

Comprendre les neurones glutamatergiques chez les mammifères : un ménage à trois

Étienne Herzog

Les neurones communiquent entre eux en libérant dans la fente synaptique des neurotransmetteurs préalablement accumulés dans les vésicules synaptiques de leurs terminaisons. Ces transmetteurs chimiques vont alors agir sur leurs récepteurs situés sur les membranes pré- et postsynaptiques. Selon la nature des récepteurs activés, le signal transmis peut être une excitation (dépolariation), une inhibition (hyperpolarisation) ou une modulation (cascade de seconds messagers) du neurone cible.

En 1952, P. Fatt et B. Katz ont montré que la libération de neurotransmetteurs se fait par « paquets », ou *quants* [1], chaque quantum représentant le contenu d'une vésicule synaptique. Pour réaliser la libération quantique, la terminaison met en jeu un système de recyclage, d'une part, des molécules de neurotransmetteurs [2] et, d'autre part, de la membrane vésiculaire [3]. La coordination spatiale et temporelle de cette machinerie est cruciale pour assurer un bon rapport signal/bruit, en particulier lors de stimulations répétées.

Acide aminé endogène, le glutamate est un métabolite ubiquitaire du vivant. Dans le cerveau, c'est également le principal neurotransmetteur excitateur utilisé par au moins 30 % des neurones. La neurotransmission par le glutamate (ou glutamatergique) est ainsi la force motrice dans tous les circuits fonctionnels du système nerveux central (régulations autonomes, boucles sensorimotrices, fonctions cognitives). Par conséquent, nombre de maladies neurologiques et psychiatriques font intervenir la transmission glutamatergique.

L'absence de marqueurs protéiques spécifiques a cependant longtemps freiné l'étude des neurones glutamatergiques [4].

Les trois transporteurs vésiculaires du glutamate

Récemment, trois sous-types de transporteurs vésiculaires du glutamate (VGLUT1, 2 et 3), de séquences très conservées (plus de 70 % d'identité), ont été isolés et caractérisés (*Figure 1*) [5-7]. En remplissant les vésicules synaptiques, ces protéines réalisent une fonction clé pour la sécrétion de glutamate. Elles sont également les premiers marqueurs protéiques spécifiques des cellules glutamatergiques [5-10]. Les VGLUT sont enchassés dans la membrane des vésicules synaptiques par dix domaines transmembranaires (*Figure 1B*).

Les trois VGLUT ont des propriétés biophysiques et pharmacologiques de transport vésiculaire extrêmement proches [5-10]. De plus, des expériences de transfection de cellules ou de neurones non glutamatergiques ont permis d'établir sans ambiguïté que l'expression de VGLUT1 ou de VGLUT2 suffisait pour induire une libération de glutamate [5, 7, 8]. Bien que probable, l'implication directe de VGLUT3 dans la libération de glutamate reste encore à démontrer [7, 10]. En revanche, leur répartition dans le cerveau est très complémentaire (*Figure 1C*). VGLUT1 est exprimé principalement dans les régions les plus corticales du cerveau, qui sont le siège des fonctions cognitives et d'apprentissage moteur, alors que VGLUT2 est localisé dans les neurones glutamatergiques sous-corticaux, qui sont principa-

Department of Molecular Neurobiology, Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Hermann-Rein-Strasse 3, 37075 Göttingen, Allemagne.
herzog@em.mpg.de

lement impliqués dans les circuits sensorimoteurs et de régulation autonome de l'organisme. Chez l'adulte, VGLUT1 et VGLUT2 délimitent donc deux territoires qui couvrent l'ensemble des neurones glutamatergiques historiquement décrits [4]. Au cours du développement, VGLUT2 est présent très précocement et couvre en partie le territoire de VGLUT1, alors que ce dernier ne l'occupe qu'au bout de trois semaines de vie postnatale [11]. VGLUT3 (que nous avons identifié à l'Inserm U.513) présente une expression restreinte à quelques sous-populations de neurones classiquement considérés comme cholinergiques, sérotonergiques ou même GABAergiques. VGLUT3 semble donc définir un système glutamatergique de type modulateur tout à fait inattendu [10].

Si les trois VGLUT sont localisés dans des populations distinctes de neurones, leurs propriétés de remplissage des vésicules synaptiques sont peu différentes et les raisons fonctionnelles de cette diversité restent à déterminer [7].

Rôles respectifs des VGLUT : résultats de l'inactivation du gène codant pour VGLUT1

Le gène codant pour VGLUT1 a récemment été invalidé (*VGLUT1^{-/-}*) dans les laboratoires de R. Edwards (UCSF, San Francisco, USA) et de N. Brose (*Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin*, Göttingen, Allemagne) [12, 13]. Chez les animaux *VGLUT1^{-/-}*, nous avons montré que l'absence de VGLUT1 au cours des trois premières semaines de vie postnatale est en partie compensée par la présence ubiquitaire plus précoce de VGLUT2, les animaux *VGLUT1^{-/-}* ne mourant qu'après 21 jours de vie postnatale, date à laquelle le système VGLUT1 est censé être parfaitement

fonctionnel [11]. Cependant, en appliquant des conditions d'élevage adaptées, l'équipe de R. Edwards a pu maintenir en vie un grand nombre de souris *VGLUT1*^{-/-} bien au-delà de cette limite [12]. À partir du début de la troisième semaine, ces souris présentent un retard global de croissance, un aspect émacié, sont aveugles et semblent présenter des troubles neurologiques moteurs. La mutation entraîne un effondrement de la capacité du cerveau à accumuler le glutamate dans les vésicules synaptiques. Il ne reste que 20 % du transport

vésiculaire de glutamate dans le cerveau antérieur des souris *VGLUT1*^{-/-}. Pourtant, *VGLUT1* ne paraît pas absolument essentiel au maintien des fonctions vitales de l'organisme. *VGLUT2* assurerait donc probablement la majeure partie de la transmission glutamatergique dans les centres nerveux de régulation autonome de l'organisme [7, 9]. Le cerveau des animaux *VGLUT1*^{-/-} ne semble pas être affecté sur le plan morphologique et la mise en place des systèmes 2 et 3 (voir Figure 1C) n'est pas perturbée par l'absence de *VGLUT1* [12, 13].

Sur le plan ultrastructural, ni le nombre, ni la taille des synapses ne sont modifiés, mais une diminution importante du nombre de vésicules synaptiques à la terminaison et l'apparition de structures membranaires tubulovésiculaires atypiques sont observées (Figure 2) [12]. Une telle observation n'a jamais été faite dans les cas d'inactivation des gènes codant pour les transporteurs vésiculaires d'amines. Elle implique une interaction directe de *VGLUT1* avec la machinerie de recyclage ou de biogenèse des vésicules (Figure 2) [12].

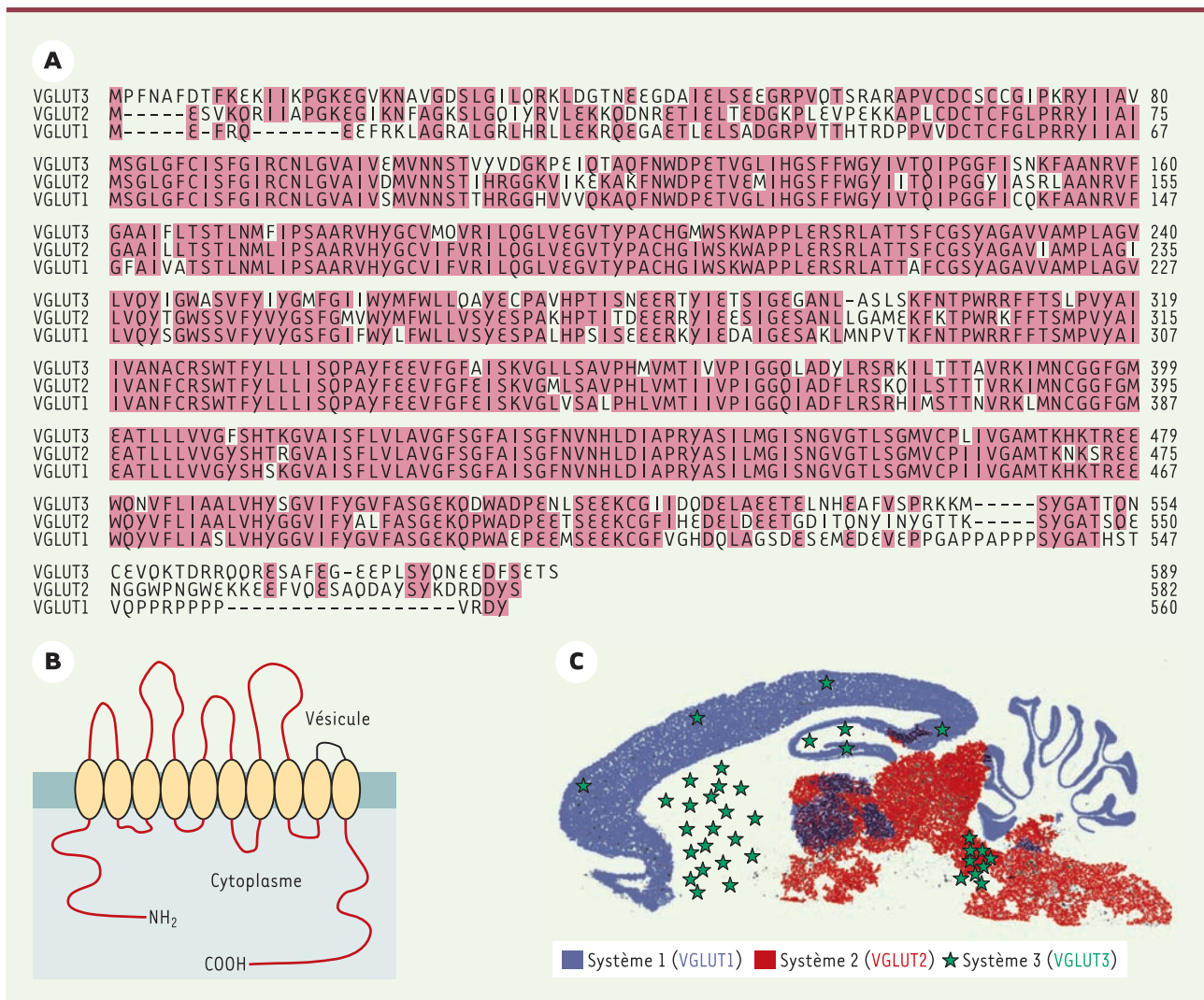


Figure 1. Les transporteurs vésiculaires du glutamate. VGLUT1, VGLUT2 et VGLUT3 sont des protéines de 560 à 589 acides aminés présentant un très fort degré d'identité (A), notamment dans leur partie centrale qui comprend 10 domaines transmembranaires (B). Les parties amino- et carboxy-terminales, très divergentes, sont probablement cytoplasmiques. Les trois gènes présentent des profils d'expression très complémentaires dans le cerveau adulte (hybridation *in situ* des ARN messagers) (C).



VGLUT et contenu en glutamate des vésicules synaptiques

Les activités électrophysiologiques des neurones dépourvus de VGLUT1 ont été étudiées à partir de tranches d'hippocampe et de cervelet [12] ou de cultures unicellulaires de neurones hippocampiques [13]. Comme attendu, une partie des neurones est totalement silencieuse [13], mais une majorité présente une activité synaptique résiduelle [12, 13], vraisemblablement attribuable à l'expression ubiquitaire de VGLUT2 [11]. Cette activité résiduelle présente une forte diminution de l'amplitude du signal, de la fréquence de libération, mais aussi de la taille des quanta. La diminution de l'amplitude correspond à une diminution globale du stock de glutamate libérable, alors que la baisse de fréquence de libération s'explique par l'exocytose de vésicules vides. En effet, le cycle des vésicules synaptiques dans la membrane plasmique, mis en évidence en imagerie dynamique, est normal y compris dans les neurones totalement silencieux [3, 13]. Cette observation, combinée à la diminution du nombre de vésicules [12], suggère que les terminaisons *VGLUT1*^{-/-} ont un

déficit de biogenèse plutôt que de recyclage des vésicules (Figure 2). Il faut noter qu'aucun système de « contrôle qualité » ne semble empêcher les vésicules synaptiques vides de fusionner avec la membrane plasmique [13].

La diminution de la taille des quanta pourrait être expliquée par la diminution du nombre de transporteurs présents sur la vésicule (Figure 2). En effet, des expériences de surexpression de VGLUT1 dans les neurones en culture ont permis de montrer que la taille des quanta peut même être supérieure à la valeur de base [13]. Ces données confirment que les transporteurs vésiculaires de glutamate travaillent en compétition avec une fuite non spécifique du glutamate vers le cytoplasme. Le point d'équilibre entre le chargement et la fuite de glutamate déterminerait la taille du quantum.

La modification de la taille du quantum libérable est l'un des nombreux mécanismes possibles de la plasticité synaptique [1]. La plasticité synaptique correspond à la modulation de la force et de l'efficacité d'une synapse en fonction de son histoire. La régulation de l'expression et/ou de l'adressage vésicu-

laire des VGLUT pourrait donc conduire à une modification de l'efficacité des synapses glutamatergiques. L'interaction originale de VGLUT1 avec la machinerie de trafic membranaire est également en mesure d'altérer les propriétés de libération du glutamate. D'ailleurs, R.T. Fremeau *et al.* ont observé sur tranche d'hippocampe que les synapses VGLUT1 et VGLUT2 positives présentaient des formes différentes de plasticité synaptiques [12], une observation qui n'a pas été confirmée par notre groupe [13]. Ces questions sur les relations entre transport vésiculaire de glutamate et plasticité synaptique devront faire l'objet de nouvelles recherches afin d'être résolues.

Conclusions

L'invalidation du gène codant pour VGLUT1 confirme que la survie d'un mammifère est possible malgré une très forte altération des systèmes cognitifs. Elle pointe également le rôle du système VGLUT2 qui semble contrôler notamment l'excitation de l'ensemble des boucles de régulations vitales pour l'organisme, dès les stades précoces du développement embryonnaire. Elle nous renseigne également sur le rôle intrigant et original de VGLUT1 dans le trafic membranaire à la terminaison. Enfin, ces animaux *VGLUT1*^{-/-} pourraient servir de modèle d'étude de certains phénotypes neurologiques ou psychiatriques au cours desquels une diminution de l'activité excitatrice est suspectée. À n'en pas douter, l'invalidation de VGLUT2 et VGLUT3 seront les prochaines grandes étapes dans la compréhension des systèmes de transmission glutamatergique chez les mammifères. ♦

Understanding glutamatergic neurons in mammals: « un ménage à trois »

RÉFÉRENCES

1. Burgoyne RD, Barclay JW. Splitting the quantum: Regulation of quantal release during vesicle fusion. *Trends Neurosci* 2002; 25: 176-8.
2. Masson J, Sagne C, Hamon M, *et al.* Neurotransmitter transporters in the central nervous system. *Pharmacol Rev* 1999; 51: 439-64.

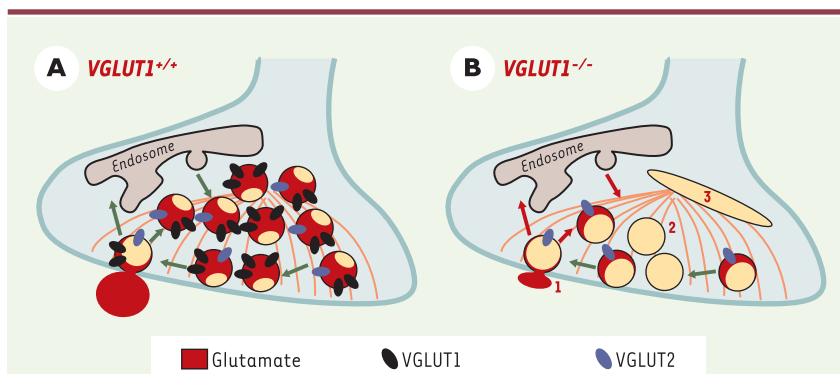


Figure 2. Modèle simplifié de terminaison nerveuse glutamatergique chez la souris. **A.** Pendant les trois premières semaines postnatales, la majorité des synapses glutamatergiques des neurones hippocampiques expriment VGLUT1 et, de façon moindre, VGLUT2. Elles présentent un nombre élevé de vésicules synaptiques chargées en glutamate. **B.** L'invalidation du gène codant pour VGLUT1 (*VGLUT1*^{-/-}) induit une diminution de la quantité de glutamate dans les vésicules (diminution du quantum libérable) (1). Certaines vésicules sont vides, mais peuvent tout de même être exocytées et le nombre de vésicules est considérablement diminué (2). Enfin, des structures tubulovésiculaires apparaissent dans la terminaison, pouvant résulter d'une altération des mécanismes de biogenèse ou de recyclage des vésicules synaptiques (3).

3. Galli T, Martinez-Arca S, Paumet F. Mécanisme de la fusion membranaire. *Med Sci (Paris)* 2002; 8: 1113-9.

4. Ottersen OP, Hjelle OP, Osen KK, et al. Amino acid transmitters in the rat nervous system. In: Paxinos G, ed. London: Academic Press-Elsevier, 1995: 1017-37.

5. Takamori S, Rhee JS, Rosenmund C, et al. Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature* 2000; 407: 189-94.

6. Bellocchio EE, Reimer RJ, Fremeau RT, et al. Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science* 2000; 289: 957-60.

7. Fremeau RT, Voglmaier S, Seal RP, et al. VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. *Trends Neurosci* 2004; 27: 98-103.

8. Takamori S, Rhee JS, Rosenmund C, et al. Identification of differentiation-associated brain-specific phosphate transporter as a second vesicular glutamate transporter (VGLUT2). *J Neurosci* 2001; 21: RC182.

9. Herzog E, Belenchi GC, Gras C, et al. The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J Neurosci* 2001; 21: RC181.

10. Gras C, Herzog E, Belenchi GC, et al. A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J Neurosci* 2002; 22: 5442-51.

11. Miyazaki T, Fukaya M, Shimizu H, et al. Subtype switching of vesicular glutamate transporters at parallel fibre-Purkinje cell synapses in developing mouse cerebellum. *Eur J Neurosci* 2003; 17: 2563-72.

12. Fremeau RT, Kam K, Qureshi T, et al. Vesicular glutamate transporters 1 and 2 target to functionally distinct synaptic release sites. *Science* 2004; 304: 1815-9.

13. Wojcik SM, Rhee JS, Herzog E, et al. An essential role for vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) in postnatal development and control of quantal size. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 7158-63.

NOUVELLE

L'amaurose congénitale de Leber: les rétinol-déshydrogénases au banc des accusés

Isabelle Perrault, Sylvain Hanein, Josseline Kaplan

Inserm U.393, Handicaps génétiques de l'enfant, Hôpital Necker-Enfants Malades, 149, rue de Sèvres, 75743 Paris Cedex 15, France.
kaplan@necker.fr

> Il est désormais admis que l'amaurose congénitale de Leber (ACL) [MIM 204000] [1, 2] est la dystrophie rétinienne la plus sévère et la plus précoce puisqu'elle est responsable de cécité ou de malvoyance profonde néonatale. Nous avons démontré récemment que, sous ce vocable, se distinguaient deux groupes de maladies déterminées génétiquement, se transmettant à une exception près selon le mode récessif autosomique [3]. Le premier groupe correspond à la description faite par A. Sorsby et C.E. Williams qui n'hésitaient pas à parler d'«aplasie rétinienne» [4]. Nous avons effectivement retrouvé cette entité chez des individus atteints d'une forme très sévère, très précoce et non évolutive dans laquelle l'atteinte des cônes est prédominante. Cette forme est désignée par, selon la terminologie anglo-saxonne, *cone-rod dystrophy*. Le second groupe correspond à l'extrémité d'un spectre de gravité des rétinopathies pigmentaires et est constitué d'individus souffrant d'une dystrophie, certes sévère, mais plus progressive, débutant par une atteinte des bâtonnets (*rod*) et désignée selon la même terminologie par *rod-cone dystrophy* [5]. Pour les deux groupes, les critères cliniques d'inclusion

du diagnostic sont un nystagmus congénital à grandes oscillations, une absence de poursuite oculaire, des signes digito-oculaires ainsi qu'un fond d'œil normal à la naissance qui contraste avec un ERG (électrorétinogramme) plat, témoignant d'une atteinte des deux types de photorécepteurs. La distinction entre les deux groupes cliniques se fait à la fin de la première année de vie et repose essentiellement sur: (1) l'étude du comportement de l'enfant à la

lumière; (2) l'aspect de la rétine; (3) les données précoces de la réfraction; et (4) l'acuité visuelle (Figure 1). Jusqu'à une période très récente, 10 gènes codant pour l'ACL étaient localisés et 7 identifiés: *GUCY2D* [MIM 600179], *RPE65* [MIM 180069], *CRX* [MIM 600225], *AIPL1* [MIM 604392], *RPGRIP1* [MIM 605446], *CRB1* [MIM 604210], *TULP1* [602280], *LCA3* [MIM 604232] en 14q24, *LCA5* [MIM 604537] en 6q11-16 et *LCA9* en 1p36 [MIM 608553]. Ces gènes sont

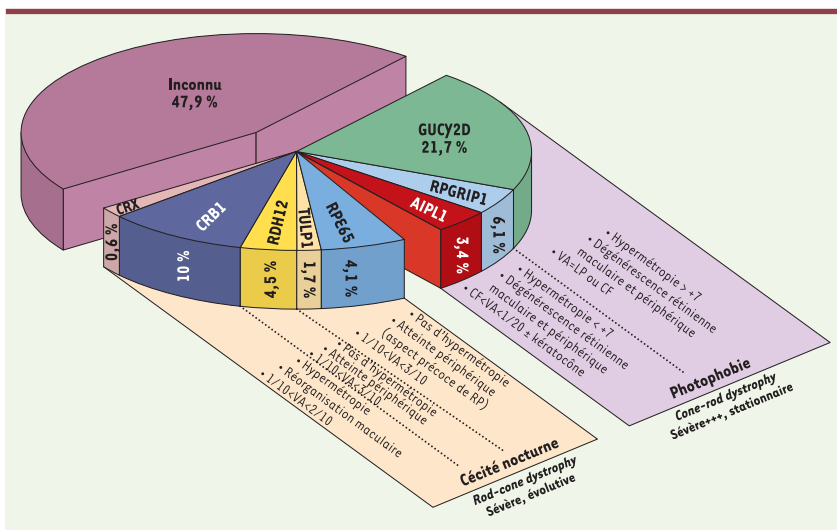


Figure 1. Représentation graphique des corrélations génotype-phénotype établies pour l'amaurose congénitale de Leber et fréquence de l'implication de chaque gène responsable de la maladie.