (2003). Is There an Amygdala and How Far Does It Extend? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 985, 1–21.
- McDonald, A.J., and Augustine, J.R. (1993). Localization of GABA-like immunoreactivity in the monkey amygdala. *Neuroscience* 52, 281–294.
- McDonald, A.J., and Betette, R.L. (2001). Parvalbumin-containing neurons in the rat basolateral amygdala: morphology and co-localization of Calbindin-D(28k). *Neuroscience* 102, 413–425.

- McDonald, A.J., and Mascagni, F. (2001). Colocalization of calcium-binding proteins and GABA in neurons of the rat basolateral amygdala. *Neuroscience* *105*, 681–693.
- McDonald, A.J., and Mascagni, F. (2002). Immunohistochemical characterization of somatostatin containing interneurons in the rat basolateral amygdala. *Brain Res.* *943*, 237–244.
- McDonald, A.J., and Mott, D.D. (2017). Functional neuroanatomy of amygdalohippocampal interconnections and their role in learning and memory. *J. Neurosci. Res.* *95*, 797–820.
- McDonald, A.J., Mascagni, F., and Guo, L. (1996). Projections of the medial and lateral prefrontal cortices to the amygdala: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. *Neuroscience* *71*, 55–75.
- McDonald, A.J., Mascagni, F., and Zaric, V. (2012). Subpopulations of somatostatin-immunoreactive non-pyramidal neurons in the amygdala and adjacent external capsule project to the basal forebrain: evidence for the existence of GABAergic projection neurons in the cortical nuclei and basolateral nuclear complex. *Front. Neural Circuits* *6*, 46.
- McEchron, M.D., Bouwmeester, H., Tseng, W., Weiss, C., and Disterhoft, J.F. (1998). Hippocampectomy disrupts auditory trace fear conditioning and contextual fear conditioning in the rat. *Hippocampus* *8*, 638–646.
- McGaugh, J.L. (1966). Time-dependent processes in memory storage. *Science* *153*, 1351–1358.
- McHugh, S.B., Barkus, C., Lima, J., Glover, L.R., Sharp, T., and Bannerman, D.M. (2015). SERT and uncertainty: serotonin transporter expression influences information processing biases for ambiguous aversive cues in mice. *Genes Brain Behav.* *14*, 330–336.
- McIntire, S.L., Reimer, R.J., Schuske, K., Edwards, R.H., and Jorgensen, E.M. (1997). Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature* *389*, 870–876.
- McLaughlin, K.A., Conron, K.J., Koenen, K.C., and Gilman, S.E. (2010). Childhood adversity, adult stressful life events, and risk of past-year psychiatric disorder: a test of the stress sensitization hypothesis in a population-based sample of adults. *Psychol. Med.* *40*, 1647–1658.
- MD, A.F., PSyD, P.E., PhD, M.H., MD, J.B., PhD, N.W., and MD, K.D. (2013). Comorbid Posttraumatic Stress Disorder and Opiate Addiction: A Literature Review. *J. Addict. Dis.* *32*, 168–179.
- Medina, L., Legaz, I., González, G., De Castro, F., Rubenstein, J.L.R., and Puelles, L. (2004). Expression of Dbx1, Neurogenin 2, Semaphorin 5A, Cadherin 8, and Emx1 distinguish ventral and lateral pallial histogenetic divisions in the developing mouse claustramygdaloid complex. *J. Comp. Neurol.* *474*, 504–523.
- Meister, A., Griffith, O.W., Novogrodsky, A., and Tate, S.S. (1979). New aspects of glutathione metabolism and translocation in mammals. *Ciba Found. Symp.* 135–161.
- Meldrum, B.S. (2000). Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain: Review of Physiology

and Pathology. *J. Nutr.* *130*, 1007S–1015S.

Meldrum, B., and Garthwaite, J. (1990). Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol. Sci.* *11*, 379–387.

Mendez, J.A., Bourque, M.-J., Dal Bo, G., Bourdeau, M.L., Danik, M., Williams, S., Lacaille, J.-C., and Trudeau, L.-E. (2008). Developmental and target-dependent regulation of vesicular glutamate transporter expression by dopamine neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *28*, 6309–6318.

Meunier, M., Bachevalier, J., Murray, E.A., Málková, L., and Mishkin, M. (1999). Effects of aspiration versus neurotoxic lesions of the amygdala on emotional responses in monkeys. *Eur. J. Neurosci.* *11*, 4403–4418.

Michelsen, K.A., Schmitz, C., and Steinbusch, H.W.M. (2007). The dorsal raphe nucleus--from silver stainings to a role in depression. *Brain Res. Rev.* *55*, 329–342.

Milad, M.R., and Quirk, G.J. (2012). Fear extinction as a model for translational neuroscience: ten years of progress. *Annu. Rev. Psychol.* *63*, 129–151.

Milad, M.R., Orr, S.P., Lasko, N.B., Chang, Y., Rauch, S.L., and Pitman, R.K. (2008). Presence and Acquired Origin of Reduced Recall for Fear Extinction in PTSD: Results of a Twin Study. *J. Psychiatr. Res.* *42*, 515–520.

Millhouse, O.E. (1986). The intercalated cells of the amygdala. *J. Comp. Neurol.* *247*, 246–271.

Milliken, C.S., Auchterlonie, J.L., and Hoge, C.W. (2007). Longitudinal assessment of mental health problems among active and reserve component soldiers returning from the Iraq war. *JAMA* *298*, 2141–2148.

Mimura, Y., Mogi, K., Kawano, M., Fukui, Y., Takeda, J., Nogami, H., and Hisano, S. (2002). Differential expression of two distinct vesicular glutamate transporters in the rat retina. *Neuroreport* *13*, 1925–1928.

Mintz, E.M., and Scott, T.J. (2006). Colocalization of serotonin and vesicular glutamate transporter 3-like immunoreactivity in the midbrain raphe of Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Neurosci. Lett.* *394*, 97–100.

Miot, S. (2017). Rôle du transporteur vésiculaire du glutamate de type 3 (VGLUT3) dans la réponse au stress hypoxique néonatal et la surdité DFNA25 (Doctoral dissertation, Paris 6).

Miot, S., Voituron, N., Sterlin, A., Vigneault, E., Morel, L., Matrot, B., Ramanantsoa, N., Amilhon, B., Poirel, O., Lepicard, E., et al. (2012). The vesicular glutamate transporter VGLUT3 contributes to protection against neonatal hypoxic stress. *J. Physiol.* *590*, 5183–5198.

Miyaji, T., Echigo, N., Hiasa, M., Senoh, S., Omote, H., and Moriyama, Y. (2008). Identification of a vesicular aspartate transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 11720–11724.

- Miyaji, T., Omote, H., and Moriyama, Y. (2011). Functional characterization of vesicular excitatory amino acid transport by human sialin. *J. Neurochem.* *119*, 1–5.
- Miyazaki, T., Fukaya, M., Shimizu, H., and Watanabe, M. (2003). Subtype switching of vesicular glutamate transporters at parallel fibre-Purkinje cell synapses in developing mouse cerebellum. *Eur. J. Neurosci.* *17*, 2563–2572.
- Moechars, D., Weston, M.C., Leo, S., Callaerts-Vegh, Z., Goris, I., Daneels, G., Buist, A., Cik, M., van der Spek, P., Kass, S., et al. (2006). Vesicular glutamate transporter VGLUT2 expression levels control quantal size and neuropathic pain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 12055–12066.
- Mokin M, et al. (2007). Conversion of silent synapses into the active pool by selective GluR1-3 and GluR4 AMPAR trafficking during in vitro classical conditioning. *J Neurophysiol.* *98*, 1278–1286.
- Montana, V., Ni, Y., Sunjara, V., Hua, X., and Parpura, V. (2004). Vesicular glutamate transporter-dependent glutamate release from astrocytes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 2633–2642.
- Morimoto, R., Uehara, S., Yatsushiro, S., Juge, N., Hua, Z., Senoh, S., Echigo, N., Hayashi, M., Mizoguchi, T., Ninomiya, T., et al. (2006). Secretion of L-glutamate from osteoclasts through transcytosis. *EMBO J.* *25*, 4175–4186.
- Moriyama, Y., Hayashi, M., Yamada, H., Yatsushiro, S., Ishio, S., and Yamamoto, A. (2000). Synaptic-like microvesicles, synaptic vesicle counterparts in endocrine cells, are involved in a novel regulatory mechanism for the synthesis and secretion of hormones. *J. Exp. Biol.* *203*, 117–125.
- Mosinger, J.L., Yazulla, S., and Studholme, K.M. (1986). GABA-like immunoreactivity in the vertebrate retina: a species comparison. *Exp. Eye Res.* *42*, 631–644.
- Muller, J., Corodimas, K.P., Fridel, Z., and LeDoux, J.E. (1997). Functional inactivation of the lateral and basal nuclei of the amygdala by muscimol infusion prevents fear conditioning to an explicit conditioned stimulus and to contextual stimuli. *Behav. Neurosci.* *111*, 683–691.
- Muller, J.F., Mascagni, F., and McDonald, A.J. (2005). Coupled networks of parvalbumin-immunoreactive interneurons in the rat basolateral amygdala. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 7366–7376.
- Muller, J.F., Mascagni, F., and McDonald, A.J. (2006). Pyramidal cells of the rat basolateral amygdala: synaptology and innervation by parvalbumin-immunoreactive interneurons. *J. Comp. Neurol.* *494*, 635–650.
- Muller, J.F., Mascagni, F., and McDonald, A.J. (2007a). Postsynaptic targets of somatostatin-containing interneurons in the rat basolateral amygdala. *J. Comp. Neurol.* *500*, 513–529.
- Muller, J.F., Mascagni, F., and McDonald, A.J. (2007b). Serotonin-immunoreactive axon terminals innervate pyramidal cells and interneurons in the rat basolateral amygdala. *J. Comp. Neurol.* *505*, 314–335.

Murphy, S.E., Norbury, R., O'Sullivan, U., Cowen, P.J., and Harmer, C.J. (2009). Effect of a single dose of citalopram on amygdala response to emotional faces. *Br. J. Psychiatry* *194*, 535–540.

Myers, C. (1915). A CONTRIBUTION TO THE STUDY OF SHELL SHOCK. *The Lancet* *185*, 316–320.

Myers, K.M., and Davis, M. (2007). Mechanisms of fear extinction. *Mol. Psychiatry* *12*, 120–150.

N-O

Nader, K., and LeDoux, J.E. (1999). Inhibition of the mesoamygdala dopaminergic pathway impairs the retrieval of conditioned fear associations. *Behav. Neurosci.* *113*, 891–901.

Nader, K., Majidishad, P., Amorapanth, P., and LeDoux, J.E. (2001). Damage to the Lateral and Central, but Not Other, Amygdaloid Nuclei Prevents the Acquisition of Auditory Fear Conditioning. *Learn. Mem.* *8*, 156–163.

Naito, S., and Ueda, T. (1985). Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles. *J. Neurochem.* *44*, 99–109.

Nakamura, K., Matsumura, K., Hübschle, T., Nakamura, Y., Hioki, H., Fujiyama, F., Boldogkői, Z., König, M., Thiel, H.-J., Gerstberger, R., et al. (2004). Identification of sympathetic premotor neurons in medullary raphe regions mediating fever and other thermoregulatory functions. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 5370–5380.

Nakanishi, S. (1992). Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* *258*, 597–603.

Narayanan, R.T., Seidenbecher, T., Kluge, C., Bergado, J., Stork, O., and Pape, H.-C. (2007). Dissociated theta phase synchronization in amygdalo- hippocampal circuits during various stages of fear memory. *Eur. J. Neurosci.* *25*, 1823–1831.

Neugebauer, V., Galhardo, V., Maione, S., and Mackey, S.C. (2009). Forebrain Pain Mechanisms. *Brain Res. Rev.* *60*, 226–242.

Ni, Y., and Parpura, V. (2009). Dual regulation of Ca²⁺-dependent glutamate release from astrocytes: vesicular glutamate transporters and cytosolic glutamate levels. *Glia* *57*, 1296–1305.

Ni, B., Rosteck, P.R., Nadi, N.S., and Paul, S.M. (1994). Cloning and expression of a cDNA encoding a brain-specific Na⁽⁺⁾-dependent inorganic phosphate cotransporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 5607–5611.

Nickerson, A., Schick, M., Schnyder, U., Bryant, R.A., and Morina, N. (2017). Comorbidity of Posttraumatic Stress Disorder and Depression in Tortured, Treatment-Seeking Refugees. *J. Trauma. Stress* *30*, 409–415.

Nickerson Poulin, A., Guerci, A., El Mestikawy, S., and Semba, K. (2006). Vesicular glutamate

transporter 3 immunoreactivity is present in cholinergic basal forebrain neurons projecting to the basolateral amygdala in rat. *J. Comp. Neurol.* 498, 690–711.

Nicoletti, F., Bockaert, J., Collingridge, G.L., Conn, P.J., Ferraguti, F., Schoepp, D.D., Wroblewski, J.T., and Pin, J.P. (2011). Metabotropic glutamate receptors: from the workbench to the bedside. *Neuropharmacology* 60, 1017–1041.

Ninan, I., Bath, K.G., Dagar, K., Perez-Castro, R., Plummer, M.R., Lee, F.S., and Chao, M.V. (2010). The BDNF Val66Met polymorphism impairs NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in the hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 8866–8870.

Nishida, K., Nomura, Y., Kawamori, K., Moriyama, Y., and Nagasawa, K. (2014). Expression profile of vesicular nucleotide transporter (VNUT, SLC17A9) in subpopulations of rat dorsal root ganglion neurons. *Neurosci. Lett.* 579, 75–79.

Nissim, I. (1999). Newer aspects of glutamine/glutamate metabolism: the role of acute pH changes. *Am. J. Physiol.* 277, F493–497.

Nitecka, L., and Ben-Ari, Y. (1987). Distribution of GABA-like immunoreactivity in the rat amygdaloid complex. *J. Comp. Neurol.* 266, 45–55.

Noh, J., Seal, R.P., Garver, J.A., Edwards, R.H., and Kandler, K. (2010). Glutamate co-release at GABA/glycinergic synapses is crucial for the refinement of an inhibitory map. *Nat. Neurosci.* 13, 232–238.

Ohning, G.V., Wong, H.C., Lloyd, K.C., and Walsh, J.H. (1996). Gastrin mediates the gastric mucosal proliferative response to feeding. *Am. J. Physiol.* 271, G470–476.

Oliveira, A.L.R., Hydling, F., Olsson, E., Shi, T., Edwards, R.H., Fujiyama, F., Kaneko, T., Hökfelt, T., Cullheim, S., and Meister, B. (2003). Cellular localization of three vesicular glutamate transporter mRNAs and proteins in rat spinal cord and dorsal root ganglia. *Synap. N. Y. N* 50, 117–129.

Olsson, M., Campbell, K., Victorin, K., and Björklund, A. (1995). Projection neurons in fetal striatal transplants are predominantly derived from the lateral ganglionic eminence. *Neuroscience* 69, 1169–1182.

Omiya, Y., Uchigashima, M., Konno, K., Yamasaki, M., Miyazaki, T., Yoshida, T., Kusumi, I., and Watanabe, M. (2015). VGluT3-expressing CCK-positive basket cells construct invaginating synapses enriched with endocannabinoid signaling proteins in particular cortical and cortex-like amygdaloid regions of mouse brains. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 35, 4215–4228.

Omote, H., Miyaji, T., Juge, N., and Moriyama, Y. (2011). Vesicular neurotransmitter transporter: bioenergetics and regulation of glutamate transport. *Biochemistry (Mosc.)* 50, 5558–5565.

Ormel, L., Stensrud, M.J., Bergersen, L.H., and Gundersen, V. (2012). VGLUT1 is localized in astrocytic processes in several brain regions. *Glia* 60, 229–238.

Ou, L.-C., and Gean, P.-W. (2006). Regulation of amygdala-dependent learning by brain-derived neurotrophic factor is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol-3-kinase. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *31*, 287–296.

Owen, O.E., Kalhan, S.C., and Hanson, R.W. (2002). The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *J. Biol. Chem.* *277*, 30409–30412.

Ozawa, S., Kamiya, H., and Tsuzuki, K. (1998). Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* *54*, 581–618.

P

Pabba, M. (2013). Evolutionary development of the amygdaloid complex. *Front. Neuroanat.* *7*.

Pape, H.-C., and Pare, D. (2010). Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear. *Physiol. Rev.* *90*, 419–463.

Pape, H.-C., and Stork, O. (2003). Genes and Mechanisms in the Amygdala Involved in the Formation of Fear Memory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *985*, 92–105.

Papez, J.W. (1937). A PROPOSED MECHANISM OF EMOTION. *Arch. Neurol. Psychiatry* *38*, 725–743.

Paré, D., and Smith, Y. (1993a). Distribution of GABA immunoreactivity in the amygdaloid complex of the cat. *Neuroscience* *57*, 1061–1076.

Paré, D., and Smith, Y. (1993b). The intercalated cell masses project to the central and medial nuclei of the amygdala in cats. *Neuroscience* *57*, 1077–1090.

Paré, D., Smith, Y., and Paré, J.F. (1995). Intra-amygdaloid projections of the basolateral and basomedial nuclei in the cat: Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin anterograde tracing at the light and electron microscopic level. *Neuroscience* *69*, 567–583.

Paré, D., Royer, S., Smith, Y., and Lang, E.J. (2003). Contextual inhibitory gating of impulse traffic in the intra-amygdaloid network. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *985*, 78–91.

Parent, A., Côté, P.Y., and Lavoie, B. (1995). Chemical anatomy of primate basal ganglia. *Prog. Neurobiol.* *46*, 131–197.

Park, C.R., Campbell, A.M., and Diamond, D.M. (2001). Chronic psychosocial stress impairs learning and memory and increases sensitivity to yohimbine in adult rats. *Biol. Psychiatry* *50*, 994–1004.

Parsons, R.G., and Ressler, K.J. (2013). Implications of memory modulation for post-traumatic stress and fear disorders. *Nat. Neurosci.* *16*, 146–153.

Pavlov IP. (1927). *Conditioned Reflexes: An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex*. London: Oxford Univ. Press.

Paxinos, G. Franklin et Franklin, K. KBJ (2001) *The Mouse Brain in stereotaxic coordinates*.

- Pentkowski, N.S., Blanchard, D.C., Lever, C., Litvin, Y., and Blanchard, R.J. (2006). Effects of lesions to the dorsal and ventral hippocampus on defensive behaviors in rats. *Eur. J. Neurosci.* *23*, 2185–2196.
- Perego, C., Vanoni, C., Bossi, M., Massari, S., Basudev, H., Longhi, R., and Pietrini, G. (2000). The GLT-1 and GLAST glutamate transporters are expressed on morphologically distinct astrocytes and regulated by neuronal activity in primary hippocampal cocultures. *J. Neurochem.* *75*, 1076–1084.
- Peters, J., Dieppa-Perea, L.M., Melendez, L.M., and Quirk, G.J. (2010). Induction of fear extinction with hippocampal-infralimbic BDNF. *Science* *328*, 1288–1290.
- Petilla Interneuron Nomenclature Group, Ascoli, G.A., Alonso-Nanclares, L., Anderson, S.A., Barrionuevo, G., Benavides-Piccione, R., Burkhalter, A., Buzsáki, G., Cauli, B., Defelipe, J., et al. (2008). Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* *9*, 557–568.
- Petrovich, G.D., and Swanson, L.W. (1997). Projections from the lateral part of the central amygdalar nucleus to the postulated fear conditioning circuit. *Brain Res.* *763*, 247–254.
- Pinheiro, P.S., and Mulle, C. (2008). Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanisms of action. *Nat. Rev. Neurosci.* *9*, 423–436.
- Pinna, G., and Rasmusson, A.M. (2014). Ganaxolone improves behavioral deficits in a mouse model of post-traumatic stress disorder. *Front. Cell. Neurosci.* *8*, 256.
- Pisani, A., Calabresi, P., Centonze, D., and Bernardi, G. (1997). Enhancement of NMDA responses by group I metabotropic glutamate receptor activation in striatal neurones. *Br. J. Pharmacol.* *120*, 1007–1014.
- Pitkanen, A. (2000). The connectivity of the rat amygdaloid complex. In: Aggleton, J.P., editor. *The Amygdala: A Functional Analysis*. Oxford: Oxford University Press. 31-116.
- Pitkänen, A., and Amaral, D.G. (1993). Distribution of parvalbumin-immunoreactive cells and fibers in the monkey temporal lobe: the amygdaloid complex. *J. Comp. Neurol.* *331*, 14–36.
- Pitkänen, A., Savander, V., and LeDoux, J.E. (1997). Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends Neurosci.* *20*, 517–523.
- Pitkänen, A., Pikkarainen, M., Nurminen, N., and Ylinen, A. (2000). Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *911*, 369–391.
- Pitman, R.K., Rasmusson, A.M., Koenen, K.C., Shin, L.M., Orr, S.P., Gilbertson, M.W., Milad, M.R., and Liberzon, I. (2012). Biological studies of post-traumatic stress disorder. *Nat. Rev. Neurosci.* *13*, 769–787.
- Pole, N., Neylan, T.C., Otte, C., Henn-Hasse, C., Metzler, T.J., and Marmar, C.R. (2009).

Prospective Prediction of PTSD Symptoms Using Fear Potentiated Auditory Startle Responses. *Biol. Psychiatry* 65, 235–240.

Poulin, J.-F., Castonguay-Lebel, Z., Laforest, S., and Drolet, G. (2008). Enkephalin co-expression with classic neurotransmitters in the amygdaloid complex of the rat. *J. Comp. Neurol.* 506, 943–959.

Pourcho, R.G., and Goebel, D.J. (1985). Immunocytochemical demonstration of glycine in retina. *Brain Res.* 348, 339–342.

Power, A.E., and McGaugh, J.L. (2002). Cholinergic activation of the basolateral amygdala regulates unlearned freezing behavior in rats. *Behav. Brain Res.* 134, 307–315.

Preskorn, S.H., Ross, R., and Stanga, C.Y. (2004). Selective Serotonin Reuptake Inhibitors. In *Antidepressants: Past, Present and Future*, (Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 241–262.

Puel, J.L. (1995). Chemical synaptic transmission in the cochlea. *Prog. Neurobiol.* 47, 449–476.

Puelles, L. (2001). Thoughts on the development, structure and evolution of the mammalian and avian telencephalic pallium. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 356, 1583–1598.

Q-R

Quillfeldt, J. A. (2016). Behavioral methods to study learning and memory in rats. In *Rodent Model as Tools in Ethical Biomedical Research*. Springer International Publishing. 271-311.

Quirk, G.J., Reppas, C., and LeDoux, J.E. (1995). Fear conditioning enhances short-latency auditory responses of lateral amygdala neurons: parallel recordings in the freely behaving rat. *Neuron* 15, 1029–1039.

Quirk, G.J., Armony, J.L., and LeDoux, J.E. (1997). Fear conditioning enhances different temporal components of tone-evoked spike trains in auditory cortex and lateral amygdala. *Neuron* 19, 613–624.

Rademacher, D.J., Mendoza-Elias, N., and Meredith, G.E. (2015). Effects of context-drug learning on synaptic connectivity in the basolateral nucleus of the amygdala in rats. *Eur. J. Neurosci.* 41, 205–215.

Rainnie, D.G. (1999). Serotonergic modulation of neurotransmission in the rat basolateral amygdala. *J. Neurophysiol.* 82, 69–85.

Rainnie, D.G., Mania, I., Mascagni, F., and McDonald, A.J. (2006). Physiological and morphological characterization of parvalbumin-containing interneurons of the rat basolateral amygdala. *J. Comp. Neurol.* 498, 142–161.

Ramet, L., Zimmermann, J., Bersot, T., Poirel, O., Gois, S.D., Silm, K., Sakae, D.Y., Mansouri-Guilani, N., Bourque, M.-J., Trudeau, L.-E., et al. (2017). Characterization of a Human Point Mutation of VGLUT3 (p.A211V) in the Rodent Brain Suggests a Nonuniform Distribution of the Transporter in Synaptic Vesicles. *J. Neurosci.* 37, 4181–4199.

- Rattiner, L.M., Davis, M., French, C.T., and Ressler, K.J. (2004). Brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor B involvement in amygdala-dependent fear conditioning. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 4796–4806.
- Reddy, V.S., Shlykov, M.A., Castillo, R., Sun, E.I., and Saier, M.H. (2012). The major facilitator superfamily (MFS) revisited. *FEBS J.* *279*, 2022–2035.
- Redecker, P., Kreutz, M.R., Bockmann, J., Gundelfinger, E.D., and Boeckers, T.M. (2003). Brain synaptic junctional proteins at the acrosome of rat testicular germ cells. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* *51*, 809–819.
- Reimer, R.J. (2013). SLC17: a functionally diverse family of organic anion transporters. *Mol. Aspects Med.* *34*, 350–359.
- Reimer, R.J., Freneau, R.T., Bellocchio, E.E., and Edwards, R.H. (2001). The essence of excitation. *Curr. Opin. Cell Biol.* *13*, 417–421.
- Ren, J., Qin, C., Hu, F., Tan, J., Qiu, L., Zhao, S., ... & Luo, M. (2011). Habenula “cholinergic” neurons corelease glutamate and acetylcholine and activate postsynaptic neurons via distinct transmission modes. *Neuron*, *69*(3), 445–452.
- Rennie, M.J., Bowtell, J.L., Bruce, M., and Khogali, S.E. (2001). Interaction between glutamine availability and metabolism of glycogen, tricarboxylic acid cycle intermediates and glutathione. *J. Nutr.* *131*, 2488S–90S; discussion 2496S–7S.
- Repa, J.C., Muller, J., Apergis, J., Desrochers, T.M., Zhou, Y., and LeDoux, J.E. (2001). Two different lateral amygdala cell populations contribute to the initiation and storage of memory. *Nat. Neurosci.* *4*, 724–731.
- Rescorla, R.A., and Heth, C.D. (1975). Reinstatement of fear to an extinguished conditioned stimulus. *J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Process.* *1*, 88–96.
- Richter-Levin, G. (1998). Acute and long-term behavioral correlates of underwater trauma — potential relevance to stress and post-stress syndromes. *Psychiatry Res.* *79*, 73–83.
- Roberts, E., and Frankel, S. (1950). gamma-Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *J. Biol. Chem.* *187*, 55–63.
- Robinson, E. (1965). The Effect of Chlorpromazine on Fear-Motivated Behavior of Amygdalectomized Rats. *Psychol. Rec.* *15*, 211–216.
- Roche, M., O’Connor, E., Diskin, C., and Finn, D.P. (2007). The effect of CB(1) receptor antagonism in the right basolateral amygdala on conditioned fear and associated analgesia in rats. *Eur. J. Neurosci.* *26*, 2643–2653.
- Rodríguez-Moreno, A., and Sihra, T.S. (2007). Metabotropic actions of kainate receptors in the CNS. *J. Neurochem.* *103*, 2121–2135.
- Rodriguez-Romaguera, J., Monte, F.H.M.D., and Quirk, G.J. (2012). Deep brain stimulation of

the ventral striatum enhances extinction of conditioned fear. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 8764–8769.

Rogan, M.T., Stäubli, U.V., and LeDoux, J.E. (1997). Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature* *390*, 604–607.

Rogers, J.L., and Kesner, R.P. (2004). Cholinergic Modulation of the Hippocampus During Encoding and Retrieval of Tone/Shock-Induced Fear Conditioning. *Learn. Mem.* *11*, 102–107.

Romanski, L.M., and LeDoux, J.E. (1993). Information cascade from primary auditory cortex to the amygdala: corticocortical and corticoamygdaloid projections of temporal cortex in the rat. *Cereb. Cortex N. Y. N* *1991* *3*, 515–532.

Romanski, L.M., Clugnet, M.C., Bordi, F., and LeDoux, J.E. (1993). Somatosensory and auditory convergence in the lateral nucleus of the amygdala. *Behav. Neurosci.* *107*, 444–450.

Root, D.H., Mejias-Aponte, C.A., Zhang, S., Wang, H.-L., Hoffman, A.F., Lupica, C.R., and Morales, M. (2014). Single rodent mesohabenular axons release glutamate and GABA. *Nat. Neurosci.* *17*, 1543–1551.

Rosas-Vidal, L.E., Do-Monte, F.H., Sotres-Bayon, F., and Quirk, G.J. (2014). Hippocampal--prefrontal BDNF and memory for fear extinction. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *39*, 2161–2169.

Rosenkranz, J.A., and Grace, A.A. (2002a). Dopamine-mediated modulation of odour-evoked amygdala potentials during pavlovian conditioning. *Nature* *417*, 282–287.

Rosenkranz, J.A., and Grace, A.A. (2002b). Cellular mechanisms of infralimbic and prelimbic prefrontal cortical inhibition and dopaminergic modulation of basolateral amygdala neurons in vivo. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *22*, 324–337.

Roseth, S., Fykse, E.M., and Fonnum, F. (1995). Uptake of L-glutamate into rat brain synaptic vesicles: effect of inhibitors that bind specifically to the glutamate transporter. *J. Neurochem.* *65*, 96–103.

Royer, S., Martina, M., and Paré, D. (1999). An inhibitory interface gates impulse traffic between the input and output stations of the amygdala. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *19*, 10575–10583.

Royer, S., Martina, M., and Pare, D. (2000). Bistable behavior of inhibitory neurons controlling impulse traffic through the amygdala: role of a slowly deactivating K⁺ current. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *20*, 9034–9039.

Rudy, J.W., Huff, N.C., and Matus-Amat, P. (2004). Understanding contextual fear conditioning: insights from a two-process model. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *28*, 675–685.

Ruel, J., Wang, J., Rebillard, G., Eybalin, M., Lloyd, R., Pujol, R., and Puel, J.-L. (2007). Physiology, pharmacology and plasticity at the inner hair cell synaptic complex. *Hear. Res.* *227*, 19–27.

Ruel, J., Emery, S., Nouvian, R., Bersot, T., Amilhon, B., Van Rybroek, J.M., Rebillard, G., Lenoir, M., Eybalin, M., Delprat, B., et al. (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.

S

Safieddine, S., and Wenthold, R.J. (1997). The glutamate receptor subunit delta1 is highly expressed in hair cells of the auditory and vestibular systems. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *17*, 7523–7531.

Sagné, C., El Mestikawy, S., Isambert, M.F., Hamon, M., Henry, J.P., Giros, B., and Gasnier, B. (1997). Cloning of a functional vesicular GABA and glycine transporter by screening of genome databases. *FEBS Lett.* *417*, 177–183.

Sah, P., Faber, E.S.L., Lopez De Armentia, M., and Power, J. (2003). The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol. Rev.* *83*, 803–834.

Sakae, D.Y., Marti, F., Lecca, S., Vorspan, F., Martín-García, E., Morel, L.J., Henrion, A., Gutiérrez-Cuesta, J., Besnard, A., Heck, N., et al. (2015). The absence of VGLUT3 predisposes to cocaine abuse by increasing dopamine and glutamate signaling in the nucleus accumbens. *Mol. Psychiatry* *20*, 1448–1459.

Samson, R.D., and Paré, D. (2006). A spatially structured network of inhibitory and excitatory connections directs impulse traffic within the lateral amygdala. *Neuroscience* *141*, 1599–1609.
Samson, R.D., Dumont, É.C., and Paré, D. (2003). Feedback Inhibition Defines Transverse Processing Modules in the Lateral Amygdala. *J. Neurosci.* *23*, 1966–1973.

Samson, R.D., Duvarci, S., and Paré, D. (2005). Synaptic plasticity in the central nucleus of the amygdala. *Rev. Neurosci.* *16*, 287–302.

Sangha, S., Narayanan, R.T., Bergado-Acosta, J.R., Stork, O., Seidenbecher, T., and Pape, H.-C. (2009). Deficiency of the 65 kDa isoform of glutamic acid decarboxylase impairs extinction of cued but not contextual fear memory. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *29*, 15713–15720.
Sano, C. (2009). History of glutamate production. *Am. J. Clin. Nutr.* *90*, 728S–732S.

Sawada, K., Echigo, N., Juge, N., Miyaji, T., Otsuka, M., Omote, H., Yamamoto, A., and Moriyama, Y. (2008). Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 5683–5686.

Scarr, E., Gibbons, A.S., Neo, J., Udawela, M., and Dean, B. (2013). Cholinergic connectivity: it's implications for psychiatric disorders. *Front. Cell. Neurosci.* *7*, 55.

Schafe, G.E., Nadel, N.V., Sullivan, G.M., Harris, A., and LeDoux, J.E. (1999). Memory consolidation for contextual and auditory fear conditioning is dependent on protein synthesis, PKA, and MAP kinase. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* *6*, 97–110.

Schäfer, M.K.-H., Varoqui, H., Defamie, N., Weihe, E., and Erickson, J.D. (2002). Molecular cloning and functional identification of mouse vesicular glutamate transporter 3 and its expression in subsets of novel excitatory neurons. *J. Biol. Chem.* *277*, 50734–50748.

- Schenck, S., Wojcik, S.M., Brose, N., and Takamori, S. (2009). A chloride conductance in VGLUT1 underlies maximal glutamate loading into synaptic vesicles. *Nat. Neurosci.* *12*, 156–162.
- Schmid, S.M., and Hollmann, M. (2008). To gate or not to gate: are the delta subunits in the glutamate receptor family functional ion channels? *Mol. Neurobiol.* *37*, 126–141.
- Seal, R.P., and Amara, S.G. (1999). Excitatory amino acid transporters: a family in flux. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *39*, 431–456.
- Seal, R.P., Akil, O., Yi, E., Weber, C.M., Grant, L., Yoo, J., Clause, A., Kandler, K., Noebels, J.L., Glowatzki, E., et al. (2008). Sensorineural deafness and seizures in mice lacking vesicular glutamate transporter 3. *Neuron* *57*, 263–275.
- Seal, R.P., Wang, X., Guan, Y., Raja, S.N., Woodbury, C.J., Basbaum, A.I., and Edwards, R.H. (2009). Injury-induced mechanical hypersensitivity requires C-low threshold mechanoreceptors. *Nature* *462*, 651–655.
- Senn, V., Wolff, S.B.E., Herry, C., Grenier, F., Ehrlich, I., Gründemann, J., Fadok, J.P., Müller, C., Letzkus, J.J., and Lüthi, A. (2014). Long-range connectivity defines behavioral specificity of amygdala neurons. *Neuron* *81*, 428–437.
- Shaban, H., Humeau, Y., Herry, C., Cassasus, G., Shigemoto, R., Ciocchi, S., Barbieri, S., van der Putten, H., Kaupmann, K., Bettler, B., et al. (2006). Generalization of amygdala LTP and conditioned fear in the absence of presynaptic inhibition. *Nat. Neurosci.* *9*, 1028–1035.
- Sheng, M., and Hoogenraad, C.C. (2007). The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annu. Rev. Biochem.* *76*, 823–847.
- Sheng, M., and Kim, E. (2011). The postsynaptic organization of synapses. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*.
- Shin, R.-M., Tsvetkov, E., and Bolshakov, V.Y. (2006). Spatiotemporal asymmetry of associative synaptic plasticity in fear conditioning pathways. *Neuron* *52*, 883–896.
- Shumyatsky, G.P., Tsvetkov, E., Malleret, G., Vronskaya, S., Hatton, M., Hampton, L., Battey, J.F., Dulac, C., Kandel, E.R., and Bolshakov, V.Y. (2002). Identification of a signaling network in lateral nucleus of amygdala important for inhibiting memory specifically related to learned fear. *Cell* *111*, 905–918.
- Shutoh, F., Ina, A., Yoshida, S., Konno, J., and Hisano, S. (2008). Two distinct subtypes of serotonergic fibers classified by co-expression with vesicular glutamate transporter 3 in rat forebrain. *Neurosci. Lett.* *432*, 132–136.
- Sierra-Mercado, D., Padilla-Coreano, N., and Quirk, G.J. (2011). Dissociable Roles of Prelimbic and Infralimbic Cortices, Ventral Hippocampus, and Basolateral Amygdala in the Expression and Extinction of Conditioned Fear. *Neuropsychopharmacology* *36*, 529–538.

Skinner B.F. (1937). Two Types of Conditioned Reflex: A Reply to Konorski and Miller, *Journal of General Psychology*, *16*, 272-279.

Small, D.L., and Tauskela, J.S. (2005). Glutamate Receptor Pharmacology: Lessons Learned from the Last Decade of Stroke Trials. In *Glutamate Receptors in Peripheral Tissue: Excitatory Transmission Outside the CNS*, (Springer, Boston, MA), pp. 27–45.

Smith, Q.R. (2000). Transport of glutamate and other amino acids at the blood-brain barrier. *J. Nutr.* *130*, 1016S–22S.

Smith, Y., and Paré, D. (1994). Intra-amygdaloid projections of the lateral nucleus in the cat: PHA-L anterograde labeling combined with postembedding GABA and glutamate immunocytochemistry. *J. Comp. Neurol.* *342*, 232–248.

Smith, Y., Paré, J.F., and Paré, D. (1998). Cat intraamygdaloid inhibitory network: ultrastructural organization of parvalbumin-immunoreactive elements. *J. Comp. Neurol.* *391*, 164–179.

Smith, Y., Paré, J.-F., and Paré, D. (2000). Differential innervation of parvalbumin-immunoreactive interneurons of the basolateral amygdaloid complex by cortical and intrinsic inputs. *J. Comp. Neurol.* *416*, 496–508.

Soiza-Reilly, M., and Commons, K.G. (2011). Glutamatergic drive of the dorsal raphe nucleus. *J. Chem. Neuroanat.* *41*, 247–255.

Soliman, F., Glatt, C.E., Bath, K.G., Levita, L., Jones, R.M., Pattwell, S.S., Jing, D., Tottenham, N., Amso, D., Somerville, L.H., et al. (2010). A genetic variant BDNF polymorphism alters extinction learning in both mouse and human. *Science* *327*, 863–866.

Somogyi, P., and Klausberger, T. (2005). Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J. Physiol.* *562*, 9–26.

Somogyi, J., Baude, A., Omori, Y., Shimizu, H., El Mestikawy, S., Fukaya, M., Shigemoto, R., Watanabe, M., and Somogyi, P. (2004). GABAergic basket cells expressing cholecystinin contain vesicular glutamate transporter type 3 (VGLUT3) in their synaptic terminals in hippocampus and isocortex of the rat. *Eur. J. Neurosci.* *19*, 552–569.

Somogyi, P., Dalezios, Y., Luján, R., Roberts, J.D.B., Watanabe, M., and Shigemoto, R. (2003). High level of mGluR7 in the presynaptic active zones of select populations of GABAergic terminals innervating interneurons in the rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* *17*, 2503–2520.

Song, H., Ming, G., Fon, E., Bellocchio, E., Edwards, R.H., and Poo, M. (1997). Expression of a putative vesicular acetylcholine transporter facilitates quantal transmitter packaging. *Neuron* *18*, 815–826.

Sorvari, H., Soininen, H., Paljärvi, L., Karkola, K., and Pitkänen, A. (1995). Distribution of parvalbumin-immunoreactive cells and fibers in the human amygdaloid complex. *J. Comp. Neurol.* *360*, 185–212.

Sotres-Bayon, F., and Quirk, G.J. (2010). Prefrontal control of fear: more than just extinction.

Curr. Opin. Neurobiol. 20, 231–235.

Sotres-Bayon, F., Sierra-Mercado, D., Pardilla-Delgado, E., and Quirk, G.J. (2012). Gating of fear in prelimbic cortex by hippocampal and amygdala inputs. *Neuron* 76, 804–812.

Spampanato, J., Polepalli, J., and Sah, P. (2011). Interneurons in the basolateral amygdala. *Neuropharmacology* 60, 765–773.

Spannuth, B.M., Hale, M.W., Evans, A.K., Lukkes, J.L., Campeau, S., and Lowry, C.A. (2011). Investigation of a central nucleus of the amygdala/dorsal raphe nucleus serotonergic circuit implicated in fear-potentiated startle. *Neuroscience* 179, 104–119.

Stella, S.L., Li, S., Sabatini, A., Vila, A., and Brecha, N.C. (2008). Comparison of the ontogeny of the vesicular glutamate transporter 3 (VGLUT3) with VGLUT1 and VGLUT2 in the rat retina. *Brain Res.* 1215, 20–29.

Stensrud, M.J., Chaudhry, F.A., Leergaard, T.B., Bjaalie, J.G., and Gundersen, V. (2013). Vesicular glutamate transporter-3 in the rodent brain: vesicular colocalization with vesicular γ -aminobutyric acid transporter. *J. Comp. Neurol.* 521, 3042–3056.

Stensrud, M.J., Sogn, C.J., and Gundersen, V. (2015). Immunogold characteristics of VGLUT3-positive GABAergic nerve terminals suggest corelease of glutamate. *J. Comp. Neurol.* 523, 2698–2713.

Steriade, M.; Pare, D. (2007). *Gating in cerebral networks*. Cambridge: Cambridge University Press.

Sternbach, L.H., Sancilio, F.D., and Blount, J.F. (1974). Quinazolines and 1,4-benzodiazepines. 64. Comparison of the stereochemistry of diazepam with that of close analogs with marginal biological activity. *J. Med. Chem.* 17, 374–377.

Stork, O., Ji, F.Y., and Obata, K. (2002). Reduction of extracellular GABA in the mouse amygdala during and following confrontation with a conditioned fear stimulus. *Neurosci. Lett.* 327, 138–142.

Storm-Mathisen, J., and Ottersen, O.P. (1990). Immunocytochemistry of glutamate at the synaptic level. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 38, 1733–1743.

Stornetta, R.L., Sevigny, C.P., and Guyenet, P.G. (2002). Vesicular glutamate transporter DNPI/VGLUT2 mRNA is present in C1 and several other groups of brainstem catecholaminergic neurons. *J. Comp. Neurol.* 444, 191–206.

Stragier, E., Martin, V., Davenas, E., Poilbout, C., Mongeau, R., Corradetti, R., and Lanfumey, L. (2015). Brain plasticity and cognitive functions after ethanol consumption in C57BL/6J mice. *Transl. Psychiatry* 5, e696.

Stutzmann, G.E., and LeDoux, J.E. (1999). GABAergic antagonists block the inhibitory effects of serotonin in the lateral amygdala: a mechanism for modulation of sensory inputs related to fear conditioning. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, RC8.

Südhof, T.C., and Rizo, J. (2011). Synaptic Vesicle Exocytosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3.

Suendermann, O., Ehlers, A., Boellinghaus, I., Gamer, M., and Glucksman, E. (2010). Early heart rate responses to standardized trauma-related pictures predict posttraumatic stress disorder – a prospective study. *Psychosom. Med.* 72, 301–308.

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

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

Swanson, L.W., and Petrovich, G.D. (1998). What is the amygdala? *Trends Neurosci.* 21, 323–331.

T-U-V

Takamori, S., Rhee, J.S., Rosenmund, C., and Jahn, R. (2000). Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature* 407, 189–194.

Takamori, S., Rhee, J.S., Rosenmund, C., and Jahn, R. (2001). Identification of differentiation-associated brain-specific phosphate transporter as a second vesicular glutamate transporter (VGLUT2). *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, RC182.

Takamori, S., Malherbe, P., Broger, C., and Jahn, R. (2002). Molecular cloning and functional characterization of human vesicular glutamate transporter 3. *EMBO Rep.* 3, 798–803.

Tamura, Y., Ozkan, E.D., Bole, D.G., and Ueda, T. (2001). IPF, a vesicular uptake inhibitory protein factor, can reduce the Ca(2+)-dependent, evoked release of glutamate, GABA and serotonin. *J. Neurochem.* 76, 1153–1164.

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

Tasan, R.O., Verma, D., Wood, J., Lach, G., Hörmer, B., de Lima, T.C.M., Herzog, H., and Sperk, G. (2016). The role of Neuropeptide Y in fear conditioning and extinction. *Neuropeptides* 55, 111–126.

Tatti, R., Bhaukaurally, K., Gschwend, O., Seal, R.P., Edwards, R.H., Rodriguez, I., and Carleton, A. (2014). A population of glomerular glutamatergic neurons controls sensory information transfer in the mouse olfactory bulb. *Nat. Commun.* 5, 3791.

Thompson, R.F., and Krupa, D.J. (1994). Organization of memory traces in the mammalian brain. *Annu. Rev. Neurosci.* 17, 519–549.

Trouche, S., Sasaki, J.M., Tu, T., and Reijmers, L.G. (2013). Fear extinction causes target-specific remodeling of perisomatic inhibitory synapses. *Neuron* 80, 1054–1065.

- Tukey, D.S., Lee, M., Xu, D., Eberle, S.E., Goffer, Y., Manders, T.R., Ziff, E.B., and Wang, J. (2013). Differential effects of natural rewards and pain on vesicular glutamate transporter expression in the nucleus accumbens. *Mol. Brain* 6, 32.
- Tully, K., Li, Y., Tsvetkov, E., and Bolshakov, V.Y. (2007). Norepinephrine enables the induction of associative long-term potentiation at thalamo-amygdala synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 14146–14150.
- Turner, B.H., and Herkenham, M. (1991). Thalamoamygdaloid projections in the rat: a test of the amygdala's role in sensory processing. *J. Comp. Neurol.* 313, 295–325.
- Tye, K.M., and Janak, P.H. (2007). Amygdala neurons differentially encode motivation and reinforcement. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 3937–3945.
- Tye, K.M., Stuber, G.D., de Ridder, B., Bonci, A., and Janak, P.H. (2008). Rapid strengthening of thalamo-amygdala synapses mediates cue-reward learning. *Nature* 453, 1253–1257.
- Unal, G., Paré, J.-F., Smith, Y., and Paré, D. (2014). Cortical inputs innervate calbindin-immunoreactive interneurons of the rat basolateral amygdaloid complex. *J. Comp. Neurol.* 522, 1915–1928.
- Uwano, T., Nishijo, H., Ono, T., and Tamura, R. (1995). Neuronal responsiveness to various sensory stimuli, and associative learning in the rat amygdala. *Neuroscience* 68, 339–361.
- Varoqui, H., Schäfer, M.K.H., Zhu, H., Weihe, E., and Erickson, J.D. (2002). Identification of the differentiation-associated Na⁺/PI transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 142–155.
- Vereczki, V.K., Veres, J.M., Müller, K., Nagy, G.A., Rácz, B., Barsy, B., and Hájos, N. (2016). Synaptic Organization of Perisomatic GABAergic Inputs onto the Principal Cells of the Mouse Basolateral Amygdala. *Front. Neuroanat.* 10, 20.
- Verheijen, F.W., Verbeek, E., Aula, N., Beerens, C.E., Havelaar, A.C., Joosse, M., Peltonen, L., Aula, P., Galjaard, H., van der Spek, P.J., et al. (1999). A new gene, encoding an anion transporter, is mutated in sialic acid storage diseases. *Nat. Genet.* 23, 462–465.
- Vertes, R.P. (2004). Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synap. N. Y. N* 51, 32–58.
- Vinatier, J., Herzog, E., Plamont, M. A., Wojcik, S. M., Schmidt, A., Brose, N., ... & Giros, B. (2006). Interaction between the vesicular glutamate transporter type 1 and endophilin A1, a protein essential for endocytosis. *Journal of neurochemistry*, 97(4), 1111-1125.
- Viosca, J., Lopez de Armentia, M., Jancic, D., and Barco, A. (2009). Enhanced CREB-dependent gene expression increases the excitability of neurons in the basal amygdala and primes the consolidation of contextual and cued fear memory. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 16, 193–197.
- Viviani, D., Charlet, A., van den Burg, E., Robinet, C., Hurni, N., Abatis, M., Magara, F., and

Stoop, R. (2011). Oxytocin selectively gates fear responses through distinct outputs from the central amygdala. *Science* 333, 104–107.

Vogel, E., Krabbe, S., Gründemann, J., Wamsteeker Cusulin, J.I., and Lüthi, A. (2016). Projection-Specific Dynamic Regulation of Inhibition in Amygdala Micro-Circuits. *Neuron* 91, 644–651.

Vujanovic, A.A., and Schnurr, P.P. (2017). Editorial overview: Advances in science and practice in traumatic stress. *Curr. Opin. Psychol.* 14, iv–viii.

W

Wallén-Mackenzie, A., Gezelius, H., Thoby-Brisson, M., Nygård, A., Enjin, A., Fujiyama, F., Fortin, G., and Kullander, K. (2006). Vesicular glutamate transporter 2 is required for central respiratory rhythm generation but not for locomotor central pattern generation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 12294–12307.

Wang, W., Liu, Y., Zheng, H., Wang, H.N., Jin, X., Chen, Y.C., Zheng, L.N., Luo, X.X., and Tan, Q.R. (2008). A modified single-prolonged stress model for post-traumatic stress disorder. *Neurosci. Lett.* 441, 237–241.

Wang, Y., Matsuda, S., Drews, V., Torashima, T., Meisler, M.H., and Yuzaki, M. (2003). A hot spot for hotfoot mutations in the gene encoding the delta2 glutamate receptor. *Eur. J. Neurosci.* 17, 1581–1590.

Wang, Z., Kai, L., Day, M., Ronesi, J., Yin, H.H., Ding, J., Tkatch, T., Lovinger, D.M., and Surmeier, D.J. (2006). Dopaminergic control of corticostriatal long-term synaptic depression in medium spiny neurons is mediated by cholinergic interneurons. *Neuron* 50, 443–452.

Wässle, H., Regus-Leidig, H., and Haverkamp, S. (2006). Expression of the vesicular glutamate transporter vGluT2 in a subset of cones of the mouse retina. *J. Comp. Neurol.* 496, 544–555.

Wässle, H., Heinze, L., Ivanova, E., Majumdar, S., Weiss, J., Harvey, R.J., and Haverkamp, S. (2009). Glycinergic transmission in the Mammalian retina. *Front. Mol. Neurosci.* 2, 6.

Watanabe, Y., Ikegaya, Y., Saito, H., and Abe, K. (1995). Roles of GABAA, NMDA and muscarinic receptors in induction of long-term potentiation in the medial and lateral amygdala in vitro. *Neurosci. Res.* 21, 317–322.

Watson, J.B., and Rayner, R. (1920). Conditioned Emotional Reactions. *J. Exp. Psychol.* 3, 1.

Weil-Malherbe, H. (1950). Significance of glutamic acid for the metabolism of nervous tissue. *Physiol. Rev.* 30, 549–568.

Weiskrantz, L. (1956). Behavioral changes associated with ablation of the amygdaloid complex in monkeys. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 49, 381–391.

Wessa, M., and Flor, H. (2007). Failure of extinction of fear responses in posttraumatic stress disorder: evidence from second-order conditioning. *Am. J. Psychiatry* 164, 1684–1692.

Whittle, N., Schmuckermair, C., Gunduz Cinar, O., Hauschild, M., Ferraguti, F., Holmes, A.,

and Singewald, N. (2013). Deep brain stimulation, histone deacetylase inhibitors and glutamatergic drugs rescue resistance to fear extinction in a genetic mouse model. *Neuropharmacology* 64, 414–423.

Wierońska, J.M., Stachowicz, K., Nowak, G., and Pilc, A. (2011). The Loss of Glutamate-GABA Harmony in Anxiety Disorders.

Wilcox, H.C., Storr, C.L., and Breslau, N. (2009). Posttraumatic stress disorder and suicide attempts in a community sample of urban american young adults. *Arch. Gen. Psychiatry* 66, 305–311.

Wilensky, A.E., Schafe, G.E., and LeDoux, J.E. (1999). Functional Inactivation of the Amygdala before But Not after Auditory Fear Conditioning Prevents Memory Formation. *J. Neurosci.* 19, RC48-RC48.

Wilensky, A.E., Schafe, G.E., Kristensen, M.P., and LeDoux, J.E. (2006). Rethinking the fear circuit: the central nucleus of the amygdala is required for the acquisition, consolidation, and expression of Pavlovian fear conditioning. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 12387–12396.

Williams, J. (1997). How does a vesicle know it is full? *Neuron* 18, 683–686.

Wilson, N.R., Kang, J., Hueske, E.V., Leung, T., Varoqui, H., Murnick, J.G., Erickson, J.D., and Liu, G. (2005). Presynaptic Regulation of Quantal Size by the Vesicular Glutamate Transporter VGLUT1. *J. Neurosci.* 25, 6221–6234.

Van Wingen, G., Rijpkema, M., Franke, B., van Eijndhoven, P., Tendolkar, I., Jan Verkes, R., Buitelaar, J., and Fernández, G. (2010). The brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism affects memory formation and retrieval of biologically salient stimuli. *NeuroImage* 50, 1212–1218.

Winter, H.C., and Ueda, T. (1993). Glutamate uptake system in the presynaptic vesicle: glutamic acid analogs as inhibitors and alternate substrates. *Neurochem. Res.* 18, 79–85.

Wojcik, S.M., Rhee, J.S., Herzog, E., Sigler, A., Jahn, R., Takamori, S., Brose, N., and Rosenmund, C. (2004). An essential role for vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) in postnatal development and control of quantal size. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 7158–7163.

Wolff, S.B.E., Gründemann, J., Tovote, P., Krabbe, S., Jacobson, G.A., Müller, C., Herry, C., Ehrlich, I., Friedrich, R.W., Letzkus, J.J., et al. (2014). Amygdala interneuron subtypes control fear learning through disinhibition. *Nature* 509, 453–458.

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

Woodruff, A.R., and Sah, P. (2007). Networks of parvalbumin-positive interneurons in the basolateral amygdala. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 553–563.

Wu, S.-X., Koshimizu, Y., Feng, Y.-P., Okamoto, K., Fujiyama, F., Hioki, H., Li, Y.-Q., Kaneko, T., and Mizuno, N. (2004). Vesicular glutamate transporter immunoreactivity in the

central and peripheral endings of muscle-spindle afferents. *Brain Res.* 1011, 247–251.

Y-Z

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

Yang, M., Lewis, F.C., Sarvi, M.S., Foley, G.M., and Crawley, J.N. (2015). 16p11.2 Deletion mice display cognitive deficits in touchscreen learning and novelty recognition tasks. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 22, 622–632.

Yehuda, R., and LeDoux, J. (2007). Response variation following trauma: a translational neuroscience approach to understanding PTSD. *Neuron* 56, 19–32.

Young, A.W., Aggleton, J.P., Hellawell, D.J., Johnson, M., Brooks, P., and Hanley, J.R. (1995). Face processing impairments after amygdalotomy. *Brain J. Neurol.* 118 (Pt 1), 15–24.

Yu, H., Wang, Y., Pattwell, S., Jing, D., Liu, T., Zhang, Y., Bath, K.G., Lee, F.S., and Chen, Z.-Y. (2009). Variant BDNF Val66Met polymorphism affects extinction of conditioned aversive memory. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 4056–4064.

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

Zander, J.-F., Münster-Wandowski, A., Brunk, I., Pahner, I., Gómez-Lira, G., Heinemann, U., Gutiérrez, R., Laube, G., and Ahnert-Hilger, G. (2010). Synaptic and vesicular coexistence of VGLUT and VGAT in selected excitatory and inhibitory synapses. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 7634–7645.

Zanoveli, J.M., Carvalho, M.C., Cunha, J.M., and Brandão, M.L. (2009). Extracellular serotonin level in the basolateral nucleus of the amygdala and dorsal periaqueductal gray under unconditioned and conditioned fear states: an in vivo microdialysis study. *Brain Res.* 1294, 106–115.

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

Zhang, C-L, Houbaert, X., Lepleux, M., et al. (2015). The hippocampo-amygdala control of contextual fear expression is affected in a model of intellectual disability. *Brain Structure and Function*, vol. 220, 6, 3673-3682.

Zhang, H., Ozbay, F., Lappalainen, J., Kranzler, H.R., van Dyck, C.H., Charney, D.S., Price, L.H., Southwick, S., Yang, B.-Z., Rasmussen, A., et al. (2006). Brain derived neurotrophic factor (BDNF) gene variants and Alzheimer's disease, affective disorders, posttraumatic stress disorder, schizophrenia, and substance dependence. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet. Off. Publ. Int. Soc. Psychiatr. Genet.* 141B, 387–393.

- Zhao, Y., Marín, O., Hermes, E., Powell, A., Flames, N., Palkovits, M., Rubenstein, J.L.R., and Westphal, H. (2003). The LIM-homeobox gene *Lhx8* is required for the development of many cholinergic neurons in the mouse forebrain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 9005–9010.
- Zhou, J., Nannapaneni, N., and Shore, S. (2007). Vesicular glutamate transporters 1 and 2 are differentially associated with auditory nerve and spinal trigeminal inputs to the cochlear nucleus. *J. Comp. Neurol.* *500*, 777–787.
- Zhou, Y., Won, J., Karlsson, M.G., Zhou, M., Rogerson, T., Balaji, J., Neve, R., Poirazi, P., and Silva, A.J. (2009). CREB regulates excitability and the allocation of memory to subsets of neurons in the amygdala. *Nat. Neurosci.* *12*, 1438–1443.
- Zhuang, X., Masson, J., Gingrich, J.A., Rayport, S., and Hen, R. (2005). Targeted gene expression in dopamine and serotonin neurons of the mouse brain. *J. Neurosci. Methods* *143*, 27–32.
- Zoladz, P.R., Fleshner, M., and Diamond, D.M. (2012). Psychosocial animal model of PTSD produces a long-lasting traumatic memory, an increase in general anxiety and PTSD-like glucocorticoid abnormalities. *Psychoneuroendocrinology* *37*, 1531–1545.
- Zola-Morgan, S., Squire, L.R., Clower, R.P., and Alvarez-Royo, P. (1991). Independence of memory functions and emotional behavior: Separate contributions of the hippocampal formation and the amygdala. *Hippocampus* *1*, 207–220.
- Zuber, B., Nikonenko, I., Klauser, P., Müller, D., and Dubochet, J. (2005). The mammalian central nervous synaptic cleft contains a high density of periodically organized complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 19192–19197.

Table des illustrations

FIGURE 1: SCHEMA DE L'ORGANISATION STRUCTURALE D'UN NEURONE FAISANT SYNAPSE.	15
FIGURE 2: STRUCTURE CHIMIQUE DE LA FORME ANIONIQUE DE L'ACIDE GLUTAMIQUE (GLUTAMATE).....	16
FIGURE 3: LE GLUTAMATE DANS LA DISTRIBUTION ALIMENTAIRE DE NOS JOURS.	16
FIGURE 4 : SCHEMA DES PRINCIPALES VOIES FONCTIONNELLES IMPLIQUANT LE GLUTAMATE.....	18
FIGURE 5: ORGANISATION STRUCTURELLE D'UNE SYNAPSE EXCITATRICE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.....	20
FIGURE 6 : SCHEMA DU CYCLE GLUTAMINE-GLUTAMATE.	22
FIGURE 7: SCHEMA D'UNE SYNAPSE GLUTAMATERGIQUE.....	23
FIGURE 8 : SCHEMA DE LA DISTRIBUTION DES TRANSPORTEURS PLASMIQUES DU GLUTAMATE (EAATS) AUTOUR DE SYNAPSES ET PROCHE D'UN VAISSEAU SANGUIN DANS L'HIPPOCAMPE.	29
FIGURE 9 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UNE VESICULE SYNAPTIQUE GLUTAMATERGIQUE.....	31
FIGURE 10 : ALIGNEMENT DES SEQUENCES D'ACIDES AMINES DE VGLUT1, VGLUT2 ET VGLUT3 CHEZ LE RAT.	33
FIGURE 11: ARBRE PHYLOGENETIQUE ILLUSTRANT LA CONSERVATION DU GENE CODANT LES VGLUTS AU COURS DE L'EVOLUTION.....	34
FIGURE 12 : MODELE 3D DE LA STRUCTURE DE VGLUT1 HUMAIN OBTENUE PAR HOMOLOGIE AVEC GLPT, UN TRANSPORTEUR BACTERIEN.	35
FIGURE 13 : DISTRIBUTION DES ARNm DE VGLUT1 ET VGLUT2.....	39
FIGURE 14: DISTRIBUTION PROTEIQUE DE VGLUT1 ET VGLUT2.....	41
FIGURE 15 : DISTRIBUTION DE L'ARNm ET DE LA PROTEINE VGLUT3 DANS LE CERVEAU DE RAT.....	45
FIGURE 16 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU SYSTEME SEROTONINERGIQUE CENTRAL CHEZ L'HOMME.....	48
FIGURE 17 : CO-LOCALISATION DE VGLUT3 ET SERT DANS LE RAPHE DORSAL ET LE RAPHE MEDIAN PAR HYBRIDATION <i>IN SITU</i>	49
FIGURE 18 : LOCALISATION DE VGLUT3, CCK ET GAD OU CB DANS L'HIPPOCAMPE PAR IMMUNOFUORESCNCE.	52
FIGURE 19: LES DIFFERENTES POPULATIONS NEURONALES DU STRIATUM.	54
FIGURE 20: EXPRESSION DE VGLUT3 DANS LES INTERNEURONES CHOLINERGIQUES DU STRIATUM.....	55
FIGURE 21: CO-LIBERATION DE NT ET SYNERGIE VESICULAIRE CHOLINERGIQUE (A) ET SEROTONINERGIQUE (B).	57
FIGURE 22 : MECANISME MOLECULAIRE DE LA SYNERGIE VESICULAIRE.	59
FIGURE 23: SCHEMA DE L'APPAREIL AUDITIF HUMAIN.....	62
FIGURE 24 : REPRESENTATION DE LA FORME EN AMANDE DE L'AMYGDALE BASOLATERALE.	66
FIGURE 25 : NOYAUX DU COMPLEXE AMYGDALIEN CHEZ LE RAT.....	68
FIGURE 26 : DISTRIBUTION DES INTERNEURONES DE L'AMYGDALE.....	70
FIGURE 27 : LES SIX EMOTIONS DE BASE UNIVERSELLES.	73
FIGURE 28 : EXPERIENCE DE WATSON ET RAYNER – « LITTLE ALBERT ».....	76
FIGURE 29 : CLASSIFICATION DES DIFFERENTS TYPES DE MEMOIRES ET LES QUELQUES TACHES COMPORTEMENTALES ASSOCIEES.	79
FIGURE 30 : REPRESENTATION DE LA <i>THEORIE DE LA CONSOLIDATION DE LA MEMOIRE</i> DE MÜLLER ET PILZECKER EN 1900.....	81
FIGURE 31: SCHEMA DES AFFERENCES DE L'AMYGDALE CEREBRALE PROVENANT DE DIVERSES REGIONS CEREBRALES.	83
FIGURE 32: SCHEMA DES EFFERENCES DE L'AMYGDALE CEREBRALE VERS DIVERSES REGIONS CEREBRALES.....	86
FIGURE 33 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA CONNECTIVITE ETABLIE ENTRE LES DIFFERENTS NOYAUX DE L'AMYGDALE.....	89
FIGURE 34 : SCHEMA DES CIRCUITS IMPLIQUES DANS LA PEUR CONDITIONNEE (A) ET L'EXTINCTION DE PEUR (B).	92
FIGURE 35: SCHEMA DES POPULATIONS NEURONALES IMPLIQUEES DANS LA SYNCHRONISATION.	101
FIGURE 36 : LOCUS CIBLE ET ENCADRE PAR LES SITES LoxP SUR LE GENE VGLUT3.	117
FIGURE 37: SCHEMA DU TEST DE L'OPEN FIELD.	124
FIGURE 38 : PHOTO D'UN LABYRINTHE EN CROIX SURELEVE – EPM	124
FIGURE 39 : SCHEMA DU PROTOCOLE DE SENSIBILITE AUX CHOCS ELECTRIQUES.	125
FIGURE 40: SCHEMA DU PROTOCOLE DE PEUR CONDITIONNEE	126
FIGURE 41 : SCHEMA DU PROTOCOLE D'EXTINCTION.	127
FIGURE 42: REPARTITION DE LA DISTRIBUTION DE L'ARNm (A) ET DE LA PROTEINE (B) VGLUT3.	131
FIGURE 43 : DISTRIBUTION DES ARNm DE VGLUT3 ET VIAAT DANS L'AMYGDALE BASOLATERALE.....	133
FIGURE 44 : QUANTIFICATION DU NOMBRE DE NEURONES VIAAT POSITIFS POSSEDANT VGLUT3 PAR RAPPORT A LA POPULATION GLOBALE GABAERGIQUE DANS LA BLA.	134
FIGURE 45 : EXPRESSION DE VGLUT3 DANS LES TERMINAISONS GABAERGIQUES, MONOAMINERGIQUES OU CHOLINERGIQUES DE L'AMYGDALE BASOLATERALE DE SOURIS.	139
FIGURE 46 : QUANTIFICATION DE LA CO-LOCALISATION DE VGLUT3 AVEC LES PROTEINES VIAAT, VMAT2 ET VACHT DANS LES TERMINAISONS NERVEUSES DE L'AMYGDALE BASOLATERALE.	140
FIGURE 47 : EXPRESSION DE VGLUT3 ET DE PV DANS LA BLA.	141
FIGURE 48 : LOCALISATION DE VGLUT3 ET DE CCK DANS LA BLA.....	141
FIGURE 49 : DISTRIBUTION DES TERMINAISONS VGLUT3 POSITIVES DE LA BLA.	145
FIGURE 50 : DISTRIBUTION DE L'ARNm ET DE LA PROTEINE VGLUT3 CHEZ LA SOURIS.....	147

FIGURE 51 : LES SOURIS VGLUT3 ^{-/-} NE PRESENTENT PAS D'HYPERSENSIBILITE AUX CHOCS ELECTRIQUES DELIVRES AUX PATTES.	150
FIGURE 52 : CONDITIONNEMENT DE PEUR CHEZ LES SOURIS VGLUT3 ^{-/-}	152
FIGURE 53 : EXTINCTION DE PEUR CHEZ LES SOURIS VGLUT3 ^{-/-}	154
FIGURE 54 : DISTRIBUTION DE LA PROTEINE VGLUT3 DANS LES DIFFERENTES LIGNEES GENETIQUES.	165
FIGURE 55 : ACTIVITE LOCOMOTRICE SPONTANEE CHEZ LES SOURIS DE LA LIGNEE VGLUT3 ^{FLOX-SERTCRE}	167
FIGURE 56 : ETUDE DU PHENOTYPE ANXIEUX CHEZ LES SOURIS DE LA LIGNEE VGLUT3 ^{FLOX-SERTCRE}	168
FIGURE 57 : CONDITIONNEMENT DE PEUR CHEZ LES SOURIS DE LA LIGNEE VGLUT3 ^{FLOX-SERTCRE}	169
FIGURE 58 : EXTINCTION DE PEUR CHEZ LES SOURIS VGLUT3 ^{FLOX-SERTCRE}	171
FIGURE 59 : ACTIVITE LOCOMOTRICE SPONTANEE CHEZ LES SOURIS DE LA LIGNEE VGLUT3 ^{FLOX-VIAATCRE}	172
FIGURE 60 : ETUDE DU PHENOTYPE ANXIEUX CHEZ LES SOURIS DE LA LIGNEE VGLUT3 ^{FLOX-VIAATCRE}	173
FIGURE 61 : CONDITIONNEMENT DE PEUR CHEZ LES SOURIS DE LA LIGNEE VGLUT3 ^{FLOX-VIAATCRE}	175
FIGURE 62 : EXTINCTION DE PEUR CHEZ LES SOURIS VGLUT3 ^{FLOX-VIAATCRE}	176
FIGURE 63 : ACTIVITE LOCOMOTRICE SPONTANEE CHEZ LES SOURIS DE LA LIGNEE VGLUT3 ^{FLOX-CHATCRE}	177
FIGURE 64 : ETUDE DU PHENOTYPE ANXIEUX CHEZ LES SOURIS DE LA LIGNEE VGLUT3 ^{FLOX-CHATCRE} PAR LE TEST DE L'OPEN FIELD.	178
FIGURE 65 : CONDITIONNEMENT DE PEUR CHEZ LES SOURIS DE LA LIGNEE VGLUT3 ^{FLOX-CHATCRE}	179
FIGURE 66 : EXTINCTION DE PEUR CHEZ LES SOURIS VGLUT3 ^{FLOX-CHATCRE}	180
FIGURE 67 : SCHEMA ILLUSTRANT L'INVALIDATION DE VGLUT3 DANS LES INTERNEURONES GABAERGIQUES VGLUT3 POSITIFS DE LA BLA.	189
FIGURE 68 : SCHEMA ILLUSTRANT L'INVALIDATION DE VGLUT3 DANS LES NEURONES CHOLINERGIQUES VGLUT3 POSITIFS DE LA BLA.	190
FIGURE 69 : SCHEMA ILLUSTRANT L'INVALIDATION DE VGLUT3 PAR LE SYSTEME CRE-LOX.	190
FIGURE 70 : SOURIS VGLUT3 ^{FLOX/FLOX} INJECTEES AVEC LE VIRUS AAV2.9-CRE-GFP OU AAV2.9-GFP DANS LA BLA.	191
FIGURE 71 : ACTIVITE LOCOMOTRICE SPONTANEE CHEZ LES SOURIS INJECTEES DANS LA BLA.	192
FIGURE 72 : ETUDE DU PHENOTYPE ANXIEUX CHEZ LES SOURIS INVALIDEES POUR VGLUT3 DANS LA BLA.	194
FIGURE 73 : CONDITIONNEMENT DE PEUR CHEZ LES SOURIS INVALIDEES POUR VGLUT3 DANS LA BLA.	196
FIGURE 74 : EXTINCTION DE PEUR CHEZ LES SOURIS INJECTEES DANS L'AMYGDALE BASOLATERALE.	198
FIGURE 75 : SOURIS VGLUT3 ^{FLOX/FLOX} INJECTEES AVEC LE VIRUS AAV2.5-CRE-GFP OU AAV2.5-GFP DANS LE BF.	199
FIGURE 76 : ACTIVITE LOCOMOTRICE SPONTANEE CHEZ LES SOURIS INJECTEES DANS LE BF TESTEE EN ACTIMETRIE.	200
FIGURE 77 : ETUDE DU PHENOTYPE ANXIEUX CHEZ LES SOURIS INVALIDEES POUR VGLUT3 DANS LE BF.	201
FIGURE 78 : CONDITIONNEMENT DE PEUR CHEZ LES SOURIS INVALIDEES POUR VGLUT3 DANS LE BF.	202
FIGURE 79 : EXTINCTION DE PEUR CHEZ LES SOURIS INJECTEES DANS LE BF.	204
FIGURE 80 : SCHEMA DE LA SYNAPSE GABAERGIQUE VGLUT3 POSITIVE DANS LA BLA.	213
FIGURE 81 : MODELE DES MECANISMES DE LA VOIE DE LA PEUR ET DE LA VOIE D'EXTINCTION.	219

Table des tableaux

TABLEAU 1: CLASSIFICATION, PROPRIETES ET VOIES DE SIGNALISATIONS DES RECEPTEURS IONOTROPIQUES ET METABOTROPIQUES DU GLUTAMATE.	27
TABLEAU 2: DISTRIBUTION DE L'ARNM DE VGLUT3 ET DE SA PROTEINE DANS LES NEURONES NON-GLUTAMATERGIQUES DU SNC.....	46
TABLEAU 3 : CLASSIFICATION DES NOYAUX DE L'AMYGDALE CEREBRALE.	67
TABLEAU 4 : SONDAS UTILISEES POUR LES HYBRIDATIONS <i>IN SITU</i> FLUORESCENTES.....	120
TABLEAU 5 : ANTICORPS PRIMAIRES UTILISES POUR L'IMMUNOFLUORESCENCE	121
TABLEAU 6 : NOMBRE DE SOURIS UTILISES PAR LIGNEES DANS LES DIFFERENTS TESTS COMPORTEMENTAUX.....	164
TABLEAU 7: COMPARAISON DE LA QUANTIFICATION DES TERMINAISONS VGLUT3 POSITIVES ET DE LA DIMINUTION DE L'EXPRESSION DE VGLUT3 DANS LES DIFFERENTES LIGNEES GENETIQUES DANS L'AMYGDALE.	166

Résumé :

Le trouble de stress post-traumatique (TSPT) est un trouble de type anxieux se déclenchant généralement suite à une expérience traumatisante. Des structures cérébrales telles que le cortex préfrontal, l'hippocampe ou encore l'amygdale, appartenant au réseau impliqué dans l'apprentissage et les mémoires émotionnelles, sont particulièrement altérées. Ce réseau étant extrêmement bien conservé au cours de l'évolution, la mise en place et le maintien des mémoires aversives peut être étudiés chez le rongeur par un paradigme pavlovien de peur conditionnée. Notre équipe a identifié une forte expression du transporteur vésiculaire du glutamate, VGLUT3 dans l'amygdale basolatérale (BLA). VGLUT3, comme les autres transporteurs vésiculaires du glutamate (VGLUTs), permet l'internalisation du glutamate dans les vésicules synaptiques. Il se distingue des autres VGLUTs par sa distribution et ses fonctions atypiques.

Mes travaux de recherche nous ont permis d'identifier les populations neuronales exprimant VGLUT3 dans la BLA, et de définir son rôle dans les processus de mémoires aversives.

La caractérisation anatomique a révélé que : 1/ VGLUT3 est uniquement présent dans une sous-population d'interneurones GABAergiques de la BLA, et 2/ VGLUT3 est exprimé dans les terminaisons cholinergiques et sérotoninergiques de la BLA, permettant d'identifier deux populations de neurones de projections possédant VGLUT3. L'étude du rôle fonctionnel de VGLUT3 a été réalisé par l'utilisation d'une approche génétique couplée à une approche virale pour invalider VGLUT3 dans les terminaisons GABAergiques, sérotoninergiques ou bien cholinergiques. Les souris présentant une inactivation constitutive de VGLUT3 montrent une généralisation au contexte et une extinction rapide. L'inactivation spécifique de VGLUT3 dans la BLA ou dans le cerveau antérieur basal – site d'origine des neurones de projections cholinergiques vers la BLA perturbent également les mémoires aversives, soulignant le rôle spécifique de VGLUT3 dans les réponses modulant la peur à travers sa présence dans l'amygdale basolatérale.

Ces nouvelles données permettront de mieux comprendre le fonctionnement et le rôle de VGLUT3 dans les mémoires émotionnelles, et d'explorer son éventuelle implication dans des troubles de l'anxiété tel le TSPT.

Mots clés : VGLUT3, amygdale, mémoires aversives, peur conditionnée, TSPT.

STUDY OF AN ATYPICAL VESICULAR GLUTAMATE TRANSPORTER TYPE 3 (VGLUT3) IN THE AMYGDALAR NETWORK AND PARTICULARLY IN ACQUIRED FEAR.

Abstract :

Post-Traumatic Stress Disorder (PTSD) is an anxiety-like disorder usually triggered by a traumatic experience. Brain structures such as the prefrontal cortex, the hippocampus or the amygdala belonging to the learning and emotional memories network, are particularly affected. As this network is extremely well conserved during evolution, acquisition and consolidation of aversive memories can be studied by a Pavlovian fear conditioning paradigm in rodents. Our team has identified a strong expression of the vesicular glutamate transporter, VGLUT3 in the basolateral amygdala (BLA). VGLUT3 allows, like all vesicular transporters, neurotransmitter internalization, here the glutamate in synaptic vesicles. VGLUT3 is atypical because of its distribution and its functions.

The aim of my work is to identify the neuronal population expressing VGLUT3 in the amygdala as well as its role in processing aversive memories.

The anatomical characterisation revealed: 1/ VGLUT3 mRNA in BLA GABAergic interneurons, 2/ VGLUT3 protein in cholinergic and serotonergic terminals in the BLA, identifying two populations of projecting neurons expressing VGLUT3. To decipher the functional role of VGLUT3, we used viral and genetic approaches to ablate VGLUT3 either in GABAergic, serotonergic or cholinergic terminals. Mice lacking VGLUT3 constitutively show contextual generalization and rapid extinction. Specific inactivation of VGLUT3 in BLA impairs aversive memories, shedding light on a specific role of VGLUT3 in modulating fear responses through its presence in BLA interneurons.

These new data will be discussed in the context of PTSD and would open a new direction for the development of therapeutic treatment.

Keywords : VGLUT3, amygdala, aversive memories, fear conditioning, PTSD.