

**Université de Strasbourg**  
Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Thèse  
soutenue publiquement le 28 septembre 2011

présentée par  
**Marie Kneib**

En vue d'obtenir le grade de  
Docteur de l'Université de Strasbourg  
Discipline : Neurosciences

**ETUDE FONCTIONNELLE D'UN CIRCUIT INHIBITEUR DU CORTEX  
CEREBELLEUX DE LA SOURIS  
IMPORTANCE POUR LA PHYSIOPATHOLOGIE DES RETARDS MENTAUX**



Ramon y Cajal

**Composition du Jury**

Dr. Yannick Bailly	Examineur
Dr. Yann Humeau	Directeur de thèse
Dr. Alain Marty	Rapporteur
Dr. Christophe Mulle	Rapporteur
Pr. Rémy Schlichter	Examineur

## Remerciements

---

*Le travail présenté dans ce manuscrit a été réalisé à l'Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives dirigé par le Dr. Marie-France Bader, au sein de l'équipe du Dr. Bernard Poulain, « Physiologie de la neurotransmission ». Je les remercie tous les deux pour leur accueil et leur soutien durant ces quatre années de master et de doctorat et tient à leur faire part de toute mon admiration.*

*Je souhaite remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, se sont impliquées dans ce projet et dans l'élaboration du présent manuscrit. Merci aux membres du jury pour le temps qu'ils ont consacré à l'examen de mon travail de thèse.*

*Un immense merci à Yann Humeau, pour les qualités qui font de lui un chouette directeur de thèse, pour son enthousiasme, sa bonne humeur et sa motivation résistant à toutes les épreuves, pour son sens de l'humour et surtout sa disponibilité. Je lui souhaite une bonne continuation avec sa nouvelle équipe « Synapse in Cognition » et une heureuse vie familiale.*

*Je remercie l'ensemble de l'équipe « Physiologie de la Neurotransmission » et en particulier Fred G. et Malik, avec qui j'ai passé de nombreux moments, et pas uniquement à la paillasse. Merci pour votre enseignement et vos conseils les gars ! Merci à Philippe pour sa gentillesse et son professionnalisme, et à mes collègues en thèse Antoine, Laetitia, Joseph, Virginie.*

*Merci au personnel du bâtiment, à Laurette et Christophe et en particulier à Denis pour leur sympathie et leur disponibilité devant des chercheurs souvent exigeants. Merci à l'équipe de l'animalerie qui s'occupe si bien de nos petites bêtes, à mes interlocuteurs privilégiés Sophie, Nicolas, Laurence et Daniel.*

*Merci à vous, PaulK et Petra, de m'avoir donné l'enthousiasme d'enseigner. J'ai réellement apprécié ces 3 années auprès des étudiants de Licence, ce fut une expérience très enrichissante. J'en profite pour saluer l'ensemble des enseignants de la composante de Biologie Animale.*

*Merci à l'équipe DoctoNeuro pour tous les projets réalisés auprès du grand public : le Téléthon, la Fête de la Science, la Semaine du Cerveau ainsi que les WE et les bons moments passés ensemble ; au comité d'organisation du Forum BIOTechno 2011 et en particulier à Daniel et Emilie, avec qui j'ai passé de nombreuses journées à préparer cet évènement qui fut pour moi une grande source de motivation.*

*A mes amis du « Club des Habités de la Cafète », Guy, Anne-Marie, Nancy, Coco, Steph et Steph, je demande de me garder une place au chaud pour les repas d'hiver, je ne serais pas loin ! Je les remercie, ainsi que tous les autres et en particulier Malika, Xavier, Aurore, Christian et Anastasia, Etienne, Michaël L., Sercan, Anne-So, Fanny, Héloïse et Clément et ma famille dans son vaste ensemble.*

*Et pour finir, merci à ceux qui me sont le plus cher. En premier lieu bien sur Michaël, mais également Leslie, Domitille, Jenny, Stéphanie et Fabrice, Elodie et Yannick, qui m'ont encouragée et apporté leur soutien en toutes circonstances.*

*Un grand merci à vous tous pour ces quatre belles années.*

## Liste des publications

---

### PUBLICATION 1

**IL1RAPL1 controls inhibitory networks during cerebellar development in mice.**

Frédéric Gambino<sup>1,#</sup>, Marie Kneib<sup>1,#</sup>, Alice Pavlowsky<sup>2</sup>, Henriette Skala<sup>2</sup>, Stéphane Heitz<sup>1</sup>, Nicolas Vitale<sup>1</sup>, Bernard Poulain<sup>1</sup>, Malik Khelifaoui<sup>1,2</sup>, Jamel Chelly<sup>2</sup>, Pierre Billuart<sup>2</sup> and Yann Humeau<sup>1</sup>

# This two authors contributed equally to the work.

***Eur J Neurosci. 2009 Oct;30(8):1476-86.***

### PUBLICATION 2

**Zebrin-II banding controls GABAergic inhibition in the mouse cerebellum.**

Marie Kneib<sup>1,#</sup>, Frédéric Gambino<sup>1,4,#</sup>, Antoine Valera<sup>1</sup>, Héroïse Cruveiller<sup>1</sup>, JD Rothstein<sup>2</sup>, Philippe Isope<sup>1,†</sup> and Yann Humeau<sup>1,3†</sup>

#,† These two authors contribute equally to the work, respectively.

***The Journal of Neuroscience (en préparation).***

### PUBLICATION 3

**In vivo evidence that TRAF4 is required for CNS myelin homeostasis and down-regulates MAG-/Nogo-A-induced NgR/p75NTR/RhoA signaling pathway.**

Sébastien Blaise<sup>1</sup>, Marie Kneib<sup>3</sup>, Adrien Rousseau<sup>1</sup>, Frédéric Gambino<sup>3</sup>, Marie-Pierre Chenard<sup>2</sup>, Martine Muckensturm<sup>2</sup>, Fabien Alpy<sup>1</sup>, Catherine Tomasetto<sup>1</sup>, Yann Humeau<sup>3,4</sup> and Marie-Christine Rio<sup>1</sup>

***The American Journal of Pathology (soumis).***

## Liste des abréviations

---

<b>ACSF</b>	<i>Artificial cerebrospinal fluid</i> : milieu extracellulaire utilisé en condition contrôle.
<b>AMPA</b>	<i>2-amino-3-(5-methyl-3-oxo-1,2-oxazol-4-yl)propanoic acid</i> : agoniste des récepteurs ionotropiques AMPA/kainate.
<b>CM</b> <b>ML</b>	Couche moléculaire : couche superficielle du cortex cérébelleux. <i>Molecular layer</i>
<b>CAM</b>	<i>Cell-surface adhesion molecules</i> : protéines impliquées dans l'adhésion entre cellules ou avec la matrice extracellulaire.
<b>CaM</b>	<i>Calmodulines (calcium-modulated protein)</i> : protéines liant le calcium, régulatrices de différentes fonctions cellulaires.
<b>CP</b> <b>PC</b>	Cellule de Purkinje <i>Purkinje cell</i>
<b>CCG</b> <b>IGL</b>	Couche des cellules granulaires : couche la plus interne du cortex cérébelleux. <i>Internal granular layer</i>
<b>CCP</b> <b>PCL</b>	Couche des cellules de Purkinje : couche intermédiaire du cortex cérébelleux. <i>Purkinje cell layer</i>
<b>CG</b> <b>GC</b>	Cellule granulaire <i>Granule cell</i>
<b>DSI</b>	<i>Depolarization-induced suppression of inhibition</i> : réduction de la libération de neurotransmetteur inhibiteur présynaptique provoquée par la dépolarisation de l'élément postsynaptique
<b>EAAT4</b>	<i>Excitatory amino-acid transporter 4</i> : transporteur de recapture du glutamate.
<b>Et</b> <b>SC</b>	Cellule étoilée <i>Stellate cell</i>
<b>FFI</b>	« <i>Feedforward inhibition</i> » : activation d'un neurone inhibiteur par un neurone excitateur qui contactent tous les deux la même cible.
<b>GAD-67</b>	<i>Glutamic acid decarboxylase 67</i> : enzyme qui catalyse la décarboxylation du glutamate en GABA.
<b>GABA</b>	<i>gamma-Aminobutyric acid</i> : agoniste des récepteurs GABA <sub>A</sub> et GABA <sub>B</sub>
<b>GlyT2</b>	<i>Glycine transporter 2</i> : transporteur de recapture de la glycine.
<b>IL1RAPL1</b>	<i>Interleukin-1 receptor accessory protein-like 1</i>

<b>LTP / LTD</b>	Potentialisation / dépression à long terme : augmentation / diminution durable de l'efficacité de la transmission synaptique. <i>Long term potentiation / depression</i>
<b>mGluR</b>	Récepteur métabotrope du glutamate <i>Metabotropic glutamatergic receptor</i>
<b>MLI</b>	<i>Molecular layer interneuron</i> : interneurone de la couche moléculaire (cellules étoilées et cellules en panier).
<b>NCS-1</b>	<i>Neuronal calcium sensor-1</i> : protéine régulant la phosphorylation dépendante du calcium
<b>NMDA</b>	<i>N-Methyl-D-aspartic acid or N-Methyl-D-aspartate</i> : agoniste des récepteurs ionotropiques NMDA glutamatergiques.
<b>NPC DCN</b>	Noyaux profonds cérébelleux <i>Deep cerebellar nuclei</i>
<b>Pa BC</b>	Cellule en panier du cervelet Basket cell
<b>PA AP</b>	Potentiel d'action <i>action potential</i>
<b>FP PF</b>	Fibre parallèle <i>Parallel fibre</i>
<b>PTX</b>	Picrotoxine : antagoniste du récepteur GABA <sub>A</sub>
<b>s/e IPSC</b>	Courant postsynaptique inhibiteur spontané/évoqué <i>spontaneous/evoked inhibitory postsynaptic current</i>
<b>s/e EPSC</b>	Courant postsynaptique exciteur spontané/évoqué <i>spontaneous/evoked excitatory postsynaptic current</i>
<b>SNARE</b>	<i>SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) receptor</i>
<b>RMLX XLMR</b>	Retard mental lié au chromosome X <i>X-linked mental retardation</i>
<b>ZII</b>	Zébrine-II
<b>ZII+/ZII-</b>	Bande zébrine-II positive / bande zébrine-II négative

## Table des figures

---

<b>Figure 1:</b> Section parasagittale de cervelet.	2
<b>Figure 2 :</b> Macro-anatomie du cervelet.	3
<b>Figure 3 :</b> Schéma présentant l'organisation spatiale du cortex cérébelleux adulte.	5
<b>Figure 4 :</b> Organisation des projections des cellules en panier.	7
<b>Figure 5 :</b> Evolution de la morphologie des noyaux profonds.	8
<b>Figure 6 :</b> Afférences et efférences du cortex cérébelleux.	11
<b>Figure 7 :</b> Schéma simplifié des connexions synaptiques entre les principaux neurones cérébelleux.	13
<b>Figure 8 :</b> Maturation des cellules de Purkinje chez le rongeur.	19
<b>Figure 9 :</b> Neurotransmission dans les synapses chimiques.	22
<b>Figure 10 :</b> Le cycle des vésicules synaptiques dans l'élément présynaptique.	23
<b>Figure 11 :</b> La fonction des SNAREs dans la maturation des vésicules synaptiques.	25
<b>Figure 12 :</b> Les canaux calciques dans la transmission synaptique.	26
<b>Figure 13 :</b> Compartimentalisation des afférences et efférences du cortex cérébelleux.	31
<b>Figure 14 :</b> Expression de différentes zébrines, en bandes parasagittales dans le cervelet.	32
<b>Figure 15 :</b> Prévalence des retards mentaux.	37
<b>Figure 16 :</b> Exemples d'anomalies synaptiques rencontrées lors d'un retard mental.	42
<b>Figure 17 :</b> La superfamille des récepteurs IL1/Toll.	45
<b>Pub.1 Fig.1:</b> Characterization of IL1RAPL1 KO mice.	52
<b>Pub.1 Fig.2 :</b> NCS-1 expression and localization are not perturbed in the absence of IL1RAPL1.	53
<b>Pub.1 Fig.3 :</b> Disinhibition of DCN neurons in young IL1RAPL1 KO animals.	54
<b>Pub.1 Fig.4 :</b> Aberrant inhibition onto Purkinje neurons in P10/P14 IL1RAPL1 KO mice.	54
<b>Pub.1 Fig.5 :</b> Giant sIPSC arise through developmentally regulated firing activity of ML interneurons.	55
<b>Pub.1 Fig.6 :</b> Parallel fibre-mediated recruitment of ML interneurons is increased in the absence of IL1RAPL1.	56
<b>Pub.1 Fig.7 :</b> Giant sIPSCs shape the firing pattern of Purkinje cells.	57
<b>Pub.1 Fig.Sup.1 :</b> Characterization of GABAergic inhibition received by deep cerebellar nuclei (DCN) neurons in mouse sagittal acute slices.	60
<b>Pub.1 Fig.Sup.2 :</b> Characterization of GABAergic inhibition received by Purkinje cells.	61

<b>Pub.1 Fig.Sup.3</b> : Effects of depolarization-induced suppression of inhibition (DSI) in our experimental conditions. _____	61
<b>Pub.1 Fig.Sup.4</b> : No difference in quantal size between IL1RAPL1 WT and KO animals. _	62
<b>Figure 18</b> : Les cellules de Purkinje reçoivent deux types de signaux inhibiteurs. _____	65
<b>Figure 19</b> : Mise en place des composantes rapides et lentes au cours du développement. _____	67
<b>Figure 20</b> : Les évènements inhibiteurs rapides et lents correspondent à des contacts synaptiques somatiques et dendritiques respectivement. _____	69
<b>Figure 21</b> : Deux populations distinctes d'IPSCs en termes de cinétique sont évoquées par la stimulation distincte de deux populations d'interneurones. _____	71
<b>Figure 22</b> : Les IPSCs lents reçus par la cellule de Purkinje contribuent à la population spontanée alors que les évènements rapides contribuent à la population de miniatures. 74	
<b>Figure 23</b> : L'activité spontanée de la cellule étoilée est sous contrôle d'une conductance excitatrice. _____	74
<b>Figure 24</b> : Recrutement du feedforward inhibiteur en tranche transversale de cervelet. 77	
<b>Figure 25</b> : Il existe un gradient radial de l'activité dans la couche moléculaire. _____	78
<b>Figure 26</b> : Approche expérimentale de l'étude de l'activité des interneurones de la couche moléculaire en fonction des bandes zébrines. _____	81
<b>Figure 27</b> : Les bandes zébrines positives et négatives reçoivent une activité inhibitrice spontanée similaire. _____	83
<b>Figure 28</b> : Caractéristiques des sIPSCs reçus par les cellules de Purkinje dans les bandes zébrine négatives. _____	84
<b>Figure 29</b> : Caractéristiques des sIPSCs reçus par les cellules de Purkinje dans les bandes zébrine positives. _____	84
<b>Figure 30</b> : Caractéristiques des sIPSCs reçus par les cellules de Purkinje en frontière de bandes. _____	86
<b>Figure 31</b> : Les cellules en panier ont une organisation des projections qui est différente entre les bandes zébrine-positives et zébrine-négative. _____	86

# Table des matières

---

REMERCIEMENTS

LISTE DES PUBLICATIONS

LISTE DES ABREVIATIONS

TABLE DES FIGURES

TABLE DES MATIERES

PREAMBULE

PREMIERE PARTIE : INTRODUCTION	1
1. Le cervelet	1
1.1. Généralités sur le cervelet	1
1.1.1. Rappels historiques	1
1.1.2. Anatomie globale du cervelet adulte	3
1.2. Organisation anatomo-fonctionnelle du cervelet adulte	4
1.2.1. Composition cellulaire du cortex cérébelleux	4
<i>Les cellules de Purkinje</i>	5
<i>Les cellules granulaires</i>	6
<i>Les interneurons de la couche moléculaire : cellules en panier et cellules étoilées</i>	7
1.2.2. Les noyaux profonds cérébelleux	8
1.2.3. Les pédoncules cérébelleux : afférences et efférences	9
<i>Les afférences du cervelet</i>	10
<i>Les efférences du cervelet</i>	12
1.2.4. Le circuit cérébelleux	12
<i>Le circuit corticocérébelleux</i>	13
<i>Importance physiologique des interneurons de la couche moléculaire</i>	14
1.3. Maturation du cervelet et des contacts synaptiques	17
1.3.1. Maturation du cervelet et de différents types cellulaires	17
<i>Maturation des cellules de Purkinje</i>	18
<i>Maturation des cellules granulaires</i>	20
<i>Maturation des interneurons inhibiteurs</i>	20
1.3.2. Synapse et synaptogenèse	21
<i>Principe général de la neurotransmission</i>	21
<i>Elément présynaptique, trafic des vésicules et libération des neurotransmetteurs</i>	22
<i>Elément postsynaptique, récepteurs ionotropiques et métabotropiques</i>	26
<i>Synaptogenèse dans le système nerveux central</i>	28
1.4. Organisation modulaire du cervelet	29
1.4.1. Compartimentalisation des afférences et efférences du cervelet	30
1.4.2. Marqueurs moléculaires au patron « zébré »	31
1.4.3. Compartimentalisation des interneurons de la couche moléculaire	33
1.5. Grandes fonctions du cervelet	34
1.5.1. Fonctions motrices du cervelet	34
1.5.2. Fonctions cognitives du cervelet	35



2. Etude d'un cas pathologique : le retard mental	36
2.1. Généralités : définition et diagnostique	37
2.2. La génétique des retards mentaux : particularité du chromosome X	39
2.3. Système nerveux central et retard mental	40
2.3.1. Hypothèse synaptique du retard mental	41
<i>Anomalies morphologiques des dendrites et épines dendritiques</i>	41
<i>Anomalies du développement du système nerveux</i>	43
<i>Conséquences envisagées sur le fonctionnement neuronal</i>	43
2.3.2. Implication de il1rapl1 dans le fonctionnement synaptique	44
<i>Il1rapl1 et son implication dans les troubles mentaux</i>	44
<i>Interactions d'il1rapl1 avec des protéines synaptiques et conséquences de son invalidation</i>	45
DEUXIEME PARTIE : RESULTATS	47
1. Déséquilibre de la balance excitation / inhibition dans le cervelet en développement en l'absence de la protéine IL1RAPL1.	47
1.1. Publication 1 : IL1RAPL1 controls inhibitory networks during cerebellar development in mice	48
1.1.1. Abstract	49
1.1.2. Introduction	49
1.1.3. Material and methods	50
1.1.4. Results	51
<i>Disinhibition of DCN neurons in young IL1RAPL1 KO mice</i>	51
<i>Aberrant inhibition onto Purkinje neurons in P10-P12 IL1RAPL1 KO mice</i>	51
<i>Giant sIPSC arise through developmentally regulated firing activity of MLIs</i>	52
<i>PF-mediated recruitment of MLIs is facilitated in the absence of IL1RAPL1</i>	54
<i>Giant sIPSCs shape the firing pattern of PCs</i>	55
1.1.5. Discussion	56
1.1.6. References	58
2. Physiologie des interneurones de la couche moléculaire	62
2.1. Identification de deux entrées inhibitrices distinctes sur les cellules de Purkinje	63
2.1.1. Analyse cinétique des sIPSCs enregistrés au niveau des corps cellulaires des cellules de Purkinje	64
2.1.2. Evolution des évènements inhibiteurs au cours du développement	66
2.1.3. Séparation pharmacologique des entrées GABAergiques somatiques et dendritiques	68
2.1.4. Analyse cinétique des IPSCs évoqués par la stimulation de deux groupes de cellules en fonction de leur localisation dans la couche moléculaire	69
2.2. Activité des interneurones de la couche moléculaire en tranche aigue	71
2.2.1. Contribution des cellules étoilées et des cellules en panier à l'activité inhibitrice spontanée et miniature reçue par la cellule de Purkinje	71
2.2.2. Les cellules étoilées et les cellules en panier n'expriment pas le même patron d'activité	77
2.3. Organisation des interneurones de la couche moléculaire par rapport aux bandes zébrine	79

2.3.1. Approche méthodologique _____	80
2.3.2. Analyse qualitative et quantitative des IPSCs reçus par les cellules de Purkinje en fonction des bandes zébrine. _____	81
2.3.3. Analyse de l'organisation latérale des connexions à la frontière entre deux bandes parasagittales. _____	85
<b>TROISIEME PARTIE : DISCUSSION GENERALE _____</b>	<b>86</b>
1. Validité des modèles et méthodes d'étude _____	87
1.1. Le modèle animal pour mimer la physiologie humaine _____	87
1.2. La tranche aiguë de cervelet dans le contexte du retard mental _____	89
1.3. Utilisation des paramètres synaptiques dans l'étude des circuits neuronaux ____	93
2. Importance de l'activité neuronale pendant le développement _____	94
3. Physiologie et rôles des interneurons de la couche moléculaire _____	96
3.1. La cinétique des IPSCs enregistrés sur les PCs permet d'identifier les interneurons de la couche moléculaire _____	97
3.2. La cellule en panier est susceptible de participer à l'organisation latérale de l'inhibition du cortex cérébelleux _____	97
<b>BIBLIOGRAPHIE _____</b>	<b>99</b>

## Préambule

---

Mon projet de thèse s'inscrit dans la thématique globale de notre équipe qui s'intéresse à la physiologie de la neurotransmission, ceci majoritairement par le biais de l'étude électrophysiologique du système cérébelleux. Le projet porté par mon directeur de thèse le docteur Yann Humeau concerne plus spécifiquement les physiopathologies du système nerveux central, associées en particulier à des troubles d'ordre cognitifs rencontrés chez des individus présentant un retard mental à l'échelle humaine. Ainsi une première partie de mes travaux aura été de tester l'hypothèse de l'origine synaptique des retards mentaux en étudiant un exemple de cas pathologique : la conséquence de l'inactivation du gène *il1rap1* sur la physiologie du cervelet et en particulier sur la cellule de Purkinje. Dans ce but, j'ai dans un deuxième temps également été amenée à aborder des questions de physiologie cérébelleuse purement fondamentale. Cette seconde étude m'aura permis de mieux comprendre mon modèle d'étude : la connectivité des interneurons de la couche moléculaire avec les cellules de Purkinje. J'ai par cette approche abordé la vaste question du fonctionnement du cervelet, qui est basé sur une organisation modulaire et une architecture cellulaire stéréotypée sur toute la largeur du folium.

L'introduction du présent manuscrit se divise en deux grandes sections. La première présente mon modèle d'étude, le cervelet, et la deuxième qui présente le retard mental, la pathologie que j'ai étudiée. La notion de synapse et le principe de la neurotransmission seront brièvement abordés pour donner au lecteur toutes les clés de la compréhension des résultats. Aux vu des deux axes de ma thèse, les résultats sont séparés en deux sections, la première est une publication scientifique ([Publications 1](#)) et la seconde présente les données qui feront l'objet d'une deuxième publication ([Publications 2](#)), actuellement en préparatio. Une discussion générale sur la validité des modèles et méthodes utilisés, l'influence de l'activité synaptique durant le développement et l'importance des interneurons de la couche moléculaire dans le fonctionnement du cervelet clôturera le manuscrit. L'ensemble de mon travail s'ouvre sur plusieurs perspectives que j'aborderai dans cette dernière partie.

## PREMIERE PARTIE : INTRODUCTION

# 1. Le cervelet

Pour effectuer un geste simple comme attraper un objet, commander aux muscles de se contracter ou de se relâcher ne suffit pas. Car pour que les différents segments du bras se déploient avec harmonie afin d'atteindre une cible précise, il faut qu'un « chef d'orchestre » interne puisse régler avec précision l'enchaînement et la durée des mouvements élémentaires. Ce chef d'orchestre, c'est le cervelet.

Le cervelet, et en particulier le cortex cérébelleux, est l'une des régions du système nerveux central qui possède le modèle d'organisation le mieux décrit. Son apparente simplicité, due principalement à son organisation géométrique unique, a rendu les études expérimentales fines possibles et a attiré de nombreux chercheurs intéressés par la compréhension du développement et de la physiologie du système nerveux.

## 1.1. Généralités sur le cervelet

### 1.1.1. Rappels historiques

Costanzo Varolio (1543–1575) fut en 1573 l'un des premiers anatomistes à disséquer et décrire le cervelet humain de manière rigoureuse. Ses travaux permirent dans un premier temps de représenter l'anatomie externe du cervelet, ainsi que certaines des structures étroitement liées comme le pont, encore appelé « pont de Varole ». Au XVIII<sup>e</sup> siècle, Vincenzo Malacarne (1744–1816) publia le premier ouvrage entièrement dédié au cervelet, décrivant le cortex cérébelleux et les noyaux profonds de manière bien plus détaillée que tous ses prédécesseurs.

Mais l'aboutissement à une fidèle description anatomique du cervelet suscita des théories diverses quant à sa fonction, théories qui divisaient les chercheurs de l'époque. Par exemple, en 1838 le phrénologue allemand Franz Joseph Gall (1757-1828) le considérait comme l'organe de la sexualité. Ce n'est que plus tard, grâce à l'expérimentation sur l'animal, que l'étude de la fonction du cervelet fut menée de manière « scientifique ». Luigi Rolando (1773-1831) identifia les symptômes moteurs qui suivaient la lésion du cervelet. Cette approche, reprise et confirmée par Pierre Flourens (1794–1867), amena ce dernier à démontrer que la production et la coordination des mouvements sont deux phénomènes distincts et qu'ils sont localisés dans deux

structures également distinctes : la coordination dans le cervelet et la production dans la moelle épinière et du bulbe rachidien.

C'est à la même époque, en 1837, que Jan Evangelista Purkinje (1787-1869) identifia grâce à des techniques de microscopie rudimentaires le premier « élément biologique unitaire » sur du tissu humain de cervelet. Plusieurs décennies plus tard, c'est en affinant la technique d'imprégnation argentine mise au point par Camillo Golgi (1843 – 1926) que Santiago Ramon y Cajal (1852-1934) contribua de façon décisive à la théorie neuronale, stipulant que les neurones sont des unités fonctionnelles autonomes comportant un corps cellulaire, un axone et des dendrites. En parallèle, il décrivit et représenta de manière remarquable les éléments qui composent le cortex cérébelleux ainsi que ses principales afférences (Figure 1).

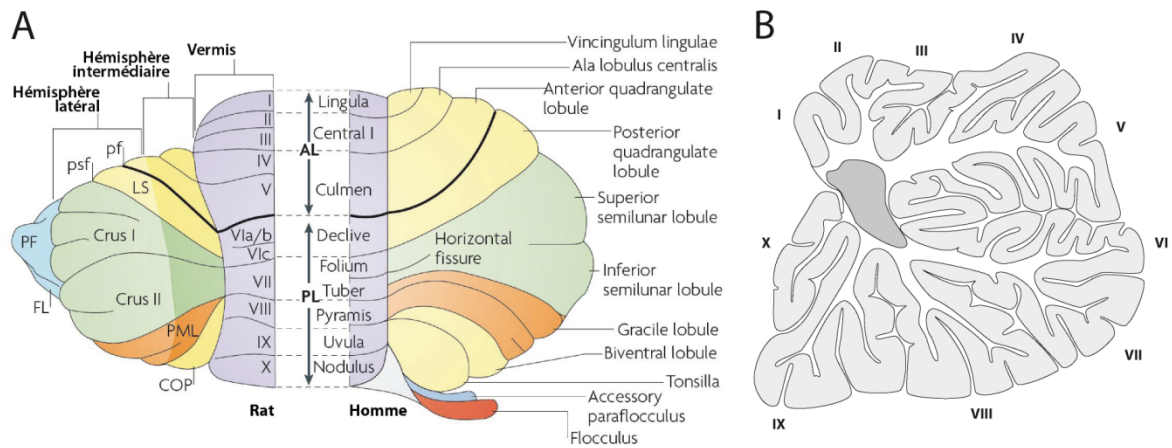


**Figure 1: Section parasagittale de cervelet.**

Cette illustration datée de 1894 a été réalisée par Ramon y Cajal pour une conférence de l'Académie des Sciences Médicales de Catalogne. Elle représente les principaux types neuronaux du cortex cérébelleux : cellules de Purkinje, cellules en panier, cellules étoilées, cellules de Golgi, cellules granulaires, ainsi que les fibres afférentes : fibres grimpantes et fibres moussues, en respectant leur organisation spatiale. Les points correspondent aux fibres parallèles, qui projettent de manière orthogonale à la coupe et qui sont donc coupées dans ce type de sections. Conservée à l'Institut de Neurobiología "Ramón y Cajal", Madrid, Spain.

Au début du XX<sup>e</sup> siècle, Lodewijk Bolk (1866–1930) fit progresser la connaissance en anatomie comparée du cervelet sur 69 espèces différentes, lui permettant de mettre en évidence une organisation générale commune découpée en quatre divisions anatomiques : les vermis antérieur et postérieur, séparés par la fissure primaire, ainsi que deux hémisphères en position latérale, de part et d'autre du vermis. Nous lui devons également la base de la nomenclature actuelle qui sera en partie reprise par Olof Larsell (1886–1964) sous la forme de dix lobules vermiens (de I à X) (Figure 2).

C'est par les techniques d'électrophysiologie, que John Carew Eccles (1903 - 1997) fournit pour la première fois, en 1967, un tableau complet de l'architecture fonctionnelle du cortex cérébelleux. Il identifia la nature excitatrice ou inhibitrice de chacun des types cellulaires et ouvrit la voie à plusieurs décennies de grandes découvertes dans le domaine de la physiologie neuronale générale (pour revue sur l'histoire du cervelet : Glickstein et al., 2009).



**Figure 2 : Macro-anatomie du cervelet.**

**A) Vue dorsale simplifiée du cervelet adulte de rat sur la gauche et humain sur la droite, comparant les deux nomenclatures : sur la gauche, les lobules vermiens sont annotés selon la classification de Larsell et sur la droite selon celle de Bolk. Les trois compartiments longitudinaux sont indiqués : le vermis et les hémisphères intermédiaires et latéraux. AL : lobe antérieur, COP : copula pyramidis, Crus I et II : lobule aniforme, FL : flocculus, LS : lobule simplex, PF : paraflocculus, PL : lobe postérieur, PML : lobule paramédian, pf : fissure primaire, psf : fissure postérieure. D'après Apps et Hawkes, 2009. B) Coupe parasagittale du cervelet de singe présentant les dix lobules vermiens selon la classification de Larsell. D'après Altman et Bayer, 1997.**

### 1.1.2. Anatomie globale du cervelet adulte

Malgré son nom latin signifiant « petit cerveau » et bien qu'il n'occupe que 10% de la boîte crânienne, le cervelet comporte à lui seul plus de la moitié des neurones du cerveau entier (Kandel et al., 2000). C'est une structure symétrique, située en position dorsale centrale, en arrière du tronc cérébral, sous le lobe occipital et trouvant son origine à la jonction entre le mésencéphale et le rhombencéphale. Il est rattaché au reste du système nerveux par les pédoncules cérébelleux, qui constituent l'ensemble des fibres afférentes et efférentes du cervelet. De par son évolution phylogénétique, le cervelet des mammifères est devenu une structure d'apparence plissée, organisé à la fois dans le sens transversal (encore appelé horizontal ou médiolatéral) et dans le sens longitudinal (c'est-à-dire antéropostérieur, rostocaudal ou encore parasagittal) (Figure 2). Dans le sens médiolatéral, il est constitué d'une zone centrale appelée vermis, bordée par l'extension de deux hémisphères cérébelleux composés eux-mêmes d'une partie intermédiaire et d'une partie latérale, et de deux excroissances en position ventrale appelées flocculi. Selon l'axe antéropostérieur, le cervelet est divisé en 3 lobes : le lobe antérieur en avant de la fissure primaire, le lobe postérieur en arrière de celle-ci et le lobe flocculonodulaire en arrière de la fissure postérolatérale. Ces lobes sont eux-mêmes subdivisés en dix lobules vermiens numérotés de I à X et plusieurs centaines de

sous-lobules. D'un point de vue architectural, le cervelet est organisé en un cortex cérébelleux de substance grise, qui englobe un cœur de substance blanche traversée par les afférences et efférences et dans laquelle sont localisés les noyaux profonds cérébelleux (Altman et Bayer, 1997; Herrup et Kuemerle, 1997).

## **1.2. Organisation anatomo-fonctionnelle du cervelet adulte**

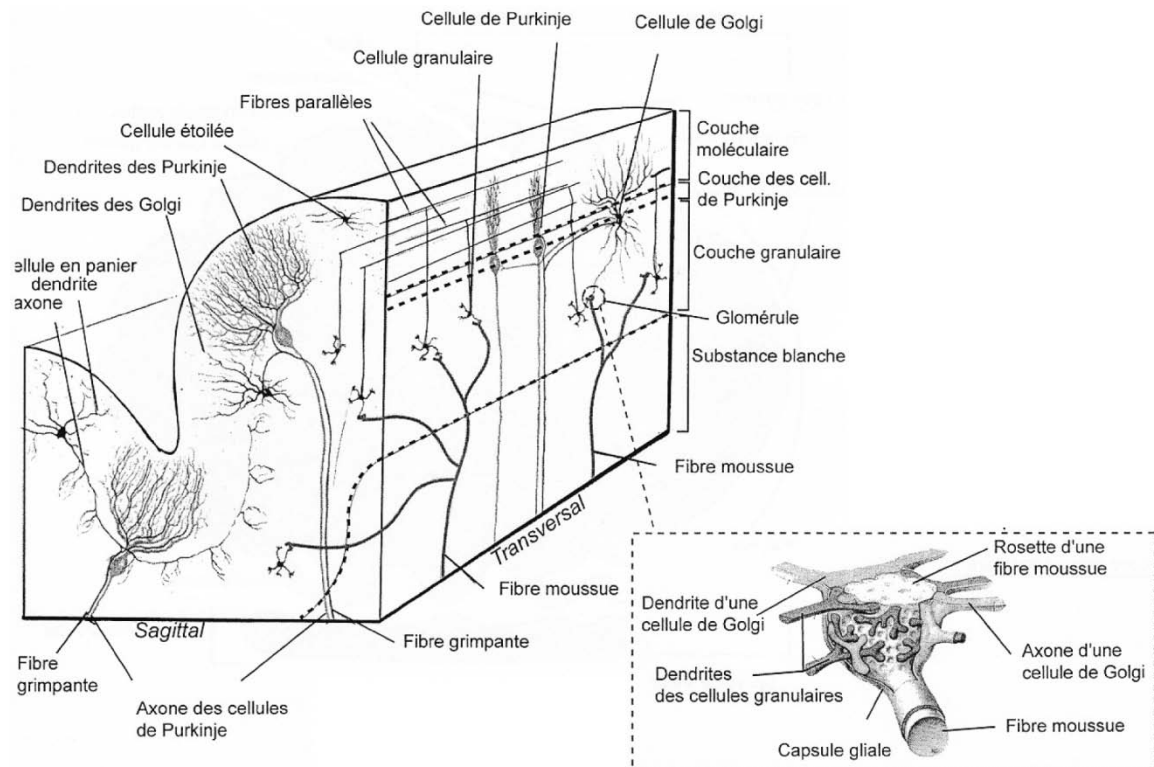
Le cervelet est divisé en deux structures singulières : le cortex cérébelleux en périphérie du folium et la substance blanche en profondeur, contenant des noyaux de substance grise appelés les noyaux profonds cérébelleux ou encore noyaux gris centraux (Figure 3). Le cortex cérébelleux présente une structure trilaminaire. La couche la plus superficielle, localisée directement sous la pie-mère est la couche moléculaire. Celle-ci possède une faible densité cellulaire, mais n'en est pas moins intéressante en termes de connectivité. Elle contient deux types d'interneurones : les cellules étoilées et les cellules en panier, ainsi que les axones des cellules en grain, l'arborisation dendritique des cellules de Purkinje et les terminaisons axonales des afférences olivaires. La couche la plus profonde, la couche granulaire interne, qui est également la structure la plus dense de tout l'encéphale, contient les somas des cellules en grain ainsi qu'une partie de leur axone, les cellules de Golgi et les terminaisons des fibres moussues. A l'interface entre ces deux couches sont répartis les somas des cellules de Purkinje en une monocouche appelée la couche des cellules de Purkinje. Les cellules de Purkinje contactent les noyaux profonds cérébelleux via leur axone qui traverse la couche granulaire pour atteindre la substance blanche (Palay et Chan-Palay, 1974).

### **1.2.1. Composition cellulaire du cortex cérébelleux**

Le cortex cérébelleux est composé de huit types neuronaux, dont six avaient déjà été identifiés par Cajal en 1911 (Figure 3) : les cellules de Purkinje, les cellules de Golgi, les cellules de Lugaro, les cellules granulaires, les cellules en panier, les cellules étoilées et les deux types cellulaires dernièrement identifiés : les cellules unipolaires en brosse (Mugnaini et Floris, 1994) et les cellules en candélabre (Lainé et Axelrad, 1994). Deux de ces types cellulaires sont excitateurs glutamatergiques, les cellules granulaires et les cellules unipolaires en brosse, les autres types sont tous inhibiteurs, GABAergiques ou glycinergiques. Du point de vue de la répartition, les cellules unipolaires en brosse sont majoritairement représentées dans les lobules postérieurs IX et X du cortex cérébelleux, alors que les sept autres types cellulaires expriment un patron régulier le long des



différents lobules. L'arrangement strict des neurones et de leurs prolongements confère au cervelet une organisation tridimensionnelle répétitive, stéréotypée, qui s'est avérée être fondamentale pour la compréhension des propriétés mêmes des neurones, ainsi que de leur connectivité (Palay et Chan-Palay, 1974).



**Figure 3 : Schéma présentant l'organisation spatiale du cortex cérébelleux adulte.**

**Le cortex cérébelleux est une structure trilaminar, composée de la couche moléculaire en superficie, de la couche des cellules de Purkinje et de la couche granulaire en profondeur. La couche moléculaire contient les dendrites des cellules de Purkinje, les fibres grimpantes, les fibres parallèles et les interneurones étoilés et en panier ; la couche des cellules de Purkinje contient les somas des cellules de Purkinje ; et la couche granulaire interne contient les cellules en grain, les cellules de Golgi et les fibres moussues. Au dessous de ces trois couches s'étend la substance blanche cérébelleuse. Encadré : les fibres moussues ainsi que les axones de cellules de Golgi contactent les dendrites des cellules en grain dans une formation particulière appelée « glomérule ». D'après Carpenter, 1991.**

### *Les cellules de Purkinje*

Les cellules de Purkinje sont d'impressionnants interneurones GABAergiques, parmi les plus volumineux du système nerveux. En effet, chez le rongeur, le diamètre de leur soma peut atteindre jusque 30 µm de diamètre et leur arborisation dendritique s'étendre sur plus de 300 µm de longueur et de largeur. Le segment primaire de leur arborisation dendritique émerge verticalement en direction de la surface à partir du soma. Ce segment se divise en plusieurs (généralement deux) dendrites secondaires, qui se ramifient en une multitude de fins dendrites tertiaires suivant une hiérarchie

dichotomique. Contrairement aux dendrites primaires et secondaires qui sont lisses, les dendrites tertiaires sont recouverts d'une multitude d'épines dendritiques (Altman et Bayer, 1997). L'arborisation dendritique de ces cellules de Purkinje occupe toute la hauteur de la couche moléculaire. Elle est ramifiée dans 2 directions de l'espace en suivant un axe orthogonal à la surface du folium, c'est-à-dire organisée en un plan parasagittal. Cette orientation particulière permet à la cellule de Purkinje d'intégrer l'information provenant de tout le cortex cérébelleux et en particulier des fibres parallèles (environ 175 000 contacts sur chaque cellule de Purkinje (Napper et Harvey, 1988)). Un axone unique, myélinisé, prend naissance dans le sens opposé de celui du dendrite primaire. Cet axone peut produire des collatérales dans la couche granulaire interne, remontant vers les cellules de Purkinje voisines (Larramendi et Lemkey-Johnston, 1970; Orduz et Llano, 2007), les cellules de Golgi ou les cellules en panier (Bishop et al., 1993) pour y faire synapse. Les cibles de l'axone principal sont les neurones des noyaux profonds, qui reçoivent uniquement cette entrée inhibitrice spontanément rythmique, en partie entretenue par une activité pacemaker intrinsèque de la cellule de Purkinje (Gähwiler, 1976; Häusser et Clark, 1997).

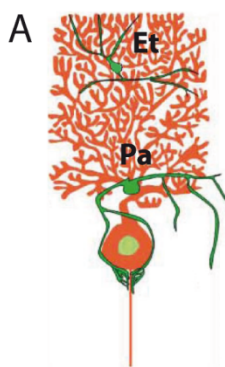
### *Les cellules granulaires*

Les cellules granulaires, autrefois appelés neurones en grain, sont les plus petits, mais de loin les plus nombreux neurones du cortex cérébelleux (2,4 millions par mm<sup>3</sup> chez le macaque, (Fox et Barnard, 1957)). Elles présentent un soma de faible volume, couronné de trois à cinq courts dendrites formant chacun une extrémité crochue, chacune étant en contact avec une terminaison des fibres moussues, le tout formant une structure appelée « glomérule » (Jakab et Hámori, 1988) (Figure 3). Le premier segment de leur axone traverse verticalement la couche granulaire ainsi que la couche des cellules de Purkinje en direction de la surface du folium. Au niveau de la couche moléculaire, celui-ci se divise en « T » pour former un segment secondaire selon un axe transversal, c'est-à-dire longitudinal au folium, communément appelé la fibre parallèle. Les fibres parallèles ont un diamètre approximatif de 0,2 µm, ne sont pas myélinisées et courent sur une longueur de plusieurs millimètres, pouvant varier en fonction des espèces (Altman et Bayer 1997). Chaque fibre parallèle contacte des centaines de neurones qu'elle rencontre sur son passage : cellules de Purkinje, cellules de Golgi, interneurones de la couche moléculaire, et forme des synapses excitatrices glutamatergiques dites « en passant » au niveau de leurs dendrites. La nature glutamatergique du neurotransmetteur impliqué à ces synapses n'a été que récemment confirmée (Ottersen et al., 1992).

*Les interneurones de la couche moléculaire : cellules en panier et cellules étoilées*

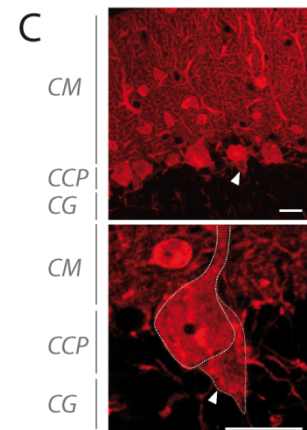
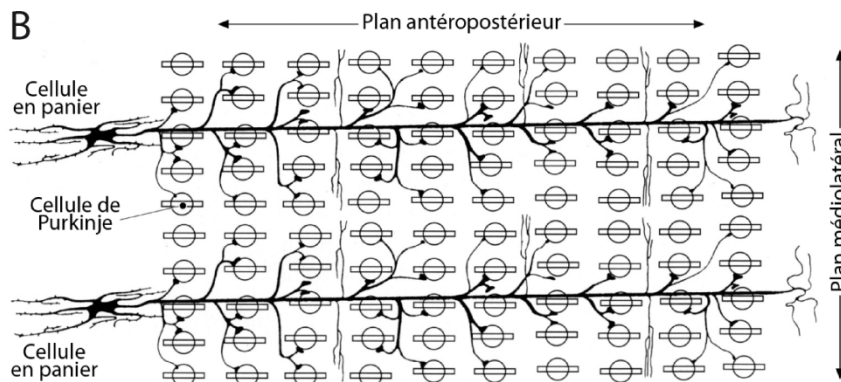
Au sein de la couche moléculaire, on distingue historiquement deux types d'interneurones inhibiteurs, les cellules en panier et les cellules étoilées, que l'on regroupe sous le terme d'interneurones de la couche moléculaire. Ces interneurones ont des morphologies différentes, mais ont des propriétés fonctionnelles qui seraient moins distinctes. De ce fait, certains auteurs pensent que les cellules en panier et les cellules étoilées ne formeraient qu'un seul et même type cellulaire (Sultan et Bower, 1998; Spatkowski et Schilling, 2003; Schilling et al., 2008). Nous nous proposons de tester ce dernier point dans la [Publication 2](#).

Le soma des cellules en panier se situe dans le premier tiers inférieur de la couche moléculaire (Figure 4A). Leurs dendrites sont ascendants et répartis dans un plan parasagittal, de la même manière que ceux des cellules de Purkinje. L'axone (Figure 4B) contacte plusieurs cellules de Purkinje alignées dans le sens parasagittal, par un long segment principal rectiligne. Des ramifications de cet axone principal entourent le soma des cellules de Purkinje dans un « panier », chacune se terminant par une synapse géante en contact avec le cône d'émergence de l'axone de la cellule de Purkinje, appelée la synapse en pinceau (Ango et al., 2004) (Figure 4C). D'autre part, de fines collatérales secondaires s'étendent au niveau des premières et deuxièmes rangées de cellules de Purkinje voisines (Figure 4B).



**Figure 4 : Organisation des projections des cellules en panier.**

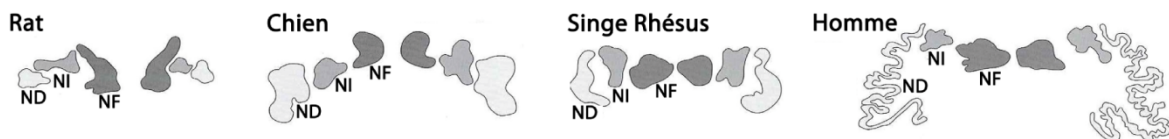
**A) Schéma représentant la position des cellules étoilées (Et) et des cellules panier (Pa). D'après Ango et al., 2004. B) Schéma représentant la distribution des branchements axonaux de deux cellules en panier sur les cellules de Purkinje (les cercles représentent le soma et les rectangles l'arborisation dendritique), vu du dessus. D'après Altman et Bayer, 1997. C) Immuno-marquage dirigé contre la parvalbumine sur des coupes parasagittales de cervelet, permettant de mettre en évidence la synapse en pinceau (têtes de flèches) barres d'échelle 20 µm, CM : couche moléculaire, CCP : couche des cellules de Purkinje, CG : couche granulaire.**



Les somas des cellules étoilées sont plus petits que ceux des cellules en panier. Ils arborent un grand nombre de courts dendrites organisés en un plexus. On les retrouve dans les deux tiers supérieurs de la couche moléculaire (Figure 4A). Leur axone, également orienté dans le sens parasagittal, contacte des portions lisses des dendrites tertiaires des cellules de Purkinje (Altman et Bayer, 1997).

### 1.2.2. Les noyaux profonds cérébelleux

Les noyaux profonds cérébelleux sont d'une importance capitale dans le fonctionnement du circuit cérébelleux puisqu'ils sont le seul intermédiaire entre le cortex cérébelleux, où le message nerveux est intégré par les cellules de Purkinje, et le reste du cerveau. Chez les mammifères, la classification moderne reconnaît trois noyaux profonds différents, localisés dans la substance blanche et alignés selon un axe médiolatéral : le noyau fastigial, le noyau interposé (divisé en un noyau globuleux et un noyau emboliforme) et le noyau dentelé (également appelé noyau latéral). Un quatrième noyau, le noyau vestibulaire, constitue la quatrième et dernière cible des efférences du cortex cérébelleux et peut à ce titre être considéré comme un noyau profond cérébelleux, bien qu'il soit localisé dans le bulbe rachidien.



**Figure 5 : Evolution de la morphologie des noyaux profonds.** Représentation schématique des noyaux profonds cérébelleux de quatre espèces différentes. Les principaux changements morphologiques touchent le noyau dentelé chez l'humain, qui passe d'une structure en « masse » à une structure convolutive. ND : noyau dentelé, NI : noyau interposé, NF : noyau fastigial. D'après Altman et Bayer, 1997.

Lorsque l'on compare phylogénétiquement la morphologie des noyaux profonds chez des espèces allant du rat à l'homme (Figure 5), on constate que le noyau fastigial et le noyau interposé présentent une forme et un volume comparables entre les espèces (relativement au poids de ces espèces). En revanche, le noyau dentelé va se développer différemment, avec un volume qui devient de plus en plus grand et une morphologie plus élaborée et complexe. Ceci est relié à la faramineuse évolution des hémisphères cérébelleux chez les mammifères supérieurs, qui projettent principalement vers le noyau dentelé, impliquant que ces deux structures ont évolué conjointement (Altman et Bayer, 1997).

Les neurones qui composent les noyaux profonds ont été moins étudiés que ceux du cortex cérébelleux, toutefois ces dernières années ils suscitent un intérêt grandissant de la part des chercheurs. Pour revue, un état des connaissances a été fait par le groupe de Knöpfel en 2010 (Uusisaari et Knöpfel, 2010). On distingue quatre groupes de neurones, dont deux sont excitateurs et deux inhibiteurs, identifiés selon leur morphologie et la nature de leur neurotransmetteur : les gros neurones GAD-67 (glutamic acid decarboxylase-67) négatifs, les petits neurones GAD-67 négatifs qui sont tous deux supposés être glutamatergiques, les GAD-67 positifs qui sont GABAergiques et les GlyT2 positifs qui sont glycinergiques. Des enregistrements *in vitro* et *in vivo* de ces types de neurones révèlent qu'un type sur les quatre, les GlyT2 positifs, ne présente pas d'activité rythmique spontanée, contrairement aux trois autres (Uusisaari et Knöpfel, 2010).

Les afférences des noyaux profonds ne sont pas toutes équivalentes. Trois des types neuronaux cités ci-dessus sont des neurones de projection : les gros neurones glutamatergiques (GAD-67 négatifs) qui contactent les aires cérébrales prémotrices, les neurones glycinergiques qui contactent le cortex cérébral et une fraction des cellules GABAergiques qui contacte l'olive inférieure. Les petits interneurones glutamatergiques (GAD-67 négatifs) et la deuxième fraction de neurones GABAergiques sont des interneurones locaux, qui établissent des connexions à l'intérieur des noyaux profonds. En ce qui concerne les afférences, chacun de ces neurones est contacté par les cellules de Purkinje, par contre tous ne sont pas contactés par les deux autres types d'afférences connues. En effet, les gros et les petits neurones glutamatergiques ainsi que les interneurones GABAergiques locaux reçoivent des entrées des collatérales des fibres grimpantes et moussues ; les neurones GABAergiques de projection reçoivent des afférences uniquement des collatérales des fibres grimpantes ; et les cellules glycinergiques sont susceptibles de n'être contactées que par les interneurones locaux.

### **1.2.3. Les pédoncules cérébelleux : afférences et efférences**

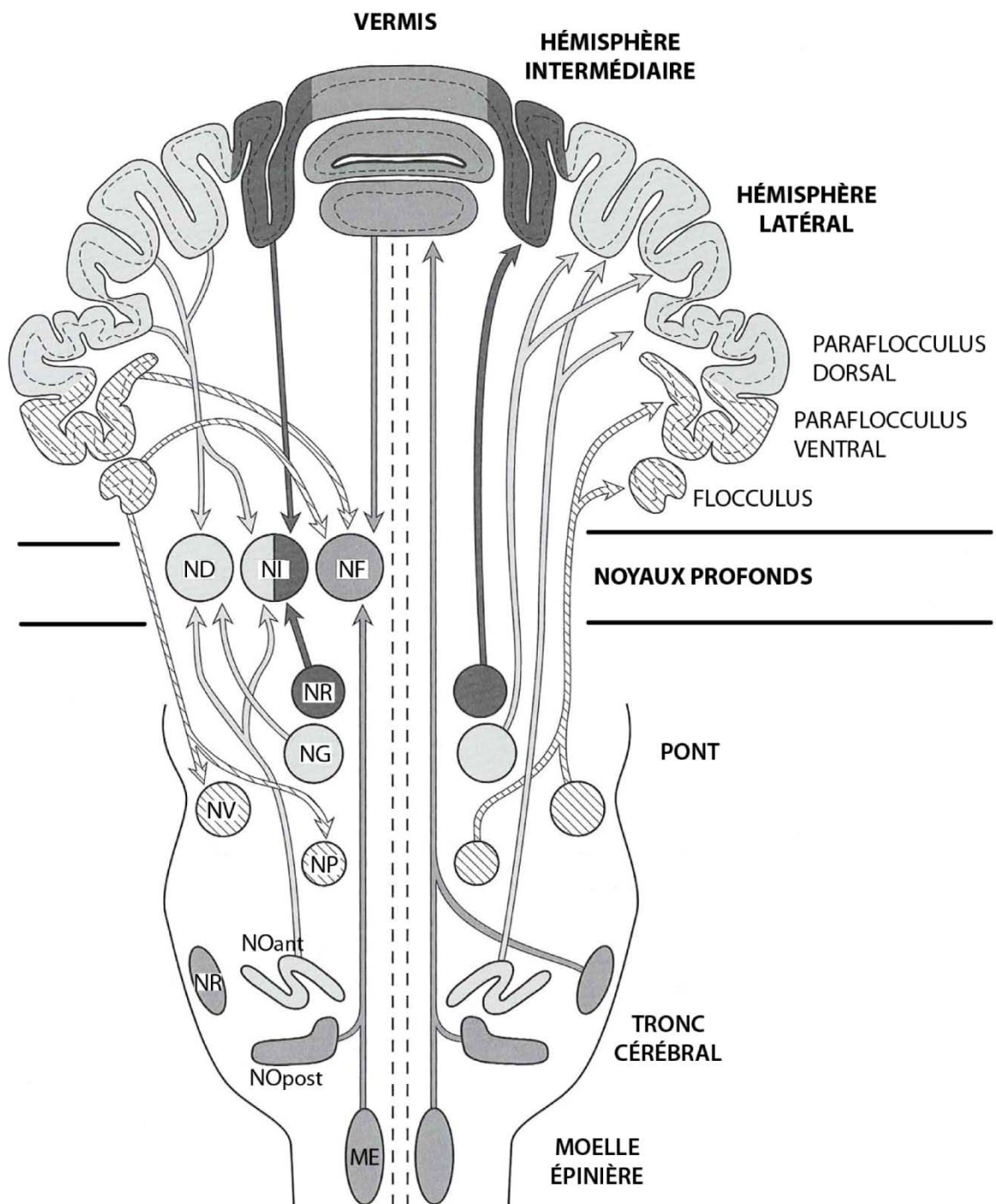
Le cervelet est attaché au pont de Varole par un cordon de substance blanche divisé en trois paires de faisceaux, les pédoncules cérébelleux inférieur, moyen et supérieur. Les fibres afférentes et efférentes qui constituent ces faisceaux sont réparties de la manière suivante : les pédoncules cérébelleux inférieurs relient le cervelet au bulbe rachidien et contiennent des fibres afférentes provenant de l'olive inférieure (Campbell et Armstrong, 1983), des noyaux vestibulaires, de la moelle épinière et du tegmentum mésencéphalique, ainsi que certaines fibres efférentes en direction des noyaux vestibulaires et de la formation réticulée. Les pédoncules cérébelleux moyens relient le

cervelet au pont. La grande majorité des fibres qui y transitent sont des afférences du pont, relayant des informations du cortex cérébral et des colliculi supérieurs. Les pédoncules cérébelleux supérieurs relient le cervelet au mésencéphale. Ils sont presque uniquement constitués de fibres efférentes provenant des noyaux profonds, en direction de structures extracérébelleuses.

### *Les afférences du cervelet*

Il existe deux voies d'entrée dans le cervelet : les fibres grimpantes et les fibres moussues. Les fibres grimpantes correspondent aux axones des neurones de l'olive inférieure bulbaire controlatérale (Eccles et al., 1966a) (Figure 6). Chaque fibre grimpante remonte le long de l'axone d'une cellule de Purkinje, de sorte que chacune de ces cellules ne soit innervée que par une seule fibre grimpante chez l'adulte. Du fait que ces fibres afférentes soient bien moins nombreuses que les cellules de Purkinje présentes dans le cervelet, il a été démontré qu'elles forment des branchements capables de contacter plusieurs cellules de Purkinje (Scheibel et Scheibel, 1955). La terminaison de la fibre grimpante contacte les dendrites primaires et secondaires de la cellule de Purkinje en un plexus massif pouvant contenir plusieurs centaines de sites de libération de neurotransmetteurs. En plus de cette projection principale, une collatérale de l'axone projette dans la zone précise du noyau profond qui sera elle-même contactée par cette même cellule de Purkinje.

Les fibres moussues constituent la principale afférence du cervelet. Elles prennent leur origine dans différentes structures médullaires, bulbaires et pontiques, comme par exemple les colonnes de Clarke, les noyaux vestibulaire, cunéen, trigéminal ou réticulotegmental pontique (Figure 6). Du fait de ces origines diverses, il existe une hétérogénéité dans la nature du neurotransmetteur excitateur utilisé. En effet, on retrouve du glutamate (Somogyi et al., 1986) et pour les fibres d'origine vestibulaires, de l'acétylcholine (Barmack et al., 1992). Les fibres moussues entrent dans le cervelet par la substance blanche, où chaque fibre se divise en de multiples branches qui atteignent les différents lobes et lobules. Chacune de ces branches contacte de manière unitaire le dendrite d'une cellule granulaire au sein d'une structure appelée glomérule. De ce fait, le signal véhiculé par une seule fibre moussue couvre une large surface corticocérébelleuse. La terminaison synaptique de ces fibres forme un bourgeon appelé « rosette ». La rosette occupe le centre du glomérule et englobe les dendrites de plusieurs dizaines de cellules en grain (Palkovits et al., 1972) ainsi que les terminaisons synaptiques des cellules de Golgi (Figure 3).



**Figure 6 : Afférences et efférences du cortex cérébelleux.**

Diagramme résumant les principales afférences du cortex cérébelleux provenant des noyaux précérébelleux (sur la droite) ainsi que les afférences des noyaux profonds provenant du cortex cérébelleux et de ces mêmes noyaux précérébelleux (sur la gauche). Ces dernières projections citées correspondent à des collatérales d'axones. ND : noyau dentelé, NI : noyau interposé, NF : noyau fastigial, NG : noyau gris pontique, NV : noyau vestibulaire, NP : noyau préposé hypoglosse, NOant : noyau antérieur de l'olive, NOpost : noyau postérieur de l'olive, NR : noyau réticulotegmentaire pontique, ME : moelle épinière. D'après Altman et Bayer, 1997.

En plus des afférences des fibres grimpantes et moussues, le cervelet est innervé par des afférences monoaminergiques provenant du tronc cérébral. Contrairement aux deux autres types de fibres, elles sont dispersées de manière diffuse dans le cortex cérébelleux où elles exercent une influence modulatrice sur l'activité des neurones cérébelleux. Par exemple, on retrouve des fibres noradrénergiques du locus cœruleus (Olson et Fuxe, 1971) ainsi que des fibres sérotoninergiques du raphé et de la formation réticulée (Bishop et Ho, 1985).

#### *Les efférences du cervelet*

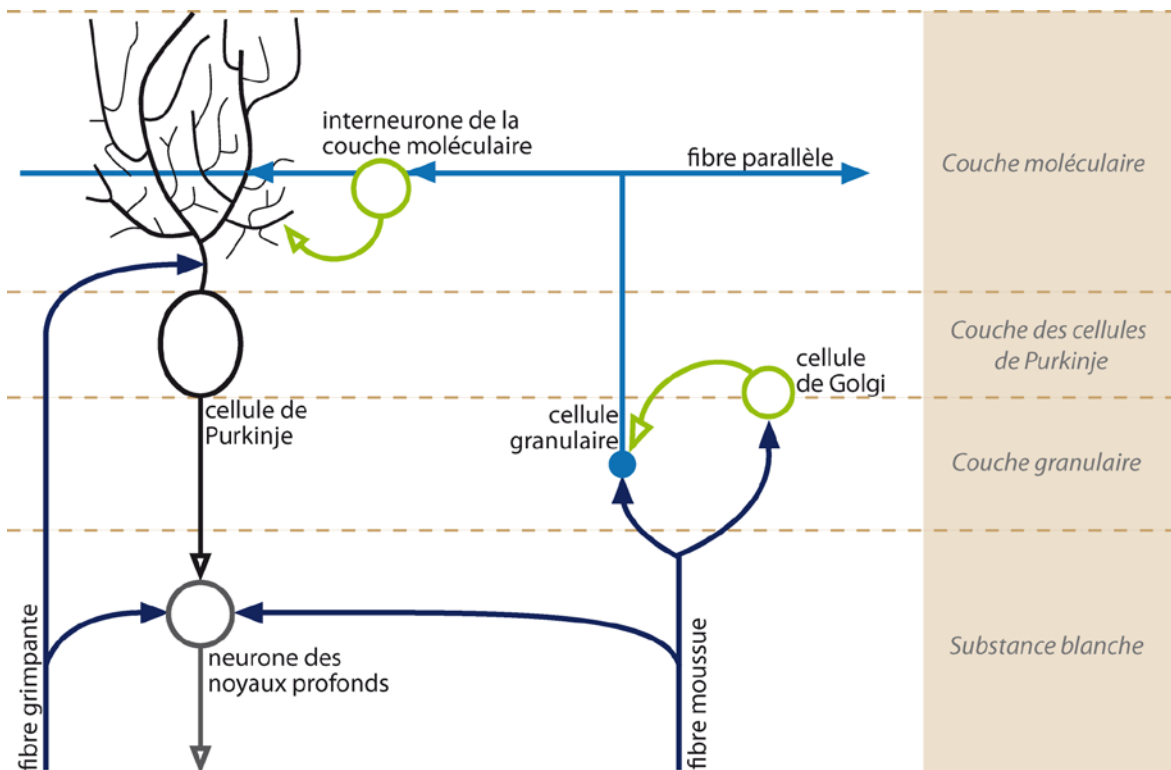
Les noyaux profonds constituent la seule efférence du cervelet vers le reste du système nerveux central. Ces noyaux intègrent l'information provenant d'une part du cortex cérébelleux via un seul type neuronal, la cellule des Purkinje ; et d'autre part des collatérales des fibres afférentes moussues et grimpantes. Il existe une double organisation de ces projections des cellules de Purkinje aux noyaux profonds, dans le sens médiolatéral et le sens antéropostérieur, suivant une certaine topographie. Dans le sens médiolatéral, il est démontré que les axones des cellules de Purkinje du vermis projettent en majeure partie vers le noyau fastigial, ceux de la partie intermédiaire des hémisphères vers le noyau interposé et ceux des hémisphères latéraux dans le noyau dentelé (Figure 6). Il en va de même pour les lobules les plus antérieurs ou postérieurs qui projettent respectivement dans les zones antérieures ou postérieures des noyaux correspondants (Haines et Manto, 2009). Nous reviendrons sur le principe d'organisation fonctionnelle du cervelet dans la section 1.4..

#### **1.2.4. Le circuit cérébelleux**

Le cervelet est divisé en deux parties, le cortex cérébelleux, organisé en 3 couches et les noyaux profonds localisés dans la substance blanche. Il existe deux circuits cérébelleux, chacun faisant intervenir l'une de ces deux divisions (Figure 7) : le premier circuit entre dans le cervelet par la substance blanche et en sort directement en passant par les noyaux profonds, sans entrer dans le cortex ; le second circuit (détaillé dans le paragraphe ci-après) entre dans le cervelet par la substance blanche, remonte au niveau du cortex cérébelleux où l'information est intégrée par les cellules de Purkinje avant de ressortir par les noyaux profonds comme pour le premier circuit. Nous verrons plus tard que ces deux circuits ne sont pas organisés de manière indépendante, mais qu'ils suivent une organisation topographique.



Sur les huit types de neurones du cortex cérébelleux, un seul, la cellule de Purkinje, possède un axone de projection. Les sept autres types sont des interneurons locaux dont les axones n'atteignent jamais les structures extracorticales (Figure 7). Dans le cadre de ce manuscrit, nous nous pencherons principalement sur la connectivité entre les interneurons de la couche moléculaire et la cellule de Purkinje, qui fait l'objet de cette thèse.



**Figure 7 : Schéma simplifié des connexions synaptiques des principaux neurones cérébelleux.** Les fibres grimpantes et moussues constituent les principales afférences au cervelet. Les fibres grimpantes contactent les noyaux profonds et les cellules de Purkinje. Les fibres moussues contactent les cellules granulaires directement et indirectement via les cellules de Golgi. Les cellules granulaires contactent à leur tour les cellules de Purkinje ainsi que les interneurons de la couche moléculaire (cellules étoilées et cellules en panier). L'ensemble du circuit cérébelleux converge vers les cellules de Purkinje, qui projettent vers les neurones des noyaux profonds. Les connexions excitatrices sont représentées en flèches pleines et les connexions inhibitrices en flèches vides. La géométrie du cervelet n'est pas respectée sur ce schéma.

### *Le circuit corticocérébelleux*

L'information afférente véhiculée par les fibres moussues est relayée par un neurone exciteur, la cellule en grain. Cette cellule, via son axone, la fibre parallèle, va exciter les neurones inhibiteurs dont les dendrites se trouvent dans la couche moléculaire : les cellules de Purkinje, les cellules de Golgi et les interneurons de la couche moléculaire. Deux petites boucles modulatrices sont ainsi créées, avec d'une part les cellules de

Golgi qui en retour inhibent les neurones en grains, et d'autre part les interneurons de la couche moléculaire qui inhibent la cellule de Purkinje. L'information afférente provenant des fibres grimpantes, quant à elle, arrive sans intermédiaire directement sur la cellule de Purkinje.

La cellule de Purkinje intègre le message de plusieurs centaines de milliers de connexions, dont environ 95 % proviennent des fibres parallèles seules (Tritsch et al., 1999). Cette masse d'information convergeant vers l'arborisation géante de la cellule de Purkinje est transmise aux noyaux profonds cérébelleux, qui constituent l'unique intermédiaire entre le cortex cérébelleux et ses cibles.

### *Importance physiologique des interneurons de la couche moléculaire*

L'étude de la fonction des interneurons a longtemps été mise de côté, ceci en faveur de l'étude des neurones de projection. Cependant, les interneurons locaux, dont le but est de moduler les informations traitées par les neurones de projection, sont d'une importance capitale dans les circuits neuronaux et les fonctions qu'ils sous-tendent. Leurs rôles vont plus loin que la simple inhibition du neurone cible. En effet, les processus d'intégration neuronale dépendent de la fenêtre temporelle durant laquelle les entrées excitatrices se somment pour déclencher (ou non) un potentiel d'action postsynaptique. Or dans l'hippocampe, il est par exemple démontré que les interneurons inhibiteurs, par une intégration feedforward, sont capables de faire varier cette fenêtre temporelle (Pouille et Scanziani, 2001). Ils contribuent également à rendre dynamique toute la gamme d'entrée excitatrices arrivant sur le neurone cible, en modulant l'excitabilité et la force de chacune de ces entrées (Pouille et al., 2009). Par ailleurs, dans le cortex cérébral, de par leur inter-connectivité, les interneurons corticaux sont par exemple capables d'imposer et d'entretenir une activité oscillatoire des neurones de projection du réseau, pouvant couvrir des bandes de fréquences aussi bien lentes (theta, 4-7 Hz) que très rapides (gamma, > 30 Hz) (Buzsáki et Chrobak, 1995; McBain et Fisahn, 2001). Ces quelques exemples illustrent bien différentes fonctions que les interneurons sont susceptibles de remplir au sein du réseau neuronal.

Durant ma thèse, je me suis focalisée sur les interneurons de la couche moléculaire, qui forment une inhibition feedforward sur la cellule de Purkinje (c'est-à-dire que les fibres parallèles en amont vont exciter simultanément la cellule de Purkinje et les interneurons inhibiteurs, et que les interneurons vont inhiber à leur tour la cellule de Purkinje (Figure 7)). Pour la cellule de Purkinje cible, il en résulte que le potentiel exciteur induit par la fibre parallèle sera tronqué par l'arrivée d'une entrée inhibitrice

provenant des interneurones, du fait de la fenêtre temporelle qui lie ces deux entrées (Mittmann et al., 2005). En effet plus généralement, il est couramment observé dans ces systèmes de feedforward inhibiteur, que les potentiels postsynaptiques excitateurs présentent des cinétiques plus courtes que dans des systèmes monosynaptiques, et en particulier pour les cinétiques de « decay-time » (Glickstein et al., 2009 ; Jörntell et al., 2010).

Comme nous venons de le voir, les interneurones de la couche moléculaire, reçoivent donc des entrées synaptiques excitatrices glutamatergiques des fibres parallèles. Ils sont également contactés par des afférences inhibitrices GABAergiques réciproques des interneurones voisins et excitatrices via une transmission volumique extrasynaptique provenant des fibres grimpantes (Szapiro et Barbour, 2007). Indépendamment de ces afférences, ils sont capables d'émettre des potentiels d'action de manière spontanée lorsqu'ils sont à l'état de repos, c'est-à-dire même en l'absence d'entrées synaptiques (Llano et Gerschenfeld, 1993).

L'axone des interneurones de la couche moléculaire forme des contacts synaptiques sur les cellules de Purkinje principalement, mais également vers d'autres interneurones de la couche moléculaire (Briatore et al., 2010) et vers les cellules de Golgi (Palay et Chan-Palay, 1974). Il est démontré qu'une unique cellule étoilée est capable d'exercer une inhibition rapide faible de la cellule de Purkinje cible (Midtgaard, 1992a), ce qui laisse supposer qu'une activation conjointe simultanée de ces neurones est nécessaire à l'inhibition efficace des cellules de Purkinje. Ce dernier point est soutenu par le fait que les cellules étoilées ont d'une part un fort taux d'inter-connectivité (Kondo et Marty, 1998) ; et d'autre part qu'elles établissent des jonctions communicantes entre-elles, permettant leur synchronisation (Sotelo et Llinás, 1972).

Les propriétés actives et passives des interneurones leur permettent d'avoir un couplage temporel très serré entre l'entrée et la sortie du signal électrique, ce qui d'une part traduit un temps de réponse rapide (Midtgaard, 1992b) et d'autre part permet une grande précision du contrôle du patron de décharge (Buzsáki et Chrobak, 1995). De ce fait, il est important de noter qu'un seul quantum de neurotransmetteur atteignant une cellule étoilée est capable de fortement influencer le patron de décharge de ce neurone. Ceci est vrai pour des transmissions excitatrices ou inhibitrices, et que l'interneurone soit dans des modes de décharge rapides ou lents (Carter et Regehr, 2002). L'ensemble des propriétés des interneurones fait qu'ils sont capables d'atteindre des fréquences de décharge de potentiel d'action élevées (500 Hz) imposées par les cellules granulaires (Brenowitz et Regehr, 2007; Jörntell et al., 2010). Ainsi, la grande proportion de ces interneurones dans la couche moléculaire, leurs propriétés et la

localisation stratégique de leurs contacts synaptiques sur la cellule de Purkinje (sur les dendrites tertiaires pour les cellules en panier et sur le soma et le dendrite proximal pour les cellules en panier (Palay et Chan-Palay, 1974)) permet le blocage efficace des entrées excitatrices provenant des fibres parallèles et des fibres grimpantes par des conductances inhibitrices de type shunt (Midtgaard, 1992a ; Callaway et al., 1995). Cette inhibition provenant des interneurons de la couche moléculaire pourrait sous-tendre l'activité irrégulière des cellules de Purkinje, sous forme de « pauses » (Granit et Phillips, 1956; Häusser et Clark, 1997) que l'on observe sur leur activité spontanée oscillatoire (30-50 Hz, (Häusser et Clark, 1997; de Solages et al., 2008). En effet, le niveau de conductance inhibitrice imposé par les interneurons à la cellule de Purkinje est variable au cours du temps, et a un contrôle direct de l'intervalle inter-spike du patron de décharge de la cellule de Purkinje (Jaeger et Bower, 1999) et donc de sa fréquence de décharge. De plus, une étude récente a confirmé la contribution de l'activité des interneurons de la couche moléculaire sur le patron de décharge des cellules de Purkinje et observé leur influence sur le bon fonctionnement moteur *in vivo* (Wulff et al., 2009), ceci démontrant leur nécessité dans le circuit cérébelleux. Ces observations prennent toute leur importance lorsque l'on sait que 1) les cellules de Purkinje ont une activité oscillatoire et qu'elles projettent vers les noyaux profonds (~200 Hz, de Solages et al., 2008) ; 2) 40% des oscillations (5-10 Hz) enregistrées dans le cortex cérébelleux sont en phase avec l'aire corticale somatosensorielle S1, suite à une stimulation des vibrisses chez le rat (O'Connor et al., 2002) ; 3) les oscillations enregistrées dans l'aire motrice M1 sont en phase avec les oscillations (10-40 Hz) enregistrées en potentiels de champ dans les noyaux profonds lors d'une tâche de préhension chez le singe (Soteropoulos et Baker, 2006) ; et 4) les oscillations (20-35 Hz) enregistrées dans les noyaux profonds sont en phase avec une activité des différents muscles du bras chez le singe (Aumann et Fetz, 2004).

Ainsi, nous savons d'une part que la cellule de Purkinje est un neurone de projection correspondant à la seule sortie du cortex cérébelleux, qui intègre la totalité des informations excitatrices et inhibitrices y transitant pour contrôler les noyaux profonds, et d'autre part que les afférences inhibitrices provenant des interneurons de la couche moléculaires ont une forte influence sur son patron de décharge. Par conséquent, il semble intéressant de penser que ces interneurons ont un rôle clé et une réelle influence sur le fonctionnement cérébelleux. Leur étude pourrait donc permettre à étendre la compréhension globale du système.

### **1.3. Maturation du cervelet et des contacts synaptiques**

Cajal, en plus de ses travaux d'histologie, aura également été le premier à décrire avec précision la migration et la différenciation neuronale dans le cervelet, ainsi que le rôle des processus de déafférentation lors de la formation des réseaux neuronaux. Aujourd'hui il est admis que le positionnement spatial précis des neurones est le résultat d'une organisation temporelle stricte au cours du développement. Pour le système nerveux, cela se traduit séquentiellement par une prolifération, une migration, une différenciation neuronale, la croissance chimio-guidée des axones vers leur cible, puis la synaptogenèse, c'est-à-dire le processus par lequel sont formées les synapses fonctionnelles entre neurones. Ces étapes, réalisées selon une cinétique strictement programmée, va permettre la création d'un réseau complexe et organisé.

Dans cette section nous verrons les grandes étapes de la maturation du cervelet et de la synaptogenèse au sein du système nerveux central. Nous aborderons également les notions relatives à la compréhension des mécanismes synaptiques et en particulier à la neurotransmission.

#### **1.3.1. Maturation du cervelet et de différents types cellulaires**

L'ensemble du système nerveux dérive d'une spécialisation du feuillet embryonnaire de cellules épithéliales ectodermiques appelé la plaque neurale (Spemann et Mangold 1924). Lors de la différenciation, les bords de la plaque neurale s'épaississent et s'invaginent selon un axe antéropostérieur pour former la gouttière neurale, ouverte sur l'extérieur en sa partie dorsale. Lorsque la gouttière se referme pour former le tube neural, la partie la plus antérieure sera modelée en trois vésicules primordiales, ébauches des futurs prosencéphale, mésencéphale et rhombencéphale. C'est à la jonction entre ces deux dernières structures que le cervelet prendra naissance (Martinez et Alvarado-Mallart, 1989).

Comme pour l'ensemble des autres structures nerveuses, une grande partie de la prolifération des neurones du cervelet a lieu exclusivement dans la zone germinative primaire au niveau du neuroépithélium du toit du quatrième ventricule. La fraction restante correspond aux précurseurs des cellules granulaires, qui suivent une prolifération dans une zone germinative secondaire: la couche granulaire externe (Zhang et Goldman, 1996). L'une des différences marquantes entre ces deux zones germinales est que la phase de prolifération primaire a lieu pendant la période embryonnaire, alors que la secondaire intervient majoritairement après la naissance.

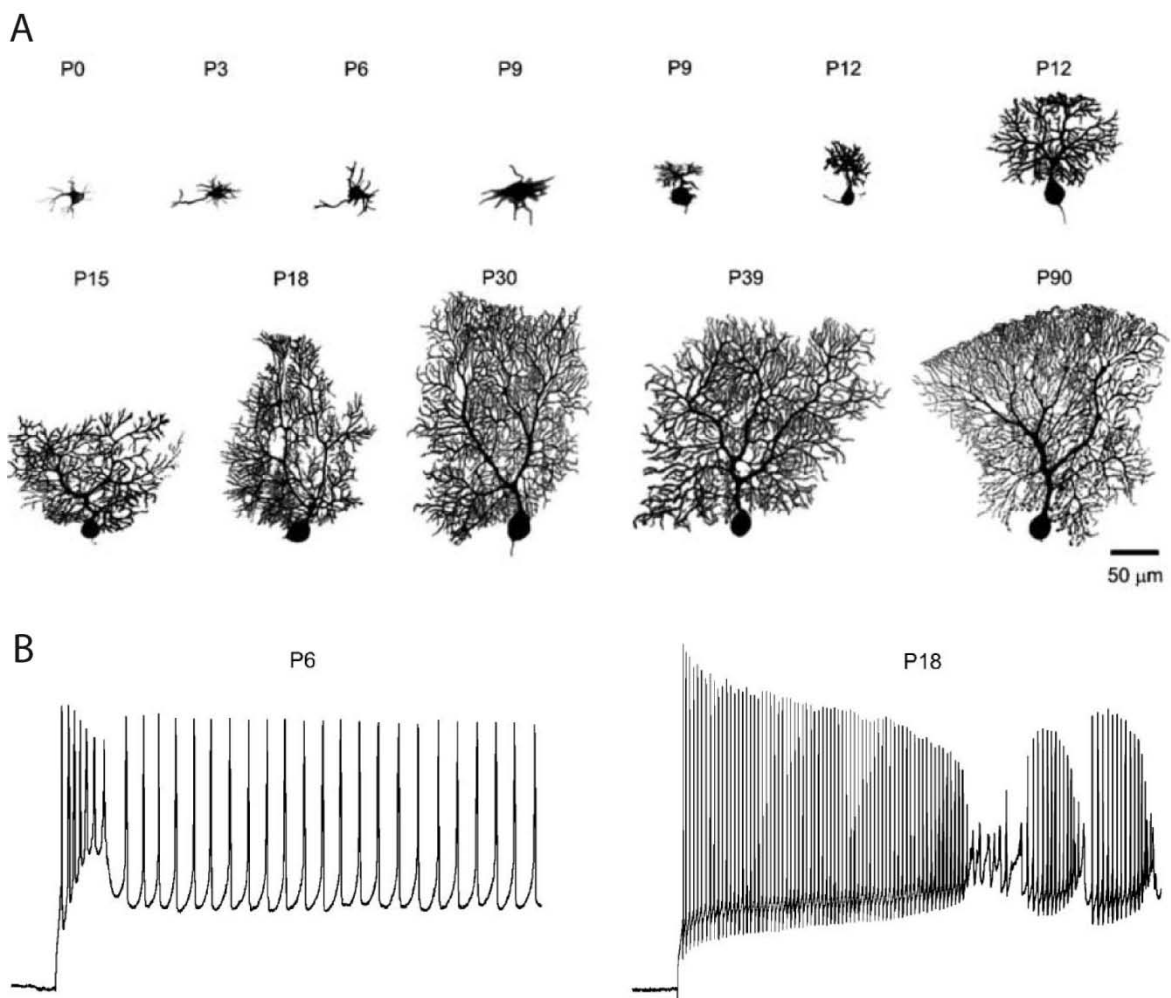
Chez le rongeur, d'un point de vue chronologique, la couche granulaire externe se forme vers E17 à partir de la zone germinative du trigone cérébral, d'où elle envahit la surface totale du cervelet primitif. En parallèle, les neurones des noyaux profonds se multiplient au sein de la couche moléculaire externe (Pierce, 1975), simultanément avec les cellules de Purkinje qui prolifèrent en dessous de celle-ci. A E19, l'ébauche des futurs noyaux profonds formant une masse dans la couche granulaire externe plonge au niveau de la substance blanche du cervelet et le cortex cérébelleux commence à se développer. A E22, le cervelet primitif arbore déjà son architecture typique avec un cortex en couches découpé en lobules surmontant la substance blanche qui contient les noyaux profonds. Ainsi, après la naissance et jusqu'aux alentours de P30, le cervelet va principalement s'accroître et mettre en place les différentes connexions (Altman et Bayer, 1997 ; Sotelo, 2004).

#### *Maturation des cellules de Purkinje*

A la naissance, les cellules de Purkinje ont arrêté leur phase de division et commencent à migrer pour se répartir en une seule et même rangée (Altman, 1972a). Dès les premiers jours postnataux, et alors que les dendrites ne sont pas encore développés, la cellule de Purkinje est déjà contactée par la fibre grimpante selon un processus en plusieurs étapes : à P2, de nombreuses fibres grimpantes établissent un contact transitoire sur le soma ; à P3, la plupart de ces contacts commence à régresser, puis à partir de P10, alors que les soma des cellules de Purkinje ne forment plus qu'une monocouche, la multi-innervation disparaît totalement et les nombreux contacts synaptiques provenant de cette fibre se déplacent du soma vers les dendrites lisses de la cellule de Purkinje (Hashimoto et Kano, 2005). Bien que le mécanisme soit mal connu, cette multi-innervation des cellules de Purkinje par les fibres grimpantes est régulée par la formation de synapses fonctionnelles entre la fibre parallèle et la cellule de Purkinje (Mariani et Changeux, 1981 ; Sugihara et al., 2000). A P7, on peut distinguer une ébauche de dendrite primaire (Figure 8B), qui commence à recevoir des contacts synaptiques des premières cellules granulaires puis des premiers interneurons à partir de P10. Vers P12, l'arborisation secondaire et tertiaire se développe en direction de la surface du folium en suivant la limite supérieure de la couche moléculaire et ceci jusqu'à atteindre sa taille définitive vers P30 (McKay et Turner, 2005).

La mise en place des propriétés intrinsèques des cellules de Purkinje est le résultat d'une maturation qui intervient en parallèle au développement de la morphologie de l'arbre dendritique. En effet, les cellules de Purkinje vont passer d'un patron de décharge tonique et régulier entre P0 et ~P9, à un patron trimodal, alternant entre un

mode tonique, un mode en « bouffées » (ou « burst ») et un mode silencieux à partir de P12 (Womack et Khodakhah, 2002 ; McKay et Turner, 2005) (Figure 8B). Ces patrons sont intrinsèques à la cellule de Purkinje et sont susceptibles de se mettre en place pendant la maturation des dendrites, entre autre suite à l'expression dendritique de canaux calciques de type P/Q (Gruol et al., 1992 ; Womack et Khodakhah, 2004). Ces canaux sont à l'origine des spikes calciques dendritiques, connus pour influencer le patron de décharge sodique somatique, et imposant le patron de décharge trimodal spontané à la cellule de Purkinje.



**Figure 8 : Maturation des cellules de Purkinje chez le rongeur.**

**A) Les cellules de Purkinje mûrissent lentement entre P0 et P9 puis subissent une croissance dendritique rapide entre P12 et P18 pour atteindre une morphologie adulte vers P30. Une forte hétérogénéité est observée entre P9 et P12. B) Patron de décharge de cellules de Purkinje immatures (P6) toniques à gauche, et matures (P18) en bursts à droite. D'après McKay et Turner, 2005.**

À la fin du développement du cervelet, les cellules de Purkinje présentent un patron d'activité d'une part en décharge de potentiels d'action « complexe » (complex spike

firing, Davie et al., 2008) imposé par les afférences grimpantes et d'autre part en décharge de potentiels d'action « simple » qui résulte de l'intégration à la fois de sa propre activité autorythmique intrinsèque, des afférences excitatrices des fibres parallèles et des afférences inhibitrices provenant des interneurons de la couche moléculaire (Santamaria et al., 2007 ; Barmack et Yakhnitsa, 2008 ; Wulff et al., 2009).

#### *Maturation des cellules granulaires*

La prolifération des futures cellules granulaires est plus longue que pour les autres types cellulaires, ce qui n'est pas surprenant étant donné leur nombre à l'âge adulte. Aux alentours de P10 ces cellules atteignent leur pic de prolifération et simultanément deviennent fusiformes, formant à chaque extrémité un prolongement fin, ébauche de la future fibre parallèle. Elles commencent à migrer de la couche granulaire externe en direction de la profondeur en laissant derrière elles leur axone. Entre P21 et P25, après avoir traversé la couche moléculaire puis la couche des cellules de Purkinje, leur corps cellulaire va trouver sa position définitive dans la couche granulaire interne (Hallonet et al., 1990). La mise en place des connexions entre les fibres parallèles et les cellules de Purkinje débute vers le milieu de la deuxième semaine postnatale, lorsque les épines dendritiques, sites postsynaptiques contactés par les terminaisons axonales des cellules en grains font leur apparition sur les branches distales de l'arborisation dendritique des cellules de Purkinje. Le développement de ces synapses s'effectue progressivement jusqu'à la fin du premier mois postnatal, en suivant la maturation de l'arbre dendritique des cellules de Purkinje cibles. Cependant, il existe des indications de connexions précoces vers P7 entre ces fibres et le tronc lisse du dendrite des cellules de Purkinje (Altman, 1972a). Les premiers contacts entre les fibres moussues et les cellules granulaires au sein du glomérule se font à partir de la deuxième semaine postnatale chez la souris, marquant ainsi la fin de la phase de maturation des cellules granulaires (Altman, 1972b).

#### *Maturation des interneurons inhibiteurs*

Les interneurons inhibiteurs du cervelet se différencient dans les premiers jours après la naissance à partir d'un précurseur commun situé dans la substance blanche (Zhang et Goldman, 1996). Les premiers interneurons qui atteignent un état mature sont les cellules de Golgi vers P10 (Simat et al., 2007), tandis que les précurseurs des cellules étoilées et des cellules en panier poursuivent leur prolifération. Simultanément, ces deux derniers types cellulaires vont migrer dans la couche moléculaire à partir de P10 et achever leur différenciation à partir de P20. Les premières synapses entre les axones des



interneurones de la couche moléculaire et les cellules de Purkinje sont observées à partir de P10 pour les interneurones ayant déjà migré (Larramendi, 1969 ; Altman, 1972a ; Simat et al., 2007).

### 1.3.2. Synapse et synaptogenèse

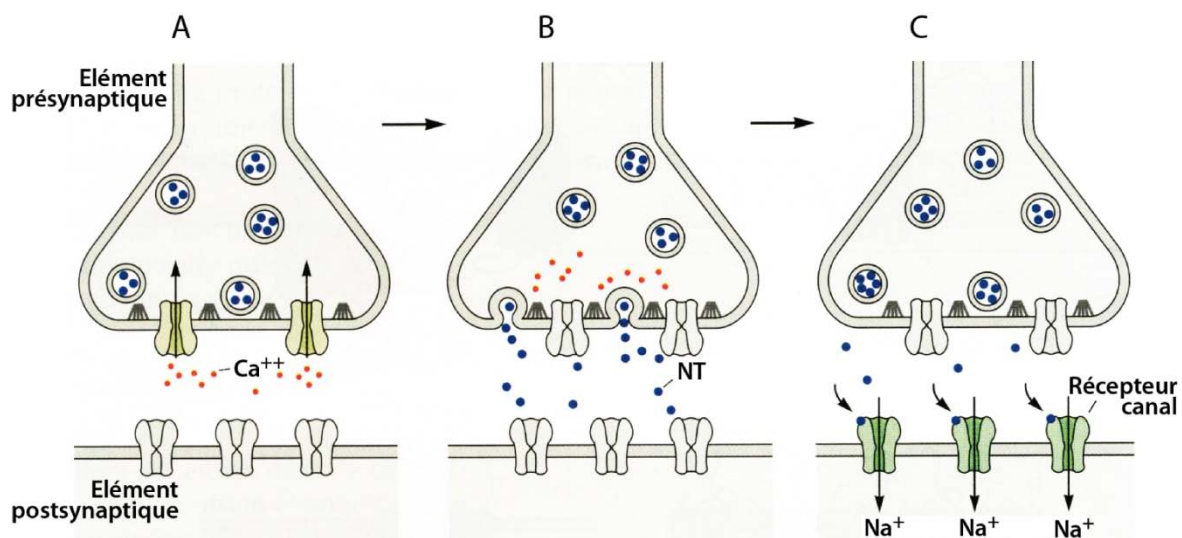
La synapse est fondamentalement indispensable au fonctionnement neuronal car elle permet la communication élémentaire entre les neurones. Le terme « synapse » fut employé pour la première fois par Charles Scott Sherrington (1857 – 1952) en 1887 alors qu'il étudiait les réflexes spinaux, pour désigner la jonction entre la terminaison axonale d'un neurone et le dendrite d'un autre neurone (Foster, 1889). Ce terme fut rapidement généralisé à d'autres structures dont le meilleur exemple est certainement la jonction neuromusculaire, l'un des modèles d'étude de la transmission synaptique le plus utilisé. Le développement des techniques de microscopie et d'histologie permettant la visualisation de l'élément synaptique permirent la définition de ce que l'on appelle les « synapses chimiques » dans lesquelles a lieu la neurotransmission.

Dans le système nerveux central, les synapses chimiques sont dites tripartites, c'est-à-dire constituées d'un élément présynaptique contenant les vésicules de neurotransmetteur, apposé à un élément postsynaptique abritant les récepteurs spécifiques de ces neurotransmetteurs, ces deux compartiments étant séparés par la fente synaptique, le tout isolé du reste du milieu extracellulaire par des prolongements astrocytaires (pour revue : Perea et al., 2009).

#### *Principe général de la neurotransmission*

Le processus de neurotransmission nécessite plusieurs étapes. L'arrivée d'un potentiel d'action au niveau de la terminaison axonale permet l'entrée de calcium dans l'élément présynaptique par des canaux calciques dépendants du voltage (Brehm et Eckert, 1978) (Figure 9A). L'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium entraîne la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique, ce qui a pour effet de libérer le neurotransmetteur dans la fente synaptique, dans un processus appelé exocytose (Figure 9B). Les molécules de neurotransmetteur libérées diffusent dans la fente synaptique vers le compartiment postsynaptique localisé en vis-à-vis. Elles se fixent sur leurs récepteurs membranaires pour les activer. En fonction du couple neurotransmetteur / récepteur postsynaptique exprimé, la synapse pourra être excitatrice (par exemple à la synapse entre la fibre grimpante et la cellule de Purkinje, du glutamate est libéré pour activer des récepteur AMPA et NMDA), ou inhibitrice (par

exemple à la synapse entre les interneurones de la couche moléculaire et la cellule de Purkinje, du GABA est libéré pour activer les récepteurs GABA<sub>A</sub>). Cette interaction a pour effet d'ouvrir des canaux par lesquels un flux ionique va circuler et modifier les propriétés électriques du neurone postsynaptique (Figure 9C). Dans le cas d'une synapse excitatrice un courant postsynaptique excitateur, qui correspond à une entrée nette de cations (par exemple une entrée de Na<sup>+</sup> ou de Ca<sup>++</sup>) est généré, et à l'inverse, un courant postsynaptique inhibiteur qui correspond à une sortie nette de cations (par exemple une sortie de K<sup>+</sup> ou une entrée de Cl<sup>-</sup>) est généré dans une synapse inhibitrice (Tritsch et al., 1999). Pour terminer cette réaction des systèmes de désensibilisation des récepteurs postsynaptiques, et de recapture des neurotransmetteurs par le neurone présynaptique et les astrocytes sont aussitôt activés. Les étapes successives de la neurotransmission décrite ci-dessus ne sont pas réalisées instantanément, mais ont une certaine durée appelée le « délai synaptique » qui est de l'ordre de la milliseconde dans certains cas, mais peut durer jusqu'à plusieurs secondes dans d'autres cas, notamment en fonction du type de récepteur postsynaptique activé.

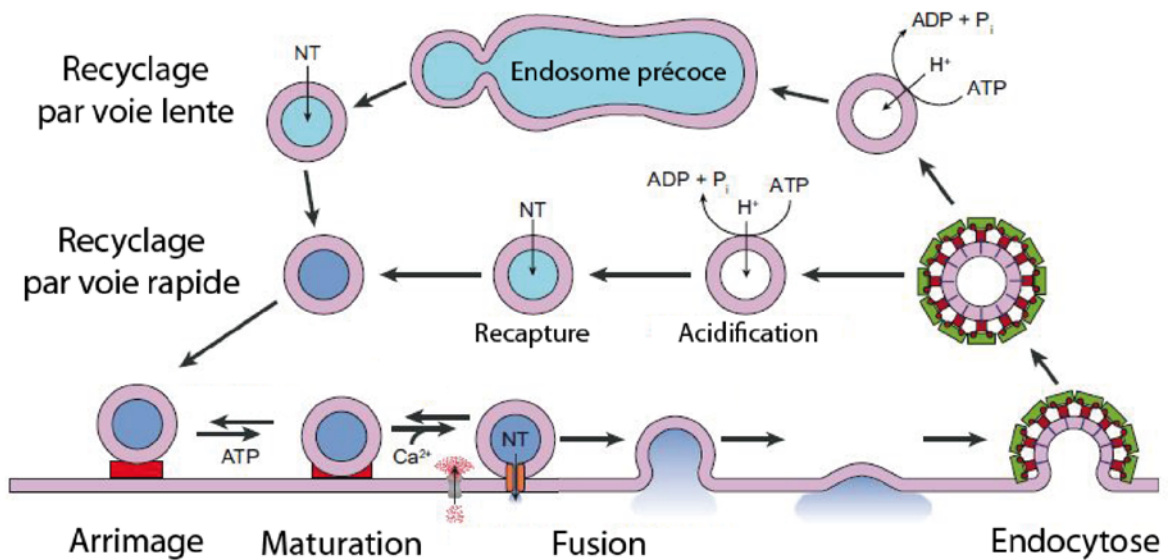


**Figure 9 : Neurotransmission dans les synapses chimiques.**

A) L'arrivée d'un potentiel d'action dans la terminaison présynaptique provoque l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage situés dans les zones actives. B) L'entrée de calcium par ces canaux entraîne une forte augmentation de la concentration en calcium dans les zones actives, provoquant à son tour la libération des neurotransmetteurs dans le milieu extracellulaire par exocytose. C) Les molécules de neurotransmetteurs libérées diffusent dans la fente synaptique et se lient sur leurs récepteurs spécifiques localisés sur la membrane postsynaptique. L'ouverture de ces canaux entraîne un changement de la conductance membranaire et du potentiel de membrane. NT : neurotransmetteur. D'après Kandel et al., 2000.

### Elément présynaptique, trafic des vésicules et libération des neurotransmetteurs

La terminaison présynaptique est un compartiment spécialisé des neurones responsable de la conversion d'un signal électrique, le potentiel d'action, en un signal chimique, la libération de neurotransmetteurs. Elle renferme une collection de petites vésicules synaptiques de 40  $\mu\text{m}$  de diamètre, remplies de milliers de molécules de neurotransmetteur. Ces vésicules sont regroupées dans, ou à proximité, de régions appelées « zones actives », spécialisées dans la libération des neurotransmetteurs par exocytose.



**Figure 10 : Le cycle des vésicules synaptiques dans l'élément présynaptique.**

Le cycle vésiculaire est un processus en plusieurs étapes consécutives. Les vésicules recyclées sont chargées en neurotransmetteur, puis arrimées à la membrane plasmique pour subir des maturations visant à les rendre compétentes à la fusion. Suite à l'entrée de calcium dans la terminaison neuronale, les vésicules compétentes fusionnent par exocytose pour libérer les molécules de neurotransmetteur qu'elles renferment. Un mécanisme d'endocytose des vésicules venant de fusionner amorce le recyclage, celui-ci pouvant se faire par voie rapide ou par voie lente. NT : Neurotransmetteur. D'après Chapman, 2008.

Les vésicules synaptiques contenues dans chaque zone active sont limitées en nombre et l'utilisation de ces vésicules dans les processus d'exocytose est répétée à un rythme parfois élevé. Pour soutenir ce rythme de libération, la neurotransmission est maintenue par un recyclage local des vésicules. Ce cycle dynamique des vésicules synaptiques est classiquement divisé en quatre étapes clés (Figure 10) : 1) une pompe à proton acidifie la lumière de la vésicule synaptique et le gradient de pH ainsi créé entraîne le chargement du neurotransmetteur dans la vésicule (Masson et al., 1999) ; 2) les vésicules ainsi chargées sont transportées jusque dans les zones actives où elles sont arrimées à la membrane, puis subissent une maturation, ceci afin de les rendre

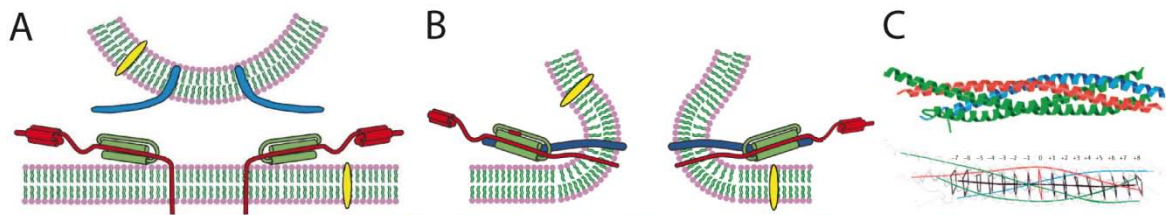
compétentes à la fusion (Wojcik et Brose, 2007) ; 3) dès l'arrivée d'un potentiel d'action, l'exocytose des molécules de neurotransmetteur contenues dans les vésicules est déclenchée par l'entrée d'ions  $\text{Ca}^{++}$  à travers les canaux calciques dépendants du voltage (Katz 1969) ; 4) après la fusion, la vésicule est reformée par un mécanisme d'endocytose dépendant de la clathrine pour subir un nouveau cycle (Dittman et Ryan, 2009). Le recyclage des vésicules après endocytose peut se faire par voie rapide, où la vésicule est directement rechargée en neurotransmetteur ; ou par voie lente, où les constituants de la membrane sont recyclés pour former de nouvelles vésicules (Klingauf et al., 1998). Pour la suite de ce manuscrit, les étapes qu'il me paraissent importantes de détailler concernent principalement les étapes d'arrimage, maturation et libération.

Les étapes d'arrimage et de maturation des vésicules permettent de rendre les vésicules compétentes à la fusion, tout en maintenant un « frein » à l'exocytose, dans le but d'éviter les déclenchements de fusion non déclenchés. Ces vésicules correspondent au groupe (ou « pool »), de vésicules directement libérables (RRP, Readily-releasable pool), capables de répondre rapidement à l'entrée de calcium (200 – 400  $\mu\text{s}$ ) (Sabatini et Regehr, 1996 ; Tritsch et al., 1999).

Tous les événements d'exocytose membranaire connus chez les eucaryotes impliquent la formation d'un complexe protéique ancré dans la membrane vésiculaire d'une part et dans la membrane plasmique d'autre part, qui s'assemblent en un faisceau d'hélices. De telles protéines sont appelées de manière générale les « SNAREs » (SNAP receptors). Concernant les événements de fusion des vésicules synaptiques en particulier, l'arrimage des vésicules dans les zones actives implique un complexe trimérique nécessitant les t-SNAREs (« t » pour « target ») Syntaxine-1 et SNAP-25 sur la membrane plasmique et le v-SNARE (« v » pour « vesicular ») VAMP-synaptobrevine-2 sur la membrane vésiculaire (Figure 11) (Söllner et al., 1993 ; Jahn et Scheller, 2006).

Le modèle actuellement proposé (Rizo et Rosenmund, 2008) est le suivant : la Syntaxine est bloquée dans une configuration « fermée », inactive, par son association avec la protéine Munc-18. L'arrivée de Munc-13 chasse Munc-18 et entraîne l'ouverture de la Syntaxine, lui permettant de se lier à SNAP-25 puis à la VAMP-synaptobrevine-2. A ce stade du cycle de la vésicule, la fusion est bloquée par des protéines appelées Synaptotagmines, et ne pourra être levé qu'en présence de calcium (Marz et Hanson, 2002). Synaptotagmine-1 est le membre de cette famille le plus exprimé à la synapse. Son rôle est de fixer des molécules de calcium via son domaine C2 lorsqu'elles sont présentes en forte concentration ( $> 200 \mu\text{M}$ ) dans les zones actives (Nalefski et Falke, 1996 ; Bai et Chapman, 2004), ce qui constitue un élément déclencheur pour qu'elle interagisse avec les phospholipides des membranes (Brose et al., 1992). Plus

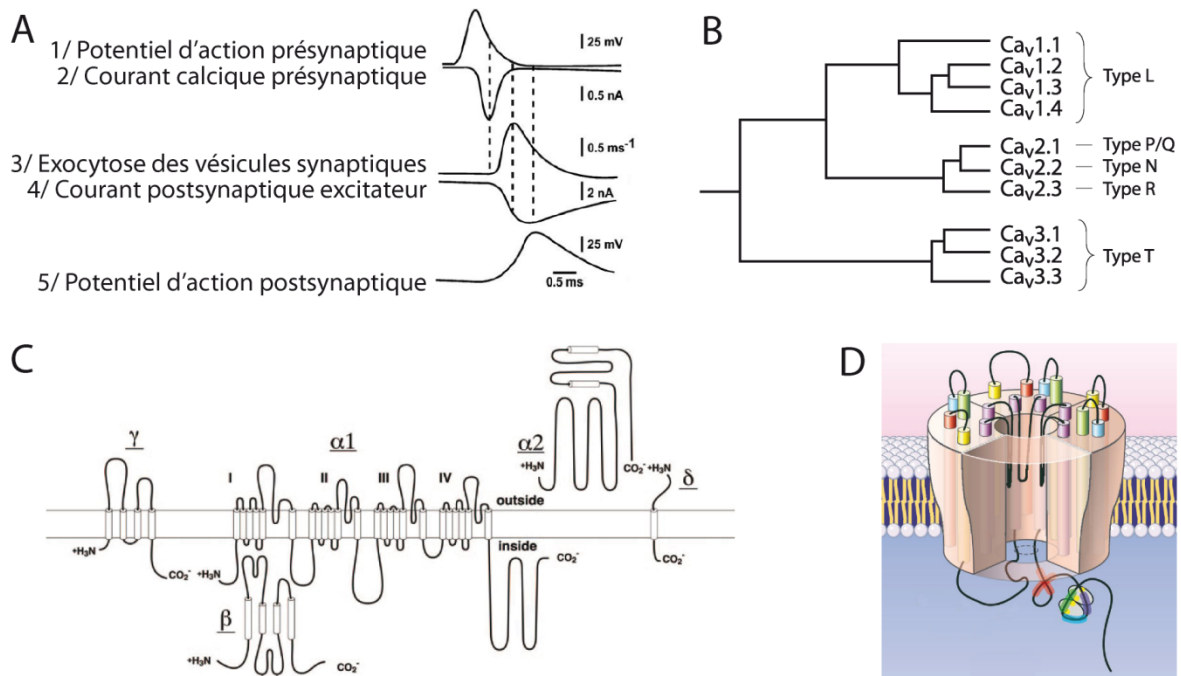
précisément, il a été découvert que le domaine C2 de Synaptotagmine1 était capable d'induire une forte courbure de la membrane autour du complexe SNARE, ce qui permettrait la fusion vésiculaire (Martens et al., 2007).



**Figure 11 : La fonction des SNAREs dans la maturation des vésicules synaptiques.**

**A) Vésicule synaptique proche de la membrane plasmique dont les SNAREs ne sont pas assemblés. B) Vésicule synaptique ayant fusionné avec la membrane plasmique. Les SNAREs vésiculaires et membranaires sont assemblés. C) Les SNAREs sont assemblés en un faisceau d'hélices. En bleu : Synaptobrevine2, en rouge : Syntaxine1, en vert : SNAP-25, en jaune : une protéine inconnue. Modifié d'après Chapman, 2008 et Jahn et Scheller, 2006.**

Les courants calciques sont connus pour véhiculer des informations physiologiques dans de nombreux types cellulaires (par exemple la contraction dans les muscles ou encore l'extension/rétractation du cône de croissance axonal dans le processus de maturation des neurones (Fields et al., 1993)). Dans les synapses, les canaux calciques dépendants du voltage initient la libération synchrone des neurotransmetteurs en réponse à la dépolarisation membranaire provoquée par un potentiel d'action présynaptique (Figure 12A<sub>1/2/3</sub>) (Augustine et al., 1985). La famille des canaux calciques dépendants du voltage compte chez les mammifères dix membres (Figure 12B) qui jouent chacun un rôle distinct dans la transduction des signaux (Catterall et al., 2005). Chaque canal est composé de quatre à cinq sous-unités (Figure 12C et D) : une sous-unité principale  $\alpha$ -1 qui forme le pore et des sous-unités auxiliaires  $\beta$ ,  $\alpha$ -2- $\delta$  et  $\gamma$  dont le rôle est de moduler la sous-unité principale (Dolphin, 2003a). Dans la plupart des synapses, les canaux calciques responsables de la transmission synaptique rapide sont des canaux de type P/Q (Cav2.1) et/ou N (Cav 2.2) (Sudhof, 2004). L'augmentation de la concentration en calcium présynaptique qui découle de leur ouverture est déterminante car elle contrôle la neurotransmission et influence la probabilité de libération. De ce fait, tout phénomène (traitement pharmacologique, mutation génique, etc.) qui altérerait l'entrée des ions  $\text{Ca}^{++}$ , ou par extension qui empêcherait le bon déroulement du cycle des vésicules, est susceptible de modifier la libération des neurotransmetteurs. Nous aborderons brièvement ce point dans la seconde partie de l'introduction, qui traite d'un cas pathologique touchant le système nerveux central, le retard mental.



**Figure 12 : Les canaux calciques dans la transmission synaptique.**

**A) Détail de la séquence d'évènement ayant lieu lors de la transmission synaptique et les phénomènes électriques associés. D'après Sudhof, 2004. B) La famille des canaux calciques dépendants du voltage compte trois sous-familles : Cav1, Cav2 et Cav3. D'après Catterall et al., 2005. C) Exemple de structure secondaire des sous-unités qui composent les canaux calciques dépendants du voltage de type Cav1 et Cav2. Les hélices alpha sont illustrées par des cylindres. D'après Catterall et al., 2005. D) Exemple de structure tertiaire d'un canal de type Cav1. D'après Halling et al., 2005.**

### *Élément postsynaptique, récepteurs ionotropiques et métabotropiques*

L'élément postsynaptique, qui correspond anatomiquement aux dendrites et épines dendritiques, est en charge de recevoir et d'intégrer le message chimique provenant des neurones en amont et de le transformer en message électrique. Ce rôle est assuré par les récepteurs postsynaptiques, qui constituent de ce fait l'élément central autour duquel tout le compartiment postsynaptique est organisé. Les récepteurs sont entourés par des protéines d'échafaudage dont les rôles sont divers, puisqu'elles sont impliquées aussi bien dans l'architecture protéique, que dans le trafic des récepteurs ou la régulation du cytosquelette. L'ensemble de toutes ces protéines est regroupé sous le terme de densité postsynaptique (Vessey et Karra, 2007).

Suite à l'exocytose présynaptique, les neurotransmetteurs peuvent entraîner une action directe lorsqu'ils se fixent sur des récepteurs postsynaptiques ionotropiques (ou récepteurs canaux) ou une action indirecte lorsqu'ils se fixent sur des récepteurs métabotropiques (ou récepteurs couplés aux protéines G). Ces deux types de récepteurs ont des fonctions différentes car ils fonctionnent sur des mécanismes d'action différents : les récepteurs ionotropiques sont impliqués dans la

neurotransmission rapide, nécessaire à des comportements rapides précis comme par exemple un mouvement de réflexe, alors que les métabotropiques sont impliqués dans une neurotransmission plus lente qui joue par exemple sur la régulation de l'excitabilité des neurones. Dans les deux cas, le processus de neurotransmission entraîne l'ouverture de canaux ioniques postsynaptiques capables de modifier les propriétés électriques locales de l'élément postsynaptique (Figure 12A<sub>4/5</sub>).

Les récepteurs ionotropiques sont composés d'un ensemble de sous-unités assemblées en une macromolécule. Ils possèdent un domaine extracellulaire formant le récepteur spécifique à un neurotransmetteur et un domaine transmembranaire organisé en pore qui peut passer d'un état « fermé » lorsqu'il est au repos, à un état « ouvert » lorsqu'il est activé. Ce changement d'état correspond à un changement conformationnel du canal, qui survient lors de la fixation du neurotransmetteur sur le récepteur (transition fermé → ouvert) et lors de la désensibilisation du récepteur et/ou la recapture du neurotransmetteur (transition ouvert → fermé). Lorsque le canal est ouvert, le passage de certains ions entre les milieux intra- et extracellulaires est rendu possible.

A la synapse entre les interneurons de la couche moléculaire et les cellules de Purkinje, le neurotransmetteur libéré est le GABA (Briatore et al., 2010). Celui-ci va se fixer sur le récepteur ionotropique GABA<sub>A</sub>, hétéropentamère composé à ces synapses principalement des sous-unités  $\alpha 1\beta\gamma 2$  (où  $\beta x$  correspond à l'un des trois variants de la sous-unité  $\beta$ ) (Pörtl et al., 2003), dont la conductance est sélective pour les ions Cl<sup>-</sup>.

Les récepteurs métabotropiques sont des monomères à 7 domaines transmembranaires dont le domaine extracellulaire forme le récepteur du neurotransmetteur et dont le domaine intracellulaire se lie avec une protéine G trimérique (sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ). La fixation du neurotransmetteur entraîne une série d'événements en cascade : 1) la transduction du récepteur métabotropique, c'est-à-dire son activation par remplacement d'une molécule de GDP en une molécule de GTP, 2) la séparation de la protéine G du reste du récepteur, 3) la scission de la sous-unité  $\alpha$  des sous-unités  $\beta/\gamma$  et 4) la fixation d'une de ces sous-unités sur un canal ionique pour contrôler son ouverture. A la synapse entre les fibres parallèles et les interneurons de la couche moléculaire, le glutamate libéré va se fixer sur des récepteurs ionotropiques AMPA et NMDA, mais également sur un récepteur métabotropique mGluR<sub>1a</sub>. La stimulation de ce récepteur induit l'augmentation de la fréquence de l'activité synaptique inhibitrice spontanée reçue par les cellules de Purkinje (Karakossian et Otis, 2004).

### *Synaptogenèse dans le système nerveux central*

La formation des synapses nécessite une myriade de facteurs pour activer les voies de signalisation impliquées. Parmi eux, les molécules d'adhésion (CAMs, cell-surface adhesion molecules) ont pour fonction d'induire l'assemblage des futurs compartiments pré- et postsynaptiques (pour revue : Waites et al., 2005). Par exemple, les Neuroligines localisées à la membrane postsynaptique sont capables par transactivation d'entraîner la formation de l'élément présynaptique, en particulier par la constitution des zones actives (Scheiffele et al., 2000). Leur partenaire présynaptique  $\beta$ -Neurexine provoque la différenciation postsynaptique en induisant la formation des regroupements de protéines d'échafaudage et de différents récepteurs postsynaptiques (Graf et al., 2004). Chez l'homme, une altération de ce couple de protéines suite à une mutation génique peut entraîner des troubles mentaux comme un syndrome autistique (Südhof, 2008). En effet, nous verrons dans un second temps que les altérations des synapses sont souvent associées à des cas de retards mentaux, et que ces modifications peuvent avoir lieu au moment du développement du réseau neuronal.

Suite à la phase d'induction, la phase de maturation des synapses permet qu'elles accroissent leur taille et affinent leur fonction. Il est important de noter que celle-ci se fait simultanément entre l'élément pré- et postsynaptique (Schikorski et Stevens, 1997). Du côté présynaptique cela correspond à une augmentation du volume, du nombre de vésicules et de zones actives, et du côté postsynaptique à une augmentation de la densité postsynaptique, du recrutement des récepteurs et pour les synapses excitatrices à la formation et à l'augmentation du volume de la tête de l'épine dendritique (Waites et al., 2005). En parallèle au développement morphologique, on observe un développement fonctionnel des synapses. Le recrutement des récepteurs postsynaptiques et leur changement de composition en sous-unités implique des modifications des conductances des courants. Par exemple dans l'hippocampe la sous-unité NR2B du récepteur NMDA est partiellement remplacée par NR2A, impliquant la diminution de la durée des courants transitant par ce récepteur (Sorra et Harris, 2000). Un autre exemple frappant observé dans le cervelet concerne le changement de conductance du récepteur  $GABA_{A\alpha}$ , d'une conductance dépolarisante pendant le développement à une conductance hyperpolarisante à l'âge adulte. Ce changement n'est pas dû à la composition du récepteur en lui-même, mais au remplacement d'un transporteur d'ions chlorures, qui conduit au changement des concentrations intra- et extracellulaires de cet ion et donc au déplacement du potentiels d'équilibre en résultant (pour revue : Ben-Ari, 2002).



L'essentiel de la synaptogenèse a lieu durant le développement, mais des synapses peuvent également se former dans un système mature. A tous les âges, l'activité neuronale sculpte le réseau en créant, en renforçant ou en éliminant certains contacts synaptiques. Par exemple, une étude montre que la stimulation d'une unique vibrisse de rongeur *in vivo* durant 24h augmente le nombre et le volume des synapses excitatrices et inhibitrices du cortex en baril (Knott et al., 2002). Ce phénomène est réversible puisque plusieurs jours après l'arrêt de la stimulation, les valeurs reviennent à des niveaux comparables à ceux observés avant stimulation. Cette expérience illustre bien l'existence d'une plasticité morphologique survenant à l'âge adulte. Mais les synapses matures sont également capables d'exercer une plasticité fonctionnelle. Dans le cervelet, la synapse entre la fibre parallèle et les cellules étoilées est capable de changer son efficacité synaptique par des mécanismes de dépression à long terme (LTD) et de potentialisation à long terme (LTP) (Rancillac et Crépel, 2004). Ce phénomène modifie l'activité des interneurons sur une longue période, et aux vues de leur connectivité avec les cellules de Purkinje, serait susceptible de modifier l'information sortant du cervelet.

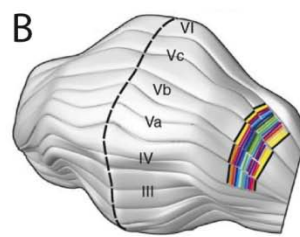
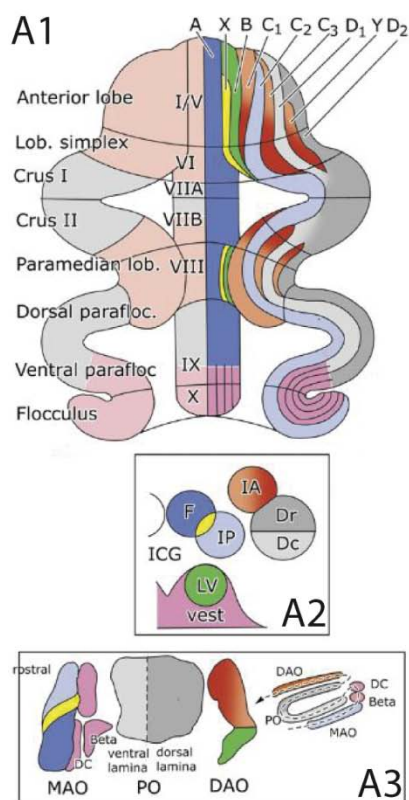
#### **1.4. Organisation modulaire du cervelet**

Les patrons d'organisation en zones topographiques sont fréquemment rencontrés dans le système nerveux (par exemple les colonnes de dominance oculaire ou les aires somatosensorielles du cortex cérébral). Ces patrons reposent sur une macro-architecture cellulaire, une organisation des projections afférentes et efférentes, soulignées par l'expression de marqueurs moléculaires variés (pour revue : Herrup et Kuemerle, 1997). Il en va de même pour le cervelet. Son organisation rostrocaudale est reconnue depuis plusieurs décennies car elle est basée sur la compartimentalisation des projections des cellules de Purkinje d'un territoire précis, sur un noyau profond précis (c'est-à-dire du vermis vers le noyau fastigial, des hémisphères intermédiaires vers le noyau interposé et des hémisphères latéraux vers le noyau dentelé) (Chambers et Sprague, 1955) (cf. [Figure 6](#)). Sur la base de cette organisation longitudinale, une distribution plus détaillée d'une dizaine de zones parasagittales a pu être mise en évidence par le patron d'expression de nombreux gènes (Glickstein et al., 2011). De la même manière, les projections des fibres grimpantes définissent ce que l'on appelle communément des « microzones » (Andersson et Oscarsson, 1978 ; Apps et Garwicz, 2005) ([Figure 13A](#)), qui peuvent être extrêmement étroites, ne comprenant que quelques cellules de Purkinje, comme étendues sur plusieurs folia (Jörntell et al., 2010).

Elles sont elle-même subdivisées en centaines de bandes parasagittales, pouvant par exemple être délimitées par les afférences moussues (Ekerot et Jörntell, 2003).

### 1.4.1. Compartimentalisation des afférences et efférences du cervelet

Les compartiments du cervelet suivent une organisation topographique. Chacun de ces compartiments est composé d'une bande longitudinale de cellules de Purkinje, dont les efférences se prolongent dans la substance blanche jusque sur le noyau profond (ou vestibulaire) correspondant (Armstrong et Hawkes, 2000).



**Figure 13 : Compartimentalisation des afférences et efférences du cortex cérébelleux.**

**A1) Diagramme du cortex cérébelleux déployé de rat, présentant l'organisation modulaire du cervelet. Chacune des zones (A-D2) de cellules de Purkinje**

**projette vers un noyau profond particulier (panneau A2) ; ces deux dernières reçoivent chacune des afférences olivaires de régions précises du noyau de l'olive inférieure (panneau A3). Ces interactions sont représentées par des zones de même couleur. Beta : groupe beta de l'olive accessoire médiane, DAO : olive accessoire dorsale, Dc : noyau dentelé caudoventral, DC : dorsal cap, Dr : noyau dentelé rostrodorsal, F : noyau fastigial, IA : noyau interposé antérieur, ICG : groupe des cellules interstitielles, IP : noyau interposé postérieur, LV : noyau vestibulaire latéral, MAO : olive accessoire médiane, PO : Olive principale, Vest : noyau vestibulaire. D'après Glickstein et al., 2011. B) Représentation du cervelet de chat où chaque zone colorée représente une microzone. D'après Jörntell et al., 2010.**

De la même manière, chaque bande de cellules de Purkinje reçoit des afférences des fibres grimpantes organisées en faisceaux parallèles, de sorte que ces branchements aient lieu principalement dans une même bande parasagittale (Armstrong et al., 1973). Ainsi, les afférences provenant d'une aire précise de l'olive inférieure émettent d'une part une collatérale qui emprunte le circuit direct vers le noyau profond correspondant, et d'autre part contacte les cellules de Purkinje en remontant dans le circuit corticocérébelleux précis qui projette vers la même zone de noyau profond que celle du circuit direct (Ruigrok et Voogd, 2000). Comme illustré sur la [Figure 13A](#), on peut définir trois microzones dans le vermis (A, X et B) et sept dans les hémisphères (C1-3, D1-2 et Y).

Par exemple, les cellules de Purkinje de la zone C1 projettent dans le noyau interposé et seront innervées par les fibres grimpances précises émettant une collatérale au même endroit du noyau profond.

Les afférences moussues, et en particulier les afférences spinocérébelleuses, cunéocérébelleuses, réticulocérébelleuses, et pontocérébelleuses, projettent également en bandes parasagittales sur les cellules granulaires (Voogd et Glickstein, 1998). Les fibres afférentes grimpances et moussues ont des origines distinctes, et sont connues pour avoir une organisation spatiale différente. Or, il a été démontré qu'elles partageaient un même champ récepteur, et un même patron d'innervation sur les cellules de Purkinje (Ekerot et Jörntell, 2003 ; Pijpers et al., 2008), mais qui n'est pas uniformément superposable.

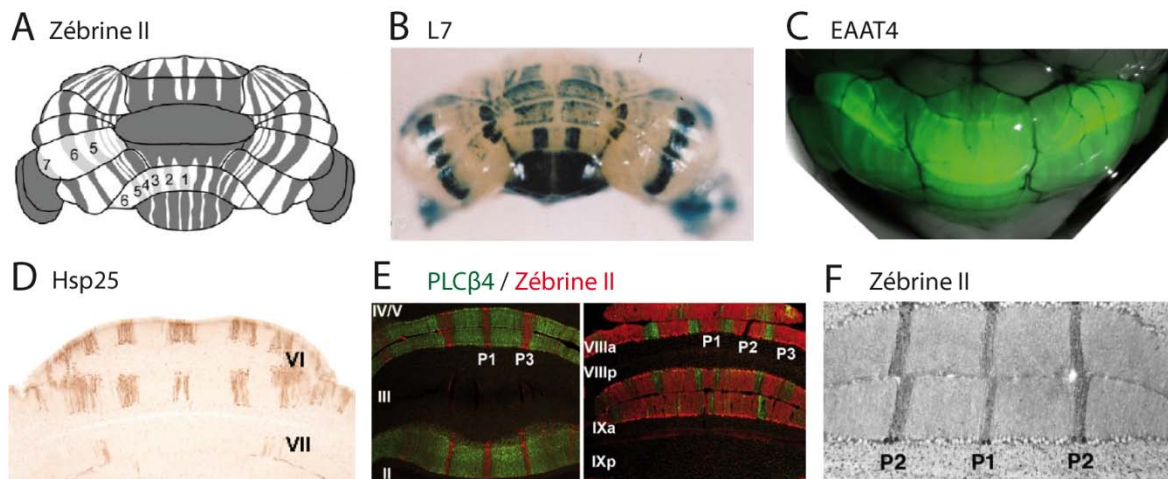
Cette organisation des différentes voies anatomiques est renforcée par leur correspondance avec les patrons d'expression de certains gènes (Herrup et Kuemerle, 1997) décrits ci-après.

#### **1.4.2. Marqueurs moléculaires au patron « zébré »**

En plus de la compartimentalisation des afférences et efférences, les cellules de Purkinje elles-mêmes ont une identité propre qui fait qu'elles ne sont pas toutes équivalentes. En effet, bien qu'elles paraissent homogènes au sein du cervelet, des techniques d'immunomarquage ont montré qu'elles étaient biochimiquement différentes. Depuis la découverte du premier marqueur moléculaire exprimé selon un patron « zébré » (l'enzyme 5'-nucléotidase) par Scott en (Scott, 1963), une centaine d'autres marqueurs, répartis en sept bandes parasagittales ont été décrits sur le cervelet adulte ([Figure 14A](#)). Ces marqueurs sont de nature très hétérogène puisqu'ils peuvent aussi bien être des enzymes (par exemple l'acétylcholinestérase (Boegman et al., 1988)), que des récepteurs membranaires (par exemple le récepteur au NGF à basse affinité, LNGF-R (Koh et Higgins, 1991)) ou des petits peptides (par exemple la motiline (Chan-Palay et al., 1981)).

Parmi eux, deux marqueurs ont été particulièrement explorés. En effet, deux anticorps mis au point dans le laboratoire de Richard Hawkes (Hawkes et Leclerc, 1987) mettent en évidence des bandes parasagittales alternant ces deux marqueurs, qui seront par la suite appelés zébrine-I (anticorps Q155) et Zébrine-II (anticorps Q113). Le patron d'expression de ces marqueurs, comme indiqué sur la [Figure 14](#), met en évidence une bande médiane de cellules de Purkinje Zébrine-II positive et Zébrine-I négative, appelée

P1+, flanquée de deux zones Zébrine-II négatives et Zébrine I positives appelées P1-. Ainsi, tout le long du cortex cérébelleux, on retrouve au total sept bandes bilatérales Zébrine-II positives (P1+ à P7+) en alternance avec des bandes Zébrine-I positives (P1- à P7-). Du fait de sont expression chez de nombreuses espèces allant du poisson aux mammifères (Brochu et al., 1990), la zébrine la plus étudiée est Zébrine-II, ce qui en fait le chef de file de la grande famille des « zébrines ».



**Figure 14 : Expression de différentes zébrines, en bandes parasagittales dans le cervelet.**

A) Schéma d'une vue dorsale du cervelet adulte de souris, illustrant la compartimentalisation rostrocaudale et médiolatérale du cortex cérébelleux. Les zones grises représentent l'expression de Zébrine II et les zones claires l'expression de Zébrine I. La nomenclature des bandes Zébrine II positives (P1+ à P7+) est représentée par les chiffres (1 à 7 sur le schéma). D'après Armstrong et Hawkes, 2000. B) Expression de la protéine L7-LacZ sur un cervelet entier de souris durant le développement, à P11. D'après Voogd, 2010. C) Expression du transporteur du glutamate EAAT4-GFP sur un cervelet de souris à P40. D) Immunodétection à la peroxydase de la protéine Hsp25 sur coupe de cervelet de souris. D'après Armstrong et Hawkes, 2000. E) Expression de Zébrine II (rouge) et Plcβ4 (vert) dans le cervelet de souris, au niveau antérieur à gauche et postérieur à droite. Ces deux protéines ont un patron complémentaire. D'après Sillitoe et al., 2009. F) Marquage immunocytochimique dirigé contre la protéine Zébrine II sur une section de cervelet adulte de souris. On peut observer ici les bandes P1+ et P2+ au niveau du lobule III dans le lobe antérieur du vermis. D'après Ahn et al., 1994.

Zébrine-II est une enzyme participant à la glycolyse, l'aldolase C (Ahn et al., 1994), qui catalyse l'hydrolyse du fructose-1,6-biphosphate en dihydroxyacetone phosphate et glycérol-3-phosphate. Ce qu'il est remarquable de noter, c'est que le patron d'expression de Zébrine-II coïncide avec la compartimentalisation des fibres grimpantes (Gravel et al., 1987; Voogd et al., 2003). Plus généralement, on peut remarquer une forte relation entre l'organisation anatomique et le patron d'expression de certaines zébrines, c'est-à-dire entre les afférences et efférences, et les bandes de marqueurs moléculaires. Pour illustrer ceci, nous pouvons mentionner par exemple brièvement, que la zone A vermiale est délimitée par P1+/P1- dans le lobe antérieur, ou que la zone C2 est

délimités par P5+. En plus de cette segmentation anatomique des afférences grimpantes par rapport au patron zébré, il est démontré que les propriétés synaptiques sont différentes entre les bandes Zébrine-II positives et négatives. En effet, les fibres grimpantes des bandes Zébrine-II positives possèdent un pool de vésicules directement libérables plus grand, sont capables de soutenir une forte libération multivésiculaire et produisent des courants synaptiques de plus grande amplitude (Paukert et al., 2010).

Ainsi, à la segmentation anatomique et chimique des cellules de Purkinje et de certaines afférences s'ajoute également une segmentation fonctionnelle, qui est susceptible d'être observée pour certains autres types cellulaires de cervelet comme par exemple les interneurons de la couche moléculaire.

### **1.4.3. Compartimentalisation des interneurons de la couche moléculaire**

Une partie de mon travail de thèse, décrite dans la deuxième partie du présent manuscrit, a eu pour but d'approfondir nos connaissances concernant la segmentation fonctionnelle des interneurons de la couche moléculaire suivant les bandes parasagittales du cervelet ([Publication 2](#)). En effet, il est connu que les interneurons de la couche moléculaire voisins forment un réseau (Kondo et Marty, 1998), ce réseau s'inscrirait de manière prédominante dans une même microzone parasagittale (Jörntell et al., 2010) ([Figure 13B](#)). De plus, il est démontré que le champ récepteur de ces réseaux d'interneurones est strictement superposable à celui des fibres grimpantes (Jörntell et Ekerot, 2002, 2003b), et ceci dans des compartiments précisément délimités. Récemment, une étude fonctionnelle *in vivo* menée par le groupe de Ebner, utilisant des techniques d'imagerie dynamique, montre que l'activation de l'inhibition de la couche moléculaire par stimulation d'un faisceau de fibres parallèles, ne s'activait pas de manière homogène, mais suivant les zones parasagittales (Gao et al., 2006).

Ainsi une ou plusieurs bandes longitudinales de cellules de Purkinje fonctionnellement liées, c'est-à-dire comprenant leurs efférences vers les noyaux profonds, leurs afférences grimpantes et moussues, les différents types cellulaires du cortex cérébelleux, et identifiables par des marqueurs moléculaires particuliers forment ce que l'on appelle communément un module. Ces modules sont considérés comme l'unité fonctionnelle corticonucléaire du cervelet. Cette organisation modulaire est remarquablement reproduite entre les espèces, ce qui suggère qu'elle a été conservée au cours de l'évolution et est donc probablement nécessaire au bon fonctionnement du cervelet. De ce fait, tenant compte de l'importance des interneurons de la couche moléculaire dans

la modulation de l'activité du cervelet, ainsi que l'importance des modules dans le fonctionnement cérébelleux, il apparaît intéressant d'étudier la compartimentalisation de ces cellules dans le cortex en fonction des bandes parasagittales.

## **1.5. Grandes fonctions du cervelet**

Depuis plus de 200 ans, les études cliniques ont montré que les lésions du cervelet affectaient les mouvements, générant par exemple des ataxies. Ces symptômes peuvent dans certains cas être accompagnés de symptômes cognitifs (par exemple des retards d'apprentissage moteurs et des retards d'apprentissage du langage) (Glickstein et al., 2009). Par manque de preuves expérimentales, le rôle du cervelet dans la cognition fut longtemps ignoré, laissant place uniquement à l'étude des fonctions motrices. Cependant, ces dernières années, des études cliniques utilisant des techniques de neuroimagerie ont permis d'accumuler des preuves confortant de plus en plus de chercheurs dans l'idée d'un rôle du cervelet dans certaines fonctions cognitives. Cette section a pour but d'évoquer très brièvement ces deux grandes fonctions cérébelleuses, en insistant sur les fonctions cognitives qui sont moins bien connues à ce jour.

### **1.5.1. Fonctions motrices du cervelet**

Une tâche motrice à première vue très simple, comme par exemple prendre un verre d'eau avec la main, requiert un traitement complexe de nombreuses informations qui sont capitales pour commander la séquence motrice appropriée aux muscles du bras et de la main. En particulier dans cet exemple, cela concerne des informations visuelles pour repérer l'emplacement de l'objet, des informations proprioceptives pour évaluer la position de son propre corps dans l'environnement et des informations tactiles pour sentir le contact de l'objet dans le but de le saisir. De manière plus générale, le cervelet intervient dans la modulation de la séquence motrice nécessaire au maintien de l'équilibre et de la posture, à la planification d'un mouvement, la coordination motrice, l'apprentissage moteur et à certains mouvements réflexes des yeux (ces fonctions sont décrites précisément dans (Kandel et al., 2000)). Il est d'ailleurs supposé que l'activité des cellules de Purkinje assure la réalisation de ces fonctions par le moyen d'un codage temporel de leur patron de décharge.

### 1.5.2. Fonctions cognitives du cervelet

Bien que le cervelet ne soit assurément pas le point central des fonctions supérieures, telles que le langage, la mémoire, la capacité de raisonnement, il est néanmoins reconnu comme une structure essentielle à leur bon fonctionnement. Initialement, l'étude du cervelet a été gouvernée par l'intérêt de ses rôles dans le contrôle moteur. Cependant, les toutes premières études cliniques physiologiques et comportementales mettaient déjà en évidence des dysfonctionnements cognitifs chez des patients présentant des lésions cérébelleuses, comme des retards d'apprentissage du langage chez des enfants ou un déficit d'apprentissage de tâches associatives simples (pour revue : Glickstein et al., 2009). Ces dernières années, la question des mécanismes possiblement impliqués dans des fonctions de nature non motrices a pu être spécifiquement posée.

L'une des premières observations impliquant le cervelet dans les fonctions cognitives est fondée sur une constatation phylogénétique. En effet le vaste développement des hémisphères cérébelleux et du noyau dentelé chez les primates et en particulier chez l'homme (Leiner et al., 1986) (cf. [Figure 5](#)) suggère que ces deux structures soient nécessaires à l'application de fonctions supérieures dont seuls les humains disposent. Cette observation a été complétée par des preuves anatomiques, cliniques et surtout d'imagerie sophistiquée comme l'imagerie par résonance magnétique et l'imagerie fonctionnelle.

Des études anatomiques ont par exemple démontré que la région dorsale du noyau dentelé projette vers les cortex moteur et prémoteur, alors que la région ventrale projette vers les cortex préfrontal et pariétal, qui sont des régions impliquées dans la cognition (Dum et Strick, 2003). Ceci nous indique que le cervelet est connecté par des voies distinctes à des aires motrices d'une part et associatives d'autre part, et sous-entend son implication à la fois dans les fonctions motrices et cognitives. Pour conforter cette idée, des études comportementales et fonctionnelles ont montré que le noyau dentelé semblait particulièrement impliqué dans les processus d'acquisition et de traitement des informations sensorielles pour des tâches nécessitant un jugement spatial et temporel, tous deux essentiels à la planification de séquences motrices complexes (Kandel et al., 2000).

Au vu du fonctionnement modulaire du cervelet, il était intéressant de vérifier si les résultats obtenus sur les noyaux profonds et leurs projections cités ci-dessus étaient également observés au niveau du cortex cérébelleux. Et en effet, une étude fonctionnelle récente a pu montrer que certaines aires cortico-cérébelleuses du lobe

postérieur ont un rôle avéré dans le langage, la mémoire verbale ou encore les processus émotionnels, qui sont indépendantes des aires cérébelleuses sensorimotrices (Stoodley et Schmahmann, 2009). Ces aires cortico-cérébelleuses indentifiées comme purement cognitives sont organisées en boucles de régulation impliquant les voies anatomiques cérébro-cérébelleuses passant principalement par le noyau dentelé. Un exemple de connectivité implique les cellules de Purkinje de Crus II, qui reçoivent des afférences de l'aire préfrontale dorsolatérale 46, et renvoient leurs projections dans cette même zone préfrontale (Kelly et Strick, 2003). Ce circuit de régulation doit être fortement impliqué dans la fonction cognitive puisque l'aire corticale 46 joue un rôle essentiel dans des fonctions supérieures telles que la planification, la mémoire de travail, le maintien de l'attention ou la régulation de l'action. Des lésions de cette zone peuvent altérer la mémoire à court terme et entraîner des difficultés d'inhibition, de jugement, et de planification. Il serait donc tentant de penser que des altérations de cette boucle, au niveau du cervelet, des voies impliquées, ou des noyaux profonds modifie le traitement correct de l'information par cette zone corticale.

Ainsi, ces quelques exemples nous permettent de penser que le cervelet doit exercer une influence modulatrice des fonctions cognitives. Pour plus de détails, le lecteur intéressé pourra entre autre consulter les revues suivantes : (Leiner et al., 1986; Schmahmann et Sherman, 1998; Steinlin, 2008).

## **2. Etude d'un cas pathologique : le retard mental**

Dans les pays développés, le retard mental est la cause la plus fréquente de handicap sévère chez l'enfant et représente aujourd'hui un des plus grands défis auxquels sont confrontés les cliniciens. La prévalence du retard mental est estimée entre 1 et 3 % de la population générale (Mandel et Chelly, 2004), bien que ces chiffres soient en perpétuelle évolution du fait de l'amélioration récente des techniques de dépistage et de sensibilisation. En Europe centrale, environ 8 % des dépenses de soins sont consacrées aux handicaps mentaux, ce qui dépasse de loin le coût de chacune des autres catégories de troubles répertoriés (Ropers et Hamel, 2005). La charge morale et financière qu'il représente pour les familles et la société, font du retard mental l'un des problèmes les plus préoccupants de la médecine moderne.

La grande complexité du retard mental réside dans le fait que cette pathologie est multiple, divisée en dizaines de syndromes, tous différents. Différents de par leur étiologie, de par leur manifestation, de par leur identification. Heureusement, tous les

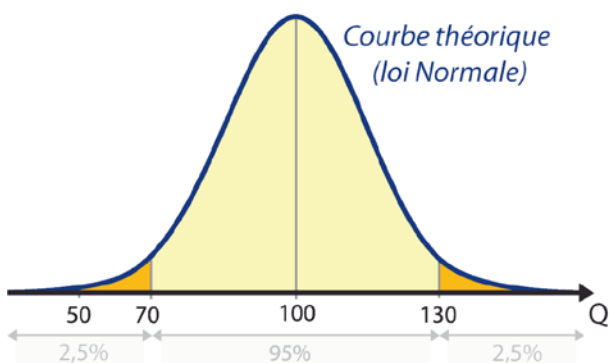


cas ne sont pas isolés, ce qui a permis aux cliniciens d'étudier des cohortes sensiblement homogènes de patients et d'arriver à faire ressortir une classification, à mettre en évidence les causes génétiques pouvant engendrer un retard mental, et dans certains cas les processus cellulaires et moléculaires pathologiques qu'elles sous-tendent.

## 2.1. Généralités : définition et diagnostique

Bien que ceci soit ouvert à la controverse, l'Association Américaine de Psychiatrie (American Psychiatric Association, APA) définit le retard mental comme une pathologie caractérisée par trois critères symptomatiques : « *La caractéristique essentielle du retard mental est un fonctionnement intellectuel général significativement inférieur à la moyenne (critère A), qui s'accompagne de limitations significatives du fonctionnement adaptatif dans au moins deux des secteurs d'aptitude suivants : communication, autonomie, vie domestique, aptitudes sociales et interpersonnelles, mise à profit des ressources de l'environnement, responsabilité individuelle, utilisation des acquis scolaires, travail, loisirs, santé et sécurité (critère B). Le début doit survenir avant l'âge de 18 ans (critère C).* » (APA, 2004).

Le fonctionnement intellectuel est communément évalué par des tests de Quotient Intellectuel (QI) normalisés, comme par exemple le test de Binet-Stanford ou encore les échelles de Wechsler, dont le but est de déterminer un score de QI à un questionnaire individuel. Ce dernier test est aujourd'hui le plus employé. Il classe les résultats obtenus suivant une distribution statistique où 100 représente la moyenne de la population générale et 70 la limite sous laquelle un retard mental sera diagnostiqué (Figure 15). Le test permet également de prendre en considération le degré de sévérité reflétant le niveau de déficit intellectuel. Ainsi, pour des QI entre 55 et 70 on observe un retard mental léger, entre 40 et 55 un retard mental moyen, entre 25 et 40 un retard mental grave et pour des niveaux inférieurs un retard mental profond.



**Figure 15 : Prévalence des retards mentaux.** En admettant que la distribution du quotient intellectuel (QI) de la population générale suive une Loi Normale, la prévalence théorique des retards mentaux ( $QI < 70$ ) devrait atteindre 2,5%. Cependant, les études épidémiologiques révèlent un excès de cas de retards mentaux par rapport à ces valeurs théoriques. Adapté d'après Chelly, 2000.

Plus que des scores de QI faibles, ce sont préférentiellement les altérations du fonctionnement adaptatif qui sont prises en compte comme symptômes d'un retard mental. Ce terme fait référence à la capacité de l'individu à ajuster son comportement dans des conditions de la vie quotidienne et en société, le diagnostic étant établi comparativement à des individus du même groupe d'âge. Ces deux critères doivent bien entendu prendre en considération le contexte socioculturel de l'individu, son niveau d'étude, les handicaps associés ou encore sa motivation à réaliser un test, et en conséquence choisir une évaluation adaptée. En effet, les sujets atteints de retard mental ont une prévalence de trois à quatre fois plus élevée que la population générale à développer des troubles mentaux associés. Ceux-ci peuvent se décliner en comportements divers, puisque certains individus seront de type passif alors que d'autres plutôt impulsifs, voir agressifs, d'autres présenteront des troubles de l'attention, une hyperactivité, des troubles de l'humeur ou bien encore des difficultés motrices (APA, 2004).

Les causes du retard mental sont extrêmement hétérogènes et dans la moitié des cas ne sont pas identifiées. Parmi celles qui sont bien identifiées, l'étiologie est environnementale ou génétique (pour plus de détails, voir le tableau 1 de Humeau et al., 2009). Les causes environnementales comprennent par exemple la malnutrition durant la grossesse, les ischémies cérébrales périnatales, le syndrome d'alcoolisme fœtal et de manière générale toute contamination par des éléments neurotoxiques ou infectieux. En ce qui concerne les causes d'origine génétique, elles représentent près de la moitié des cas identifiés. Les anomalies chromosomiques comme les aneuploïdies ou les microdélétions sont fréquentes (par exemple le syndrome de Down atteint 1,2 nouveaux nés sur 1000) et les mutations monogéniques comptent plusieurs centaines de gènes candidats déjà référencés.

Historiquement, les formes génétiques de retard mental sont regroupées en deux catégories : les formes dites syndromiques, qui sont associées à des manifestations cliniques, anatomiques, métabolique ou biologiques visibles, et les non-syndromiques dont le seul symptôme est la déficience cognitive. Deux tiers des cas seraient identifiés comme étant non-syndromiques contre un tiers de syndromiques, cependant aujourd'hui ces deux catégories tendent à être contrebalancées, car beaucoup des formes syndromiques étaient préalablement considérées comme non-syndromiques avant qu'un diagnostic clinique n'ait pu être mis en place (Fishburn et al., 1983 ; Frints et al., 2002). Une des explications possibles à ce défaut d'identification réside dans le fait que les patients exprimant des problèmes développementaux complexes à l'origine du

retard mental seraient plus susceptibles de subir un caryotype que les patients ayant un retard mental non-syndromique, d'autant plus que dans un grand nombre de cas, le caractère syndromique n'est apparent que tard dans la vie du patient (Ropers et Hamel, 2005). Ainsi, sans indice évident sur la nature du retard mental pouvant permettre d'orienter les examens, et au vue du coût d'un dépistage sur le génome entier, les retards mentaux non-syndromiques trouvent par conséquent plus rarement leur étiologie.

## **2.2. La génétique des retards mentaux: particularité du chromosome X**

Les processus qui ont permis la compréhension des mécanismes engendrant un retard mental sont sans doute liés au rapprochement entre cliniciens, généticiens, physiologistes et spécialistes en neurosciences cognitives au sein d'organisations multinationales (par exemple The Euro-MRX Consortium). En effet, les cliniciens, au contact direct des patients, ont su regrouper des cohortes de patients afin d'identifier des facteurs communs pouvant être à l'origine des pathologies. La découverte des causes monogéniques comme l'une des origines du retard mental a été accélérée par l'aboutissement du projet de séquençage complet du génome humain. Elle aura également permis la génération d'animaux transgéniques, appelés modèles animaux, invalidés pour un gène lié à une pathologie mentale d'origine monogénique. Ces modèles animaux permettent de reproduire et donc d'étudier les dysfonctionnements observés chez l'Homme, que ce soit au niveau moléculaire, cellulaire, physiologique ou comportemental. Leur étude est donc capitale pour commencer à comprendre les conséquences de l'inactivation de gènes.

Depuis 1890, de nombreuses études rapportent que plus d'hommes que de femmes seraient inscrits dans les institutions spécialisées pour les handicapés mentaux. Il est intéressant de noter que cet écart fut initialement interprété par le fait que les jeunes filles concernées étaient gardées par leurs parents à la maison à cause des préjugés de la société de l'époque (Chelly et Mandel, 2001). Cependant, la découverte de familles entières dont le retard mental atteignait strictement les hommes a progressivement fait lever l'ambiguïté sur le fait que les hommes sont effectivement de 30 à 50 % plus touchés que les femmes par le retard mental et que ces troubles étaient susceptibles d'être causés par des mutations des chromosomes sexuels (Fishburn et al., 1983). Cette différence s'explique par le fait que la majorité de ces mutations du chromosome X sont

récessives, mais les hommes, qui ne possèdent qu'une seule copie du chromosome X, seront affectés de manière prédominante par rapport aux femmes qui elles sont naturellement protégées (Gécz et al., 2009). Durant les années 1970, l'identification du syndrome du X Fragile fut une étape clé de cette découverte. Le grand intérêt suscité par cette forme de retard mental a entraîné la découverte d'autres gènes dans des régions chromosomiques proches et attiré toute l'attention des médecins et des scientifiques presque exclusivement sur le chromosome X. Ce groupe de gènes et les pathologies d'ordre mental qu'ils engendrent sont regroupés sous le terme de retard mental lié au chromosome X (XLMR, X-linked Mental Retardation) (Chelly, 1999).

Les gènes impliqués dans un retard mental lié au chromosome X sont connus pour coder différents types de protéines telles que des facteurs de transcription ou de modelage de l'ADN, des protéines transmembranaires, des protéines du cytosquelette, des effecteurs ou régulateurs de voies de signalisation. Malgré cette apparente diversité, le retard mental peut être vu comme la voie finale de divers processus pathologiques affectant le fonctionnement du système nerveux central. En effet, il est fortement supposé que des altérations dans les voies de signalisation cellulaires et moléculaires au niveau neuronal pourraient sous-tendre ce type de dysfonctionnement cognitif.

### **2.3. Système nerveux central et retard mental**

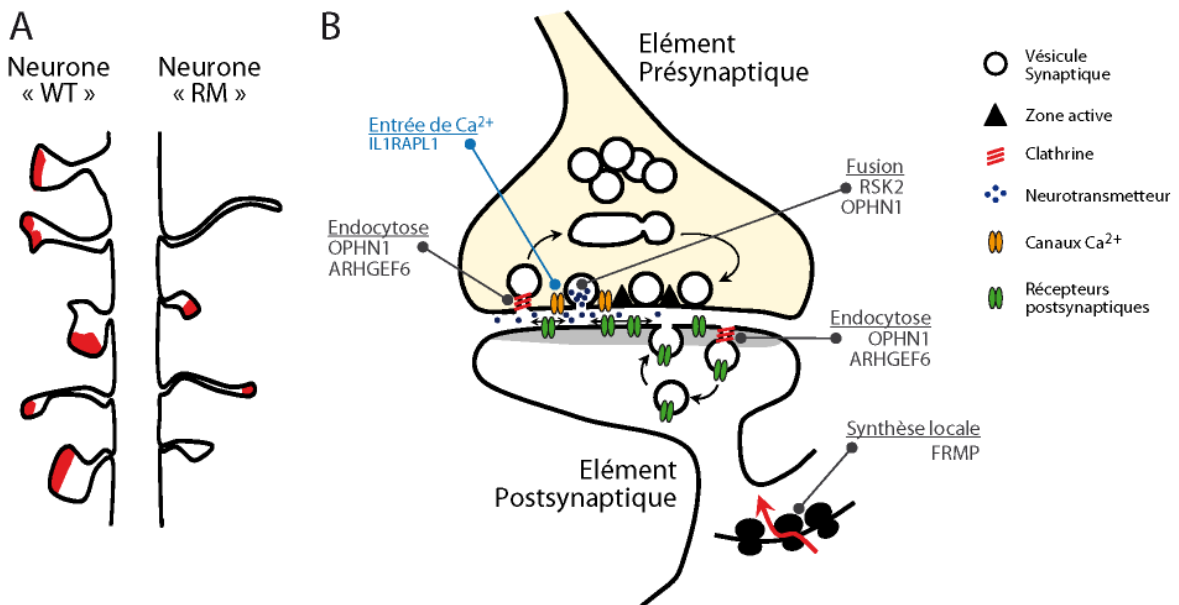
La découverte de la mutation du gène *FMR1* comme cause monogénique du Syndrome du X Fragile (Verkerk et al., 1991), a été l'élément déclencheur ayant poussé à la recherche de la fonction des protéines impliquées dans les pathologies mentales. Ce syndrome est l'une des causes monogéniques les plus courantes de retard mental (incidence 1/5000). L'engouement suscité pour ce domaine de recherche a permis la mise en évidence de dizaines de gènes liés à un retard mental exprimés dans le cerveau, et plus particulièrement au niveau des synapses. FMRP, la protéine produite à partir de *FMR1*, est l'une des protéines qui a été le plus étudié et qui de ce fait illustre probablement le mieux l'importance des aberrations synaptiques dans la physiopathologie des retards mentaux. Elle est impliquée dans le développement des dendrites et dans la fonction synaptique globale où elle assure la traduction rapide des gènes comme par exemple de la protéine PSD-95 (Antar et Bassell, 2003).

De manière plus générale, notre équipe pense que les défauts de régulation dans l'activité synaptique et dans la morphologie des épines dendritiques ou la neurogenèse

seraient des conséquences communes de la mutation d'un grand nombre de gènes à l'origine des désordres mentaux dans leur sens le plus large (Humeau et al., 2009).

### 2.3.1. Hypothèse synaptique du retard mental

A ce jour, près de 300 gènes liés à un retard mental ont été identifiés (Inlow et Restifo, 2004). Beaucoup de ces gènes sont impliqués dans le développement du cerveau (Vaillend et al., 2008), d'ailleurs les formes les plus graves sont souvent associées à des malformations critiques du système nerveux central. Cependant, dans certains cas comme par exemple les retards mentaux non-syndromiques, aucune modification macro-architecturale n'a pu être mise en évidence. Il est alors tentant de penser que ces cas pourraient trouver une explication dans des défaillances plus fines, comme par exemple au niveau des synapses (Humeau et al., 2009). En effet, un grand nombre de ces protéines impliquées dans un retard mental sont précisément enrichies dans les compartiments pré- et postsynaptiques (Humeau et al., 2009). Sur la [Figure 16B](#), sont représentés des exemples de ces protéines synaptiques dont les mutations ont été associées à des formes de retard mental d'origine monogénique.



**Figure 16 : Exemples d'anomalies synaptiques rencontrées lors d'un retard mental.**

**A) Schéma représentant les épines dendritiques classiquement observées chez des animaux sauvages (WT) et chez des modèles animaux de retard mental (RM). Dans ce deuxième cas, les épines dendritiques sont souvent dysmorphiques. B) Illustration d'une synapse typique, où sont représentés des exemples de protéines synaptiques dont les mutations ont été associées à des formes de retard mental d'origine monogénique. Certaines de ces protéines sont connues pour être des acteurs du fonctionnement synaptique. D'après Humeau et al., 2009.**

L'hypothèse de l'origine synaptique des défaillances cognitives est soutenue par des évidences histologiques. Par exemple, l'analyse post-mortem de patients montre dans certains cas des altérations de la forme et de la densité des épines dendritiques (Kaufmann et Moser, 2000) et la gravité de ces altérations serait corrélée à la sévérité du retard mental (Purpura, 1974). De manière intéressante, les altérations dans la morphologie des épines dendritiques sont également présentes dans la plupart des lignées de modèles animaux murins qui ont subi l'invalidation d'un gène lié au retard mental.

#### *Anomalies morphologiques des dendrites et épines dendritiques*

Depuis les années 1970, les techniques de marquage des neurones ont pu mettre en évidence des modifications des dendrites chez des patients atteints de retard mental liés à des causes aussi bien environnementales que génétiques. Ces premières études réalisées sur les cellules pyramidales du cortex cérébral ont démontré deux altérations fondamentales chez l'adulte : une réduction dans le nombre et la longueur des dendrites ainsi qu'une modification de la morphologie et une baisse du nombre d'épines dendritiques (Huttenlocher, 1970; Purpura, 1974; Kaufmann et Moser, 2000). En effet, à la fois les branches apicales et basales des dendrites de ces cellules se trouvent être plus courts ou moins ramifiés dans le cerveau des patients atteints d'un retard mental. En ce qui concerne les épines dendritiques, elles sont plus rares et de forme filopodiale, c'est-à-dire longues et fines, avec une diminution du volume de la tête et du cou, faisant penser à des épines immatures (Figure 16A). Depuis les premières études, les observations faites sur les cellules pyramidales ont été étendues à d'autres types neuronaux et associées à des perturbations de l'organisation des microtubules du cytosquelette (Purpura, 1982; Kaufmann et Moser, 2000). De telles modifications des dendrites et de leurs épines conduisent à une nette diminution de la surface et du volume du compartiment postsynaptique. Cela se répercute, dans le cas d'anomalies dendritiques, en une baisse de la densité globale de synapses, et dans le cas d'anomalie des épines, probablement en une réduction de la densité des synapses excitatrices en particulier, étant donné que les contacts excitateurs se font majoritairement sur les épines (Gray, 1959). Néanmoins, toutes ces altérations ne sont pas nécessairement présentes dans tous les cas. Huttenlocher en 1991 fait entre autre référence à des adolescents présentant un retard mental plus ou moins profond, chez qui les dendrites apparaissent identiques à ceux des individus contrôles.

### *Anomalies du développement du système nerveux*

Le bon développement du cerveau nécessite un contrôle spatiotemporel strict de la neurogenèse, de la différenciation et de la migration cellulaire. Sans cela, le réseau neuronal ne peut pas se mettre en place. Ainsi il existe des syndromes mentaux qui sont caractérisés par une croissance physique et neurologique anormale, où la croissance du cerveau est retardée. L'un des exemples le plus connu est le syndrome de Down, pour lequel la taille et le poids du cerveau sont réduits à la naissance, les gyri du cortex cérébral sont immatures et la myélinisation des fibres corticales est retardée (Kaufmann et Moser, 2000). Concernant les épines dendritiques, les données sont moins univoques, mais iraient dans le sens de malformations tardives durant le développement de l'individu, qui surviennent après la naissance mais qui ne sont pas présentes pendant le développement précoce chez le fœtus (Takashima et al., 1981). Une étude similaire chez des enfants âgés de quatre mois à sept ans présentant un syndrome de Down, a obtenu le même type de résultats sur la longueur des dendrites. La période critique interviendrait aux alentours des 6 mois de vie postnatale, à partir de laquelle l'arborisation dendritique serait significativement moins étendue que chez le groupe contrôle (Becker et al., 1986).

Un autre exemple de forme de retard mental comportant des aspects développementaux est le syndrome de Rett. Ce retard mental syndromique est caractérisé par une enfance précoce apparemment normale, suivie d'un arrêt du développement neurologique entre deux et dix ans. Plusieurs études montrent que si les cortex cérébraux les plus postérieurs sont préservés, les plus antérieurs (cortex prémoteurs, moteurs et temporal inférieurs) présentent des cellules pyramidales anormales : leur soma est moins volumineux, leur arborisation est asymétrique et ne possède que peu d'épines dendritiques, certaines branches en étant complètement démunies (Belichenko et al., 1994; Armstrong et al., 1995; Bauman et al., 1995).

### *Conséquences envisagées sur le fonctionnement neuronal*

Les conséquences à l'invalidation de gènes impliqués dans le développement et/ou le fonctionnement synaptique contribuent nécessairement, si des mécanismes compensatoires ne sont pas mis en place, à des perturbations de l'intégration synaptique. Ces perturbations à l'échelle de la synapse peuvent avoir lieu aussi bien du côté présynaptique, si le gène invalidé influence par exemple une étape de la libération de neurotransmetteur ; que postsynaptique, si le gène invalidé influence par exemple la structure ou la composition de la densité postsynaptique. Dans les deux cas, il en résulterait un dérèglement de l'activité du réseau neuronal, qui pourrait même être

généralisé à l'ensemble d'une structure cérébrale, ceci en fonction du patron d'expression du gène concerné.

De telles modifications ont en effet déjà été observées sur des modèles animaux mimant des mutations monogéniques humaines, et ceci pour un nombre grandissant d'études fonctionnelles. Par exemple dans l'hippocampe, il est montré que la dépression à long terme impliquant les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR-LTD) est affectée chez les lignées d'animaux *knock out* *fmr1* et *frx2* (Syndrome du X Fragile) (Zhang et al., 2009). L'inactivation de MeCP2 (syndrome de Rett) entraîne une hyper-anxiété et un manque d'interaction sociale de ces animaux ainsi qu'une modification du patron de décharge des afférences corticales de l'amygdale latérale passant d'un mode tonique à un mode phasique et une altération de la LTP présynaptique à cette même synapse (Gambino et al., 2010).

Ces multiples exemples renforcent les éléments en faveur de l'hypothèse de l'origine synaptique des retards mentaux. Le fait de centrer notre étude sur les syndromes d'origine monogénique est lié au fait qu'ils sont les seuls à offrir un tel potentiel dans la compréhension des mécanismes pathologiques à l'origine du désordre cognitif observé. A ce jour, notre laboratoire se penche sur 5 lignées d'animaux invalidés pour ce type de gènes (*Il1rap1*, *Rsk2*, *Gdi1*, *Ophn1* et *Mecp2*). Durant mon doctorat, j'ai eu l'occasion de m'intéresser plus particulièrement à l'un d'entre eux : le gène *il1rap1*, qui fait l'objet de la première partie des résultats ([Publication1](#)).

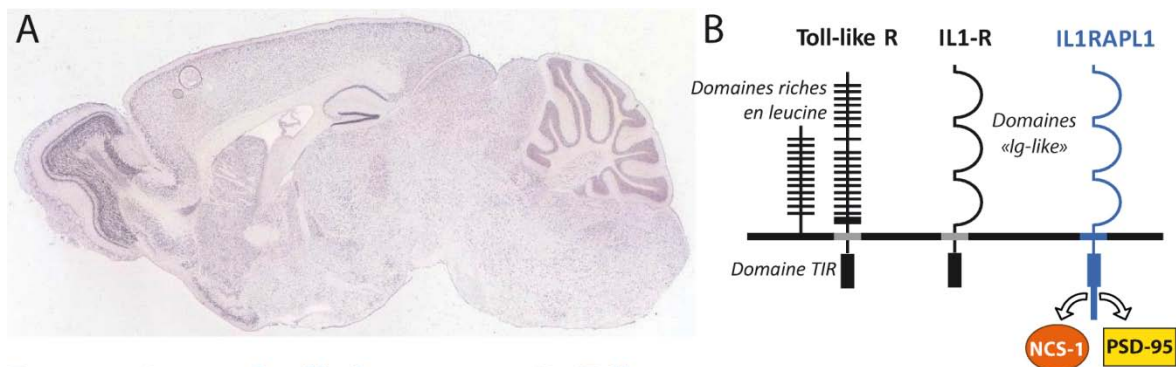
### **2.3.2. Implication de *il1rap1* dans le fonctionnement synaptique**

#### *Il1rap1 et son implication dans les troubles mentaux*

IL1RAPL1 (Interleukin 1 receptor accessory protein-like 1) est une protéine de 696 acides aminés principalement exprimée dans le cerveau (Born et al., 2000). Plus précisément, on retrouve une forte expression de la protéine dans l'hippocampe ou encore le cortex piriforme, des structures impliquées de manière générale dans la mémoire, ainsi que dans le bulbe olfactif, les cellules de Purkinje et les cellules granulaires du cervelet ([Figure 17A](#)). La protéine IL1RAPL1 fait partie de la superfamille des récepteurs IL-1/Toll, et la sous-famille des « Interleukin 1 receptor accessory protein-like » (IL1RAPL) (Bahi et al., 2003). Elle possède une région extracellulaire composée de trois domaines immunoglobuline, un segment transmembranaire et un domaine intracellulaire TIR (Toll/IL-1R homology domain) ([Figure 17B](#)). Son gène *IL1RAPL1*, lorsqu'il est muté, est responsable d'un retard mental d'origine génétique lié au chromosome X, de type non-syndromique, observé chez des famille de patients (Carrié et al., 1999). Des délétions,



inversions et mutations de ce gène ont été retrouvées dans le cerveau de patients atteints d'un retard mental (Leprêtre et al., 2003; Sasaki et al., 2003), ou d'un syndrome d'autisme (Piton et al., 2008). Des études utilisant plusieurs tests cognitifs spécialisés dans divers domaines comme le langage ou la perception, indiquent que l'invalidation ou l'expression anormale de IL1RAPL1 porte atteinte aux capacités cognitives de l'individu et peut en particulier toucher la mémoire et la concentration (Gao et al., 2008).



**Figure 17 : La superfamille des récepteurs IL1/Toll.**

**A) Hybridation in situ ciblant les ARNm de *il1rapl1* sur une section de cerveau de souris adulte. *Il1rapl1* est fortement exprimé dans le bulbe olfactif, le cortex piriforme, l'hippocampe et le cervelet. D'après Allen Institute for Brain Science, <http://www.brain-map.org/>. B) Représentation schématique des trois familles de récepteurs transmembranaires qui composent la superfamille des récepteurs IL1/Toll : Toll-like receptor, Interleukin1-receptor (IL1-R) et Interleukin 1 receptor accessory protein-like (IL1RAPL), pour laquelle IL1RAPL1 est représentée. D'après Bahi et al., 2003.**

#### *Interactions d'*il1rapl1* avec des protéines synaptiques et conséquences de son invalidation*

Bien que les propriétés biologiques et physiologiques de IL1RAPL1 soient encore peu connues, il est démontré qu'elle interagit avec deux protéines largement exprimées dans les neurones et d'un rôle capital pour le fonctionnement synaptique : NCS-1 (Bahi et al., 2003) et PSD-95 (Pavlowsky et al., 2010a) (Figure 17B).

NCS-1 (Neuronal Calcium Sensor-1) appartient à la superfamille des Calmodulines (CaM) qui régulent l'exocytose calcium dépendante (Levitan, 1999). Le rôle de NCS-1 est de moduler les canaux calciques de type P/Q et N par des voies de signalisation impliquant un autorécepteur couplé à des protéines G. En effet, NCS-1 a été démontré comme possédant un rôle double et antagoniste puisqu'il peut à la fois augmenter ou diminuer les niveaux de calcium (Weiss et al., 2010). En conséquence, l'implication de NCS-1 dans les niveaux de calcium présynaptiques en fait un acteur important de la fusion vésiculaire et donc de la libération des neurotransmetteurs. Dans une étude portée par notre équipe, il a été montré qu'un déséquilibre dans l'expression de la protéine *il1rapl1* dans des cellules PC12, impliquait une baisse de l'activité neuroendocrine des canaux

calciques de type N spécifiquement, provoquant en retour un déficit d'exocytose dans ces cellules (Gambino et al., 2007).

PSD-95 est une protéine d'échafaudage majeure des synapses excitatrices (Ehrlich et al., 2007), connue pour promouvoir leur maturation et leur stabilisation (El-Husseini et al., 2000). Dans des études récentes du groupe de Jamel Chelly, il est démontré que IL1RAPL1 régule la densité des épines dendritiques et la localisation de PSD-95 dans la synapse, via la voie de signalisation JNK (c-Jun terminal kinase) (Kim et al., 2007; Pavlowsky et al., 2010b) et non pas par les voies IL1/Toll qu'elle active habituellement (Born et al., 2000 ; Khan et al., 2004 ; Pavlowsky et al., 2010a). En effet, l'inactivation du gène *il1rapl1* sur un modèle murin (KO *il1rapl1*) implique une diminution de la densité des épines dendritiques dans l'hippocampe, sans altérer ni l'élément présynaptique, ni la morphologie des épines restantes, ni les synapses inhibitrices (Pavlowsky et al., 2010a). Cette altération du nombre de synapses excitatrices entraîne des conséquences fonctionnelles puisque la synapse entre les collatérales de Schaeffer et la région CA1 de l'hippocampe présente un défaut dans la consolidation de la LTP.

Etant donné que IL1RAPL1 contrôle NCS-1 et PSD-95 et que ces deux protéines sont fortement impliquées dans la fonction synaptique, il est tentant de penser que les niveaux d'expression de IL1RAPL1 que l'on peut trouver suite à une mutation de son gène puisse être critique pour le fonctionnement synaptique normal et ceci aussi bien sur les synapses excitatrice qu'inhibitrices.

## DEUXIEME PARTIE : RESULTATS



## **1. Déséquilibre de la balance excitation / inhibition dans le cervelet en développement en l'absence de la protéine IL1RAPL1.**

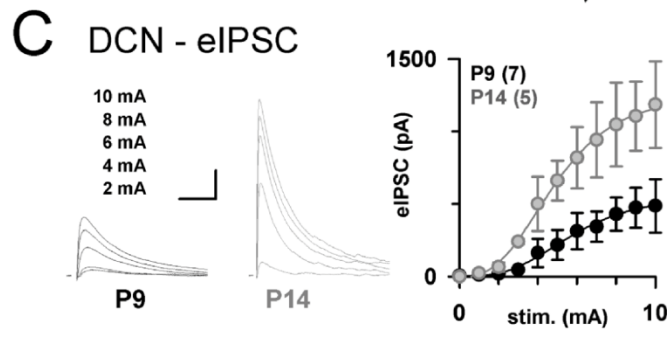
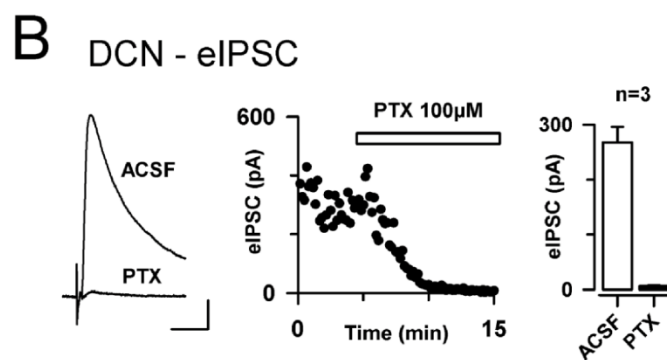
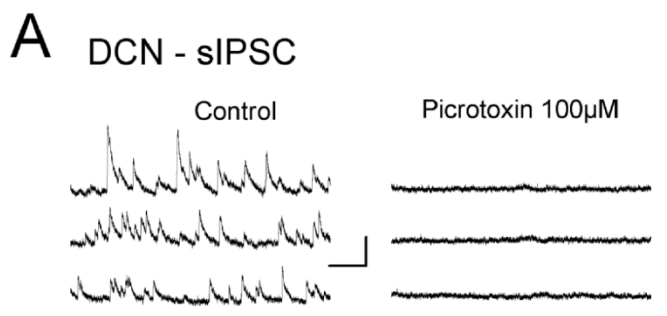
Il existe un fort contraste entre la connaissance acquise ces vingt dernières années dans les domaines de la génétique et de l'histologie des retards mentaux comparativement à leur étude physiopathologique, ceci bien que les premiers modèles animaux soient apparus il y a plus de quinze ans. Cependant, si l'on considère les modifications de l'organisation de la synapse mises en jeu lors de mutations dans des gènes à l'origine de protéines synaptiques, il paraît à ce jour difficile d'imaginer que des altérations de la morphologie des épines ou du développement des synapses comme celles que l'on observe lors de retards mentaux d'origine monogénique, n'affectent pas l'activité neuronale. En outre, il semble également essentiel d'essayer d'appréhender les conséquences de l'invalidation de ces gènes sur la maturation des réseaux neuronaux. En effet, dans un contexte de pathologies cognitives telles que les retards mentaux et l'autisme, il apparaît approprié d'étudier les propriétés d'un système en développement, et pas uniquement l'impact sur le système pleinement mature.

Nous nous proposons donc d'étudier la mise en place des connexions du système nerveux central chez des animaux invalidés pour le gène *Il1rapl1*, comparativement à des animaux sauvages. Le choix du cervelet comme modèle de cette étude est basé sur plusieurs critères. Premièrement, le cervelet est une structure qui se développe après la naissance, entre P0 et P30 (Altman et Bayer, 1997), ce qui nous permet une approche confortable utilisant des animaux nés naturellement, et non pas des embryons prélevés sur les mères ; deuxièmement, la protéine IL1RAPL1, ainsi que son partenaire NCS-1, ont un fort taux d'expression dans le cervelet (Bahi et al., 2003), ce qui suggère qu'ils ont un rôle fonctionnel ; troisièmement, il existe de plus en plus d'indices laissant supposer une implication du cervelet dans le contrôle de certaines tâches cognitives (Leiner et al., 1986) ; et quatrièmement, il est rapporté que 70 % des cas d'autisme étudiés dans la littérature présentent une réduction du nombre de cellules de Purkinje, sans altération de la densité des autres types cellulaires (Palmen et al., 2004 ; Whitney et al., 2009). Ainsi puisque les cellules de Purkinje sont la seule sortie du cortex cérébelleux, leur dégénérescence devrait désinhiber les neurones des noyaux profonds et par conséquent suractiver les structures cibles comme le thalamus et le cortex. Une telle altération de l'équilibre entre excitation et inhibition a été observée dans d'autres

structures, pour d'autres modèles animaux de pathologies mentales (Syndrome de Rett, mutation monogénique de MeCP2 : Dani et al., 2005 ; et neuroligine 2 : Hines et al., 2008). Ce phénomène que l'on retrouve pour certains troubles mentaux pourrait être considéré comme une propriété commune, hypothèse que nous nous proposons de tester ici sur des animaux présentant une invalidation du gène *il1rapl1*.

### **1.1. Publication 1 : IL1RAPL1 controls inhibitory networks during cerebellar development in mice**

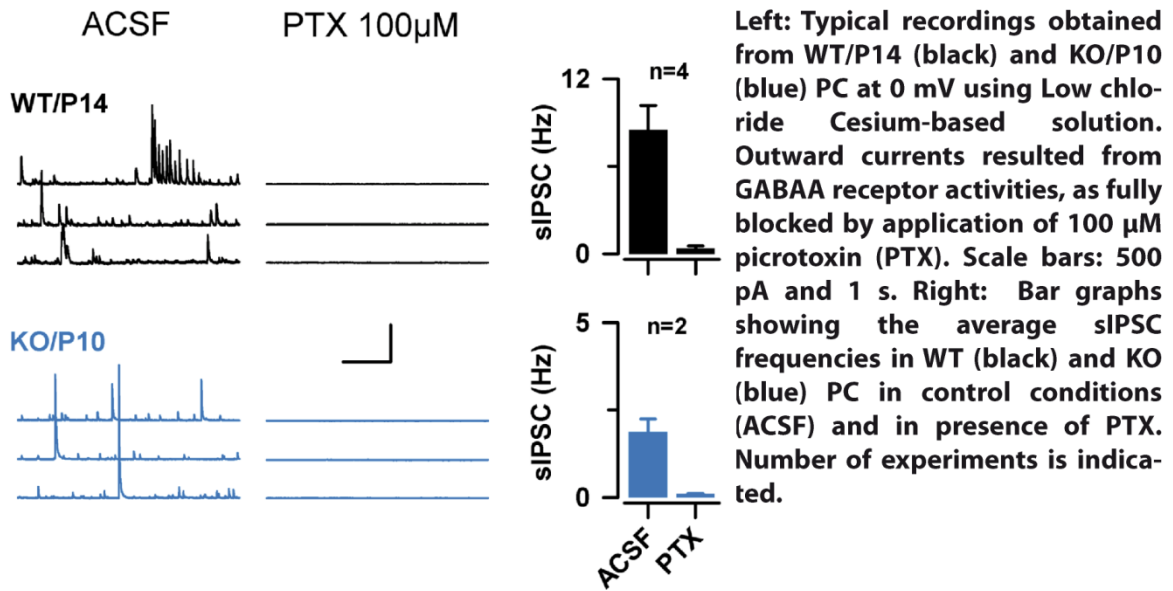




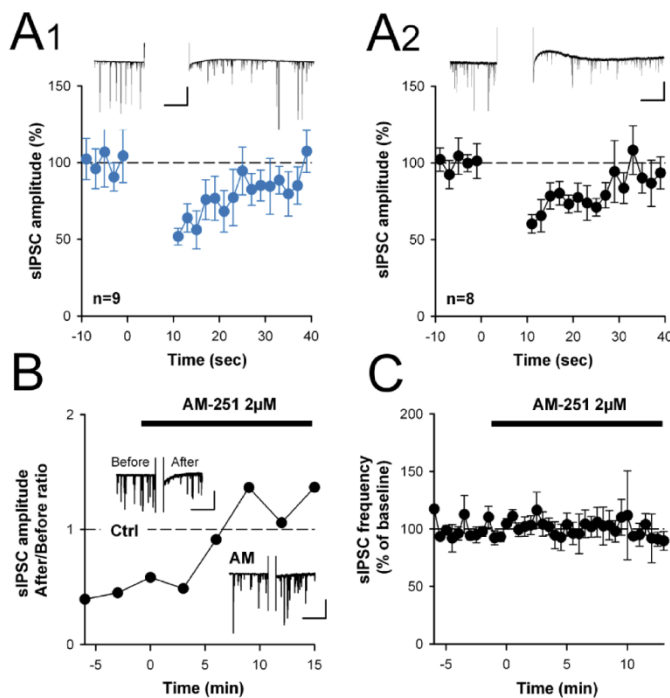
A) Typical spontaneous IPSC (sIPSC) impinging onto DCN neurons hold at 0 mV using a low chloride intrapipette solution (see material and method section). The application of the GABA<sub>A</sub>-R antagonist Picrotoxin (PTX, 100  $\mu$ M) abolishes all spontaneous synaptic currents. Scale bars: 20 pA and 200 ms. B) Left: Typical evoked IPSC (eIPSC) following stimulation of the white matter in presence of 1  $\mu$ M NBQX and 50  $\mu$ M D-APV in the superfusing ACSF. The massive block induced by PTX application proves the GABA<sub>A</sub> nature of the evoked current. Scale bars: 50 pA and 15 ms. Middle: Time course of the peak current amplitude before and during application of PTX. Right: Bar graph displaying the average peak current amplitude before (ACSF) and after PTX application in three different experiments. C) Evoked inhibitory current increases with postnatal development. Left: typical evoked inhibitory responses following increased stimulation strength (2 to 10 pA, 5 ms) applied. Note that the maximal evoked responses increase between P9 and P14. Right: Mean evoked current amplitude at P9 and P14 in WT mice following increasing stimulation strength. Number of cells is indicated. Scale bars: 300 pA and 25 ms.

**Pub.1 Fig.Sup.1: Characterization of GABAergic inhibition received by deep cerebellar nuclei (DCN) neurons in mouse sagittal acute slices.**

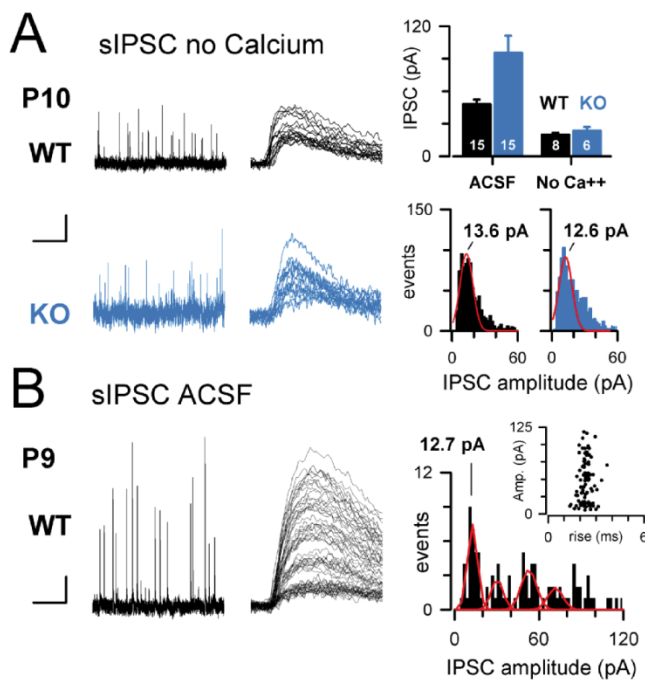




**Pub.1 Fig.Sup.2: Characterization of GABAergic inhibition received by Purkinje cells (PC).**



**Pub.1 Fig.Sup.3: Effects of depolarization-induced suppression of inhibition (DSI) in our experimental conditions.**



**A)** quantal IPSC in WT (black) and KO (blue) P10 animals were obtained in Ca<sup>2+</sup>-free external medium (No Ca<sup>2+</sup> condition). Left: representative recordings and extracted IPSC. Scale bars: 10 pA and 8 msec. Top right: Bar graph showing the effect of the No Ca<sup>2+</sup> condition on mean sIPSC amplitudes in WT (black) and KO (blue) animals. The number of recorded cells is indicated within the bars. Bottom right: sIPSC amplitude distributions. The peak value of the Gaussian fit (red line) adjusted to the major population is indicated. **B)** sIPSC recorded at P9 adopt preferential amplitude values. Left: representative recordings and extracted IPSC. Right: Bar graph showing the steeply distribution of sIPSC of the same experiment. Gaussian fits of each peak are showed in red and indicate the multiquantal nature of the peaks. The peak amplitude value of the first fit is indicated. Inset: 20-80 % rise time distribution of the same sIPSC, showing homogeneity of synaptic events kinetics.

**Pub.1 Fig.Sup.4: No difference in quantal size between IL1RAPL1 WT and KO animals.**

## 2. Physiologie des interneurones de la couche moléculaire

En l'absence de l'expression de la protéine IL1RAPL1 chez des souris *knock out*, il existe une désinhibition transitoire des neurones des noyaux profonds liée à un réveil précoce de l'activité des interneurones de la couche moléculaire. Aux vues des résultats impliquant ces interneurones, je me suis intéressée de plus près à leur physiologie. Dans le contexte scientifique actuel, la question de l'existence de deux classes distinctes d'interneurones dans la couche moléculaire du cervelet (les cellules étoilées et les cellules en panier) n'est toujours pas résolue et de plus, suscite des avis divergents. L'ensemble des résultats présentés dans la section suivante nous fait penser qu'ils joueraient chacun un rôle propre dans le fonctionnement du cervelet.

## 2.1. Identification de deux entrées inhibitrices distinctes sur les cellules de Purkinje

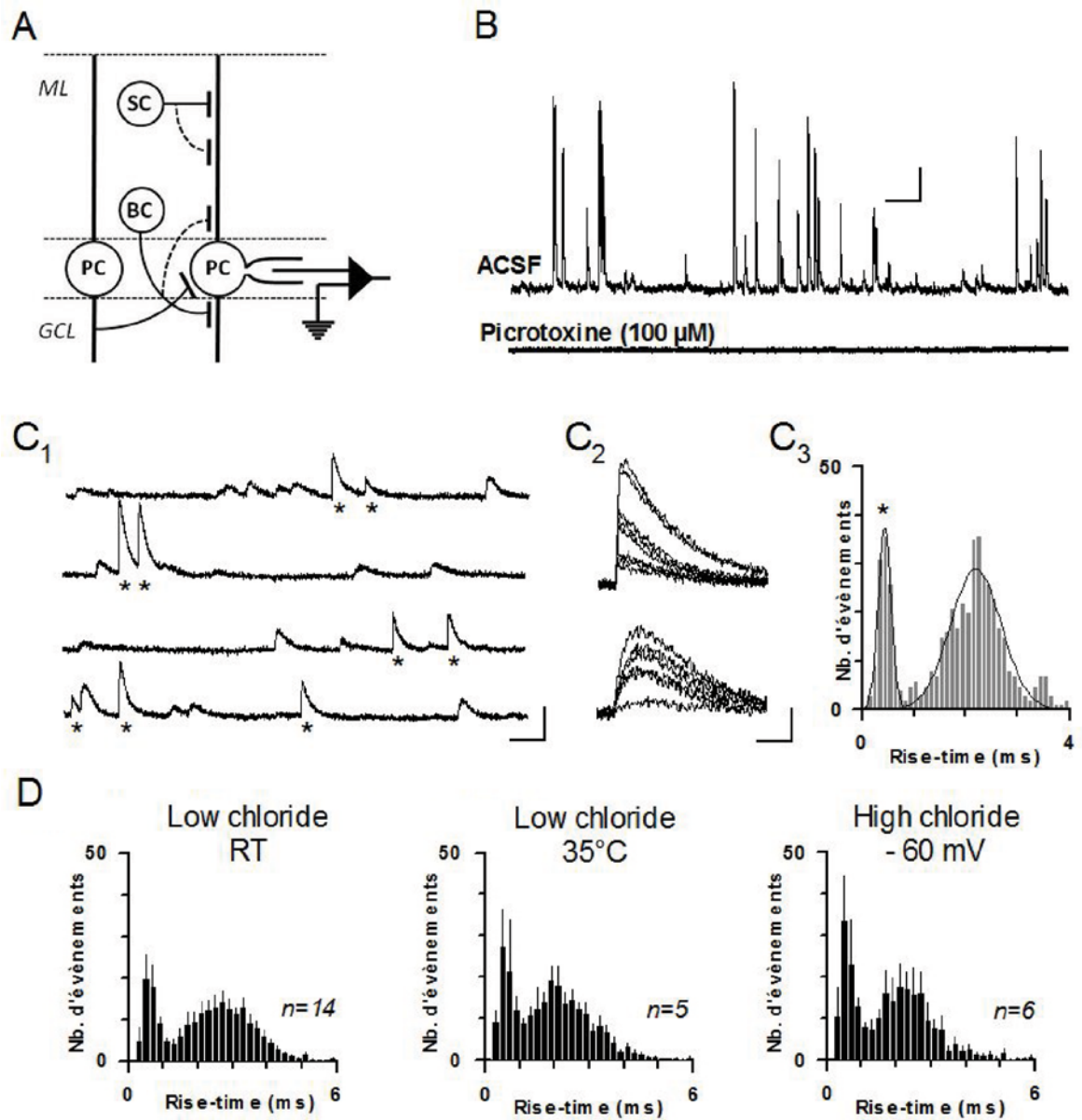
Si la morphologie et la connectivité des cellules en panier et des cellules étoilées est reconnue comme bien différente (Palay et Chan-Palay, 1974), à l'inverse leur physiologie a été moins étudié et est considérée comme semblable (Häusser et Clark, 1997). Cependant, il est difficile d'imaginer que de telles différences structurales n'influencent pas la façon dont la cellule de Purkinje intègre leurs messages respectifs. En effet, la localisation des contacts synaptiques des cellules en panier et des cellules étoilées respectivement sur le soma et sur l'arborisation dendritique de la cellule de Purkinje devrait entraîner des réponses différentes au niveau postsynaptique. L'une des raisons principale concerne les propriétés passives des dendrites des cellules de Purkinje, qui imposent un filtrage important des courants synaptiques entre les dendrites et le soma (Llano et al., 2000; Roth et Häusser, 2001). De ce fait, nous supposons fortement pouvoir identifier ces deux types d'entrées inhibitrices reçues par la cellule de Purkinje : l'une dendritique et l'autre somatique, par leurs seuls paramètres synaptiques. Cette étude avait été amorcée peu de temps avant mon arrivée dans le laboratoire, et appréhendée par l'analyse des cinétiques de rise-time des courants postsynaptiques inhibiteurs (IPSCs) enregistrés au niveau du corps cellulaire des cellules de Purkinje. Le choix du rise-time comme indicateur du positionnement du contact synaptique est conforté par une étude réalisée à la synapse entre les cellules en panier de l'hippocampe et les cellules granulaires cibles, qui montre des cinétiques de rise-time rapides (~2 msec) pour ces contacts synaptiques somatiques (Kraushaar et Jonas, 2000). Le fait que le rise-time des événements provenant de contacts somatiques soit rapide est d'importance, car il permet de disposer de la « gamme » de valeurs expérimentales nécessaire à la ségrégation de deux populations. En outre, Llano et ses collaborateurs avaient déjà observé deux populations d'évènements inhibiteurs arrivant sur la cellule de Purkinje chez le rat, une population rapide (~1 msec) et une population plus lente (~5 msec), et avaient proposé que la population rapide ne puisse provenir que d'un contact somatique (Llano et al., 2000).

Ainsi pour vérifier s'il est possible de différencier physiologiquement les entrées inhibitrices arrivant à la cellule de Purkinje, nous avons enregistré les événements synaptiques reçus par ces cellules selon un protocole semblable à celui présenté dans la [Publication 1](#). Ces enregistrements ont été réalisés par la technique de patch clamp configuration cellule entière sur des tranches aiguës de cervelet de souris, soit sur des sections parasagittales, soit sur des sections transversales et ce sur des animaux de tous

âges (P10-P90). Chaque IPSC est détecté à l'aide d'une routine et ajusté par une fonction bi-exponentielle (pCLAMP10, Molecular Devices) dans le but d'obtenir une bonne estimation de son rise-time. Ainsi, nous avons défini que le « 20-80 % rise-time » donnait un bon aperçu de cette valeur et permettait une étude comparative satisfaisante, malgré les différences qu'il peut exister par exemple entre deux enregistrements de cellules ou deux conditions expérimentales. Les histogrammes de distribution des rise-times qui sont construits à partir de ces valeurs donnent des profils différents en fonction de l'âge des animaux. Lorsque ces histogrammes présentent deux composantes distinctes, ils sont déconvolués en une somme de deux lois Normales, chacune étant caractérisée par une moyenne ( $\mu$ ) et un écart type (SD).

### **2.1.1. Analyse cinétique des sIPSCs enregistrés au niveau des corps cellulaires des cellules de Purkinje**

Les enregistrements des IPSCs spontanés (sIPSCs) réalisés en tranches parasagittales au niveau du soma de cellules de Purkinje montrent l'existence de deux populations d'évènements (Figure 18). Ces enregistrements ont été réalisés à un potentiel de maintien de 0 mV, avec un milieu intracellulaire possédant une faible concentration en ions chlorure. Cette condition expérimentale nous permet d'isoler les IPSCs des EPSCs sans avoir recours à l'utilisation de bloqueurs des récepteurs AMPA et NMDA. L'application dans le bain d'un antagoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub> (picrotoxine, PTX, 100  $\mu$ M) élimine tous les évènements synaptiques, ce qui indique que nos conditions expérimentales isolent sélectivement les IPSCs (Figure 18B). Les profils de distribution des 20-80 % rise-time de la majorité des cellules enregistrées présentent deux populations distinctes d'évènement à P21 : une population rapide (étoiles) qui contribue à ~20% des évènements, et une population lente (Figure 18C) (population rapide :  $\mu_1$ :  $0.69 \pm 0.04$  ms, SD1 :  $0.19 \pm 0.03$  ms ; population lente :  $\mu_2$  :  $3.32 \pm 0.18$  ms, SD2 :  $0.78 \pm 0.05$  ms, n=32 cellules). De plus, dans différentes conditions expérimentales nous observons une persistance de ces deux populations d'IPSCs (Figure 18D), que nous n'observons en aucun cas lorsque nous enregistrons d'autres types cellulaires (interneurones de la couche moléculaire, cellules granulaires, neurones des noyaux profonds : enregistrements non montrés). Cet ensemble de résultats nous conforte dans l'existence de deux populations hétérogènes d'évènements postsynaptiques inhibiteurs contactant les cellules de Purkinje, que l'on pourrait différencier en fonction de leur cinétique.



**Figure 18 : Les cellules de Purkinje reçoivent deux types d'évènements inhibiteurs.**

A) Schéma illustrant les différentes afférences inhibitrices vers la cellule de Purkinje et la localisation présumée de leurs contacts synaptiques. La pipette d'enregistrement électrophysiologique représente la technique de patch clamp en configuration cellule entière utilisée. CM : couche moléculaire, CG : couche granulaire, CE : cellule étoilée, CPa : cellule en panier, CP : cellule de Purkinje. B) Tracés présentant des enregistrements typiques des courants postsynaptiques inhibiteurs spontanés (sIPSCs) reçus par une cellule de Purkinje à P14 en condition contrôle (ACSF) et suite à l'application d'un bloqueur du récepteur GABAA (picrotoxine, 100  $\mu$ M) (barre d'échelle : 80 pA et 200 msec). Cette dernière condition entraîne la disparition complète des sIPSCs. C) C1 : Sur les tracés on peut distinguer des sIPSCs « rapides » (étoiles) et « lents » (barre d'échelle : 80 pA et 50 msec). C2 : Echantillonnage d'évènement rapides (en haut) et lents (en bas) mettant en évidence leur différence de cinétique (barre d'échelle : 50 pA et 70 msec). C3 : Distribution du nombre d'évènement en fonction du 20-80 % rise-time. Ce profile a été obtenu par l'enregistrement d'une même cellule sur une période de 60 s, mettant en évidence 501 évènements. D) Profils moyens de distribution des 20-80 % rise-time obtenus dans les différentes conditions citées. Le nombre de cellules enregistré (n) dans chaque condition expérimental est indiqué sur le graphique.

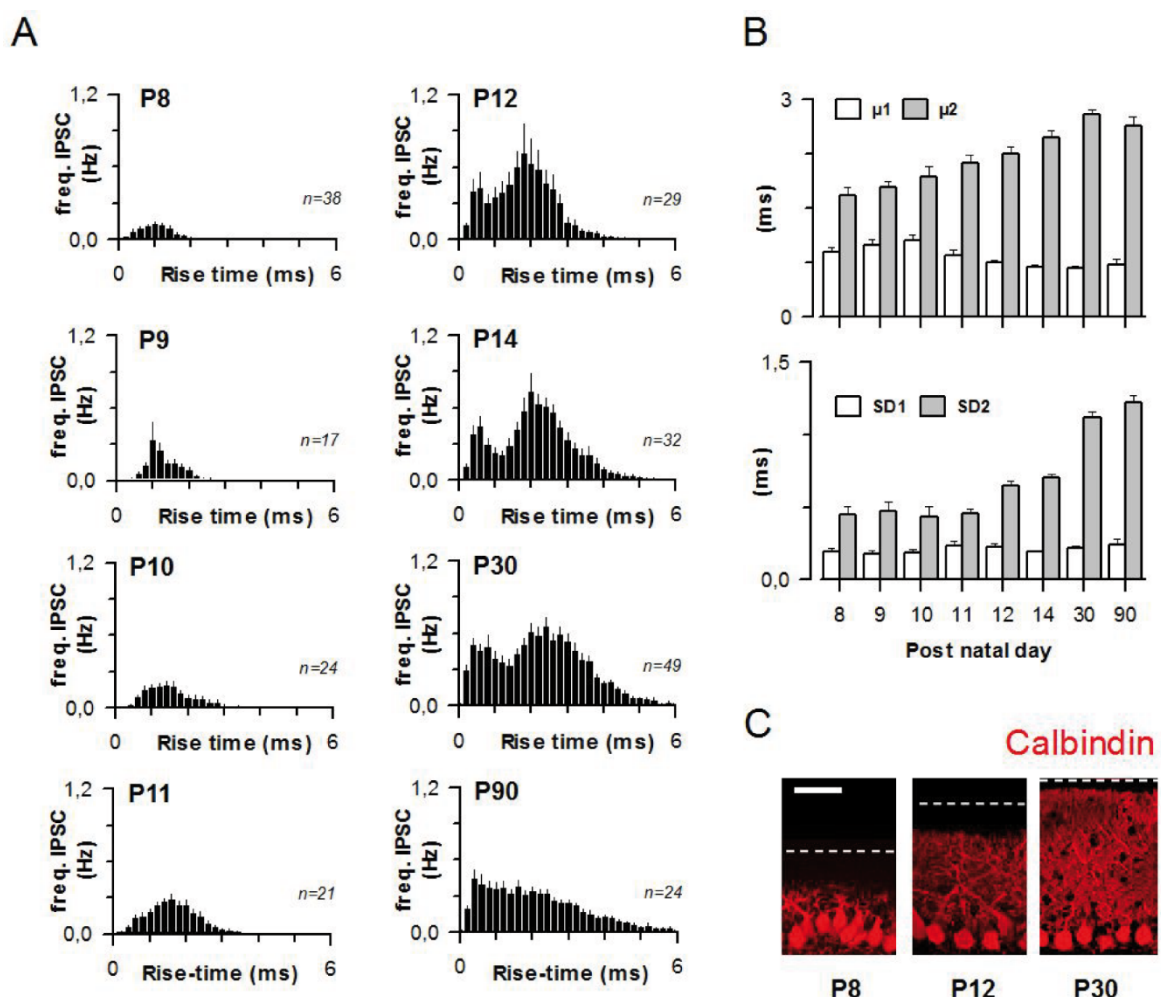
Les cellules de Purkinje sont contactées par trois types d'entrées inhibitrices provenant des cellules en panier, des cellules étoilées et des collatérales récurrentes d'autres cellules de Purkinje. D'après de récentes études *ex vivo*, la synapse Purkinje-Purkinje semble contribuer de façon négligeable à la charge inhibitrice totale reçue par la cellule de Purkinje chez l'adulte (Orduz et Llano, 2007) comparativement à la contribution des interneurons de la couche moléculaire (Vincent et Marty, 1993 ; Pouzat et Hestrin, 1997 ; Sakaba, 2008). Cependant, au cours du développement ces synapses récurrentes sembleraient jouer un rôle important dans la mise en place des microcircuits (Watt et al., 2009), au même titre que les interneurons de la couche moléculaire. En effet il est connu que la synapse entre les interneurons de la couche moléculaire et la cellule de Purkinje subisse une diminution de l'ordre de 10 fois de l'amplitude des courants entre P11 et P30 (Pouzat et Hestrin, 1997), c'est-à-dire immédiatement après la synaptogenèse des cellules en panier et des cellules étoilées (Altman et Bayer, 1997). Ainsi, nous avons cherché à étudier ce phénomène par notre analyse des cinétiques des sIPSCs, au cours du développement du cervelet.

### **2.1.2. Evolution des évènements inhibiteurs au cours du développement**

En accord avec les travaux précédents (Hirono et al., 2008), nos enregistrements réalisés sur les cellules de Purkinje montrent un réveil de l'activité inhibitrice à partir de P8. Leur fréquence augmente ensuite jusqu'à P20 avant de se stabiliser (Figure 19A). Entre P8 et P11, la distribution des rise-time semble refléter l'existence d'une seule population (Figure 19A). Cependant, pour certaines cellules dont la contribution est reportée sur la Figure 19B, il apparaît que la déconvolution de la distribution soit mieux adaptée lorsqu'elle est ajustée par deux lois Normales au lieu d'une, ce qui pourrait révéler l'existence de deux populations très proches, mais tout de même cinétiquement différentes. A partir de P12, on commence à observer la ségrégation de deux populations cinétiquement distinctes sur les profils de distribution, correspondant sans doute aux premiers contacts synaptiques ayant lieu au niveau du compartiment dendritique qui commencent à se développer à partir de cet âge. Ceci est en accord d'une part avec les travaux sur le développement morphologique et fonctionnel des cellules de Purkinje réalisés par McKay et Turner (2005) et d'autre part avec l'ensemble des études sur la synaptogenèse des interneurons de la couche moléculaire (Altman et Bayer, 1997).

Ainsi, le pourcentage de cellules présentant deux populations d'évènements augmente avec l'âge des animaux (de 45% à P8 jusqu'à 85% à P30). Par ailleurs, la valeur du rise-

time moyen des deux populations évolue progressivement puis se stabilise aux alentours de P30 (Figure 19B). A l'inverse, il n'y a pas d'évolution similaire des écarts types correspondants, puisque l'écart type de la population rapide (SD1) est stable tout au long du développement alors que celui de la population lente (SD2) augmente progressivement jusqu'à P30 (Figure 19B). Puisque l'augmentation de SD2 semble corrélée à la croissance de l'arbre dendritique de la cellule de Purkinje (Figure 19C), il est alors tentant de penser que les événements les plus lents correspondent aux courants synaptiques issus des dendrites distaux, c'est-à-dire possiblement entre les cellules étoilées et les dendrites distaux des cellules de Purkinje. Nous avons directement testé cette hypothèse par une approche pharmacologique utilisant la technologie de la microscopie confocale biphotonique.



**Figure 19 : Mise en place des composantes rapides et lentes au cours du développement.**

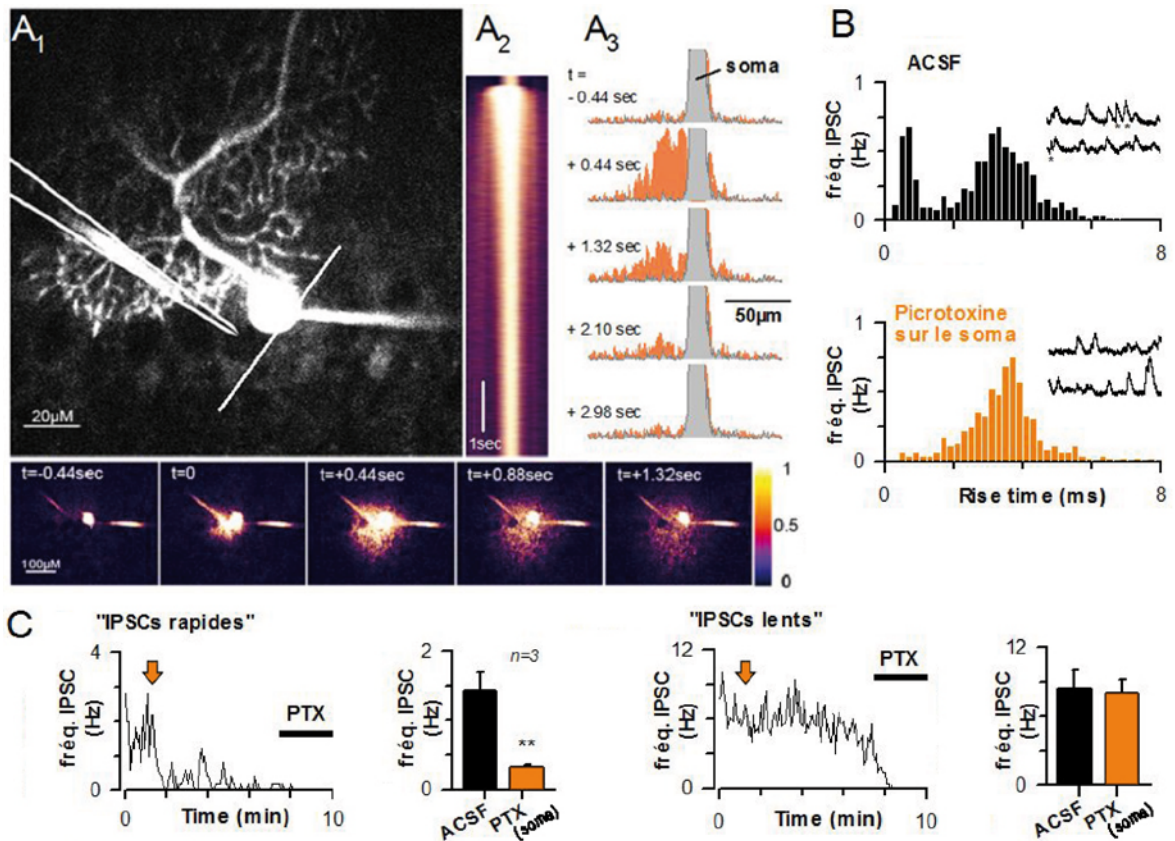
**A)** Profils de distribution moyens des 20-80 % rise-time obtenus sur des cellules de Purkinje à différents âges. Le nombre de cellules enregistré (n) est présenté à côté de chaque graphique. **B)** Histogrammes de la moyenne ( $\mu$ , en haut) et de l'écart type (SD, en bas) de l'ajustement des profils représentés en A), par deux lois Normales. Uniquement les cellules présentant deux composantes distinctes ont été utilisées pour construire ces histogrammes (entre 10 et 38 cellules différentes par condition). **C)** Immuno-détection fluorescente dirigée contre la calbindin, mettant en évidence la croissance de l'arbre dendritique de la cellule de Purkinje pendant le développement (barre d'échelle : 60  $\mu$ m).

### 2.1.3. Séparation pharmacologique des entrées GABAergiques somatiques et dendritiques

La taille de l'arbre dendritique des cellules de Purkinje ne nous permet pas de bloquer indépendamment toutes les synapses GABAergiques arrivant au niveau du seul compartiment dendritique. En revanche, l'entrée somatique formée par la cellule en panier, la synapse en pinceau, restreinte sur  $\sim 20 \mu\text{m}$  autour du segment initial de l'axone de la cellule de Purkinje (Palay et Chan-Palay, 1974 ; Ango et al., 2004), semble raisonnablement plus facile à isoler par des moyens pharmacologiques. En combinant la technologie de la microscopie biphotonique et du patch clamp, nous avons pu appliquer localement de la picrotoxine (PTX,  $100 \mu\text{M}$ ) tout en enregistrant les courants postsynaptiques inhibiteurs spontanés sur la cellule de Purkinje concernée. De courtes applications par pression positive dans la pipette (50 ms, 10 psi) permettent l'augmentation locale ciblée de la concentration de picrotoxine sur la synapse en pinceau précisément. L'ajout d'un AlexaFluor488 dans la pipette d'application nous a permis de suivre la dispersion de la substance dans la tranche aiguë à l'aide du profil enregistré (Figure 20A) (Rusakov et al., 2005). Cette expérience, répétée sur trois différentes cellules de Purkinje qui présentaient les deux populations d'IPSCs en condition contrôle, donne des résultats identiques : la composante rapide est spécifiquement supprimée par l'application locale de picrotoxine sur le soma de la cellule de Purkinje (Figure 20B et C). Il est important de noter que la composante lente ne disparaît que suite à l'application du bloqueur dans le bain par le système de perfusion (Figure 20B et D).

Ces résultats nous permettent de conclure que les deux populations d'IPSCs observées précédemment proviennent respectivement soit d'une localisation somatique, soit d'une localisation dendritique des synapses GABAergiques sur la cellule de Purkinje.





**Figure 20 : Les évènements inhibiteurs rapides et lents correspondent à des contacts synaptiques somatiques et dendritiques respectivement.**

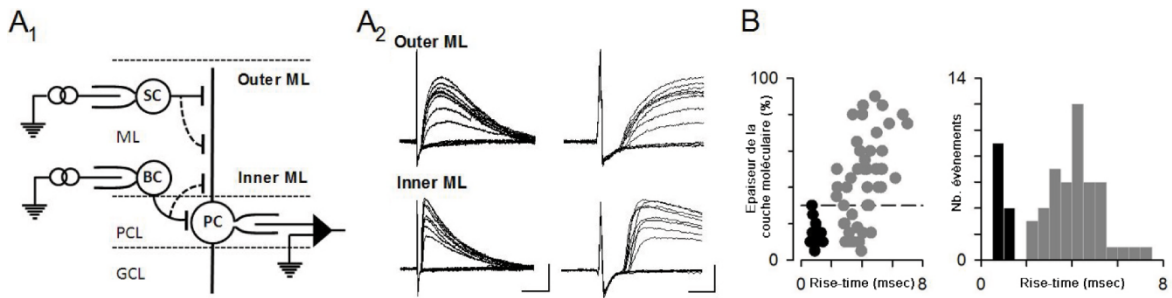
A) Application locale de bloqueur du récepteur GABAA. A1 : Image de microscopie à fluorescence deux-photons présentant l'enregistrement d'une cellule de Purkinje avec la pipette de droite, remplie d'AlexaFluor488. La pipette d'application contenant à la fois AlexaFluor488 et 100  $\mu$ M de picotoxine est positionnée proche du soma de la cellule de Purkinje et son contenu est libéré par application de brèves pressions positives. A2 : Enregistrement effectué au niveau de la ligne blanche (position moyenne de la synapse en pinceau) permettant l'estimation de la durée d'application de la picotoxine. A3 : la diffusion latérale de la picotoxine est suivie par la dispersion de la fluorescence à différents temps expérimentaux. B) Profils de distribution des 20-80 % rise-time provenant d'évènements enregistrés dans les mêmes conditions que ci-dessus, en condition contrôle (haut) ou après une application somatique de picotoxine (100  $\mu$ M, bas) et illustrés par des tracés (les évènements rapides sont annotés par des étoiles). C) Fréquence instantanée des sIPSCs rapides (gauche) et lents (droite) dans les mêmes conditions qu'en B). La flèche montre le temps d'application de la picotoxine sur le soma (PTX, 100  $\mu$ M). A la fin de l'expérience, une application de picotoxine est faite dans le bain. Les histogrammes présentent la fréquence des évènements rapides avant et après l'application somatique de picotoxine, moyennée sur trois expériences similaires (\*\* :  $p < 0,01$ ).

#### **2.1.4. Analyse cinétique des IPSCs évoqués par la stimulation de deux groupes de cellules en fonction de leur localisation dans la couche moléculaire**

A ce stade de l'étude, nous avons cherché à savoir si les événements « rapides / somatiques » et les « lents / dendritiques » proviennent respectivement de la synapse entre la cellule en panier et la cellule de Purkinje, et la synapse entre les cellules étoilées et la cellule de Purkinje. Pour ce faire, j'ai enregistré au niveau de la cellule de Purkinje les événements inhibiteurs évoqués (eIPSCs) par la stimulation directe des corps cellulaires de deux groupes d'interneurones localisés dans la couche moléculaire, chez des animaux âgés de 14 jours (Figure 21A). A cette période, la migration des cellules granulaires n'est pas terminée, et un corps cellulaire identifié dans la couche moléculaire pourrait appartenir à l'une de ces cellules. Ainsi, pour abolir tout éventuel recrutement feedforward d'un interneurone par l'intermédiaire d'une cellule granulaire, j'ai appliqué un inhibiteur des récepteurs AMPA (NBQX, 1  $\mu$ M). J'ai effectué une stimulation directe du corps cellulaire, jusqu'à visualiser une légère déformation de la surface cellulaire provoquée par la pipette. Une fois cette condition obtenue, l'intensité de la stimulation était augmentée jusqu'à obtenir autant de succès que d'échec, nous montrant que nous avons atteint l'intensité minimale de stimulation (Figure 21A). Etant donné que la taille de la couche moléculaire n'est pas constante entre les différentes tranches et les lobules (Palay et Chan-Palay, 1974), j'ai effectué des stimulations proximales dans une zone inférieure à 30 % de l'épaisseur de la couche moléculaire (<30%), indépendamment de stimulation distales dans une zone supérieure à 30% (>30%). Les eIPSCs typiques ainsi obtenus sont représentés sur la Figure 21A et le rise-time de ces événements est reporté sur les différentes représentations graphiques de la Figure 21B, où l'on peut distinguer la localisation de la stimulation avec le code couleur (stimulation proximale en noir, stimulation distale en gris).

Ainsi nous observons que les événements rapides sont évoqués par la stimulation des cellules proximales et que les événements lents sont évoqués par la stimulation des cellules distales.

En prenant ces résultats dans leur ensemble, nous pouvons conclure que les synapses provenant des cellules en panier et les synapses provenant des cellules étoilées ont des cinétiques de rise-time très différentes, certainement dues à la localisation de leurs contacts respectifs sur la cellule de Purkinje. Dans la section suivante, ces observations nous serviront de base pour aborder l'activité propre des interneurones de la couche moléculaire dans la tranche aiguë de cervelet.



**Figure 21 : Deux populations distinctes d'IPSCs en termes de cinétique sont évoquées par la stimulation distincte de deux populations d'interneurones.**

**A) A1:** Illustration de la procédure expérimentale mise en œuvre pour séparer les cellules en panier et les cellules étoilées suivant la localisation de leur corps cellulaire dans la couche moléculaire. **A2 :** Echantillonnage typique d'IPSC évoqués par la stimulation de somas dans la couche moléculaire externe (haut) ou interne (bas) (barres : 100 pA et 25 msec ; 100 pA et 3 msec). **B) Gauche :** Graphique en nuage de points cumulant les valeurs de 20-80 % rise-time obtenus pour la stimulation de somas de la couche moléculaire interne (en noir) et externe (en gris). **Droite :** histogramme correspondant.

## 2.2. Activité des interneurones de la couche moléculaire en tranche aigue

L'importance de l'activité des interneurones de la couche moléculaire sur le patron de décharge des cellules de Purkinje a déjà été rapportée sur le cervelet de rat (Häusser et Clark, 1997). En effet, les microcircuits inhibiteurs du cortex cérébelleux sont connus pour adapter l'intégration synaptique et le patron de décharge des cellules de Purkinje (Mittmann et al., 2005). Dans cette partie du manuscrit, nous avons cherché à examiner cette question chez la souris, pour tenter de déterminer la contribution relative des cellules étoilées et des cellules en panier sur l'inhibition PA-dépendante des cellules de Purkinje sur le cervelet en développement.

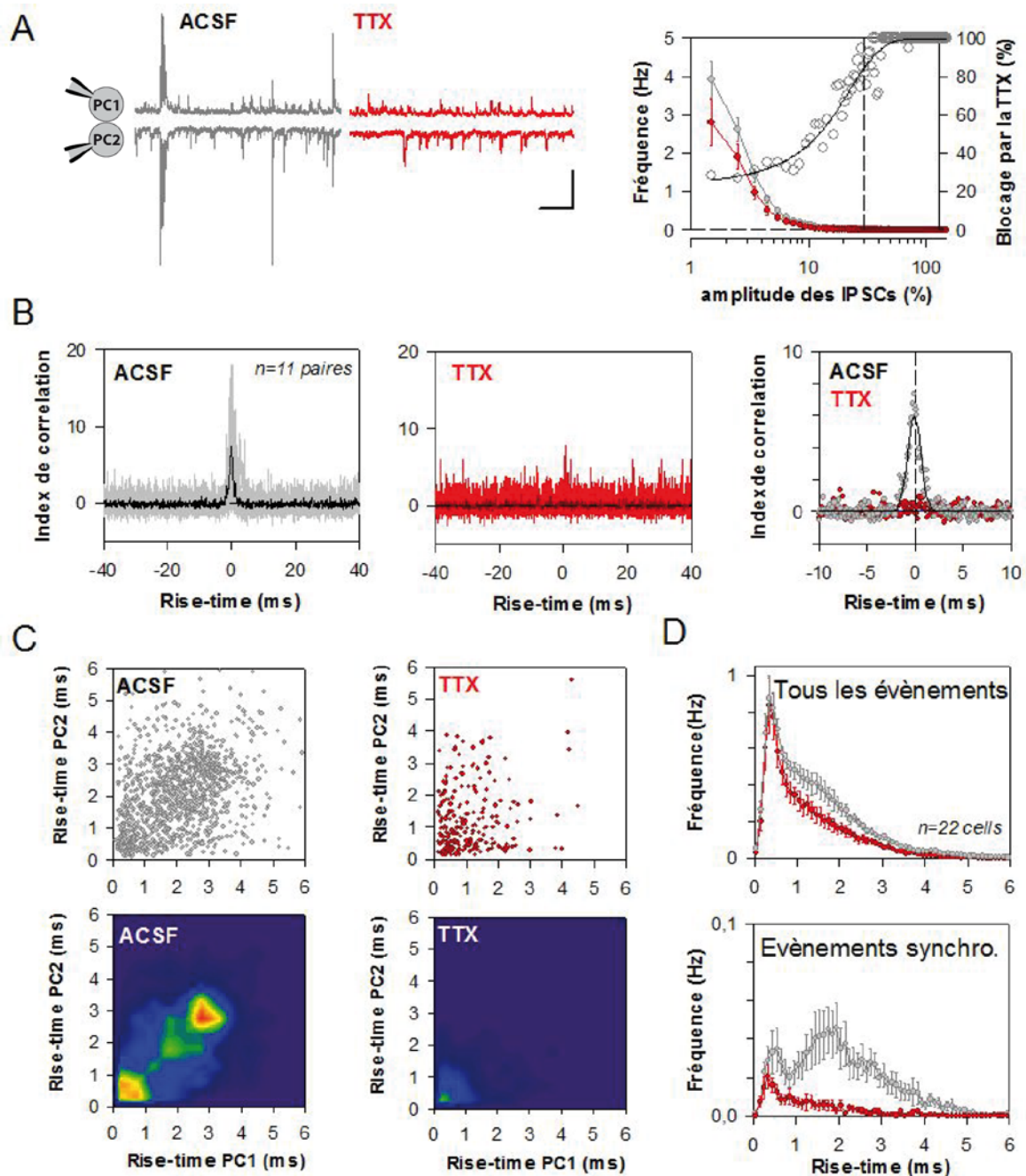
### 2.2.1. Contribution des cellules étoilées et des cellules en panier à l'activité inhibitrice spontanée et miniature reçue par la cellule de Purkinje

Dans un premier temps, nous avons cherché à estimer le niveau d'activité de chacun des interneurones dans notre modèle en tranche aiguë transversale à différents âges. Pour cela, nous mesurons systématiquement les fréquences des sIPSCs reçus pas les cellules de Purkinje en condition contrôle ou en présence d'un bloqueur des canaux sodiques dépendants du voltage (tétrodotoxine, TTX, 10  $\mu$ M, Figure 22), qui sont essentiels à la production de potentiels d'action (PA). Dans nos tranches, aucun effet

significatif de la TTX n'a été détecté avant P12 (non montré). Après cet âge, nous observons qu'environ 10 % des IPSCs enregistrés sur la cellule de Purkinje peuvent être attribués à une activité spontanée des interneurons de la couche moléculaire, étant donné que la TTX provoque une baisse de 10 % de la fréquence globale (Figure 22A et D). Ainsi, la fréquence des sIPSCs dans notre préparation semble inférieure à celle observée chez le rat (Vincent et Marty, 1993 ; Häusser et Clark, 1997), mais comparable à des études antérieures menées chez la même lignée de souris (Hirono et al., 2008).

Pour ces expériences comme pour d'autres décrites dans la suite du manuscrit, j'ai simultanément enregistré deux cellules de Purkinje strictement voisines afin d'isoler et caractériser les IPSCs « synchrones », c'est-à-dire arrivant de manière concomitante sur ces deux cellules, probablement suite à la décharge en potentiel d'action survenant au niveau d'un même interneuron contactant ces deux cellules. Une détection de la coïncidence est alors réalisée pour identifier les sIPSCs arrivant sur les deux cellules de Purkinje avec un intervalle de moins de 1 ms entre les deux pics. L'absence de synchronie illustrée par les corrélogrammes en condition TTX, comparativement à la condition contrôle, nous confirme que les événements synchrones sont bien médiés par un potentiel d'action (Figure 22B). Dans cette condition expérimentale, l'étude de la cinétique de cette population d'événements inhibiteurs synchrones en condition contrôle et en condition TTX nous révèle que seules les cellules étoilées sont actives en tranche. En effet, l'application de TTX réduit significativement la fréquence (Figure 22 C et D) et l'amplitude (non montré) de la population lente, sans affecter la population rapide. Nous verrons par la suite que cette observation a été confirmée par l'enregistrement direct des interneurons de la couche moléculaire et dont les résultats sont reportés à la fin de cette section.

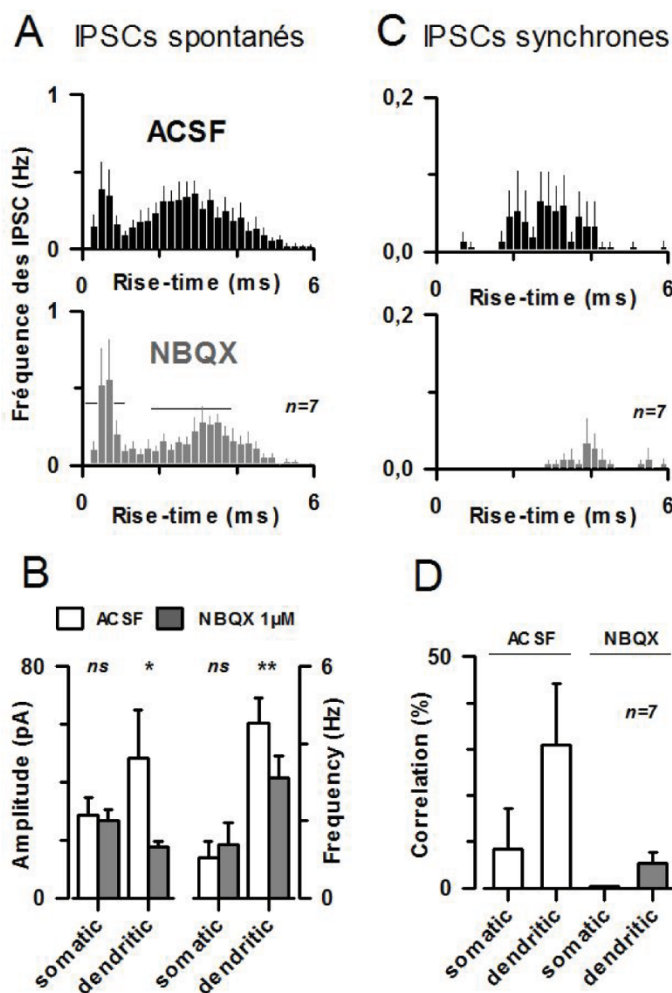
L'activité spontanée des interneurons de la couche moléculaire en tranche aiguë de cervelet de jeunes souris est connue pour s'éveiller à P8 et se stabiliser après P21 (Hirono et al., 2008) (Figure 19). Chez le rongeur, il a été observé que l'activité des interneurons n'est pas affectée par le blocage des récepteurs AMPA et NMDA (Vincent et Marty, 1993 ; Häusser et Clark, 1997), suggérant que ces neurones sont insensibles aux conductances excitatrices. Cependant, chez de jeunes rats âgés de P15 à P19, les patrons de décharge des cellules étoilées sont démontrés comme sensibles à l'activité des fibres parallèles (Carter et Regehr, 2002), et l'activité inhibitrice de type feedforward décrite comme importante dans le contrôle de leur activité (Brunel et al., 2004; Mittmann et al., 2005). Ainsi, nous avons cherché à examiner l'importance de la transmission excitatrice sur l'activité des interneurons de la couche moléculaire à cette période du développement du cervelet de souris.



**Figure 22 : Les IPSCs lents reçus par la cellule de Purkinje contribuent à la population spontanée alors que les événements rapides contribuent à la population de miniatures.**

**A)** Gauche : Enregistrements typique de paires de cellules de Purkinje strictement voisines avant (gris) et après (rouge) application d'un bloqueur des canaux sodiques dépendant du voltage (Tétradotoxine, TTX, 10  $\mu$ M). L'enregistrement obtenu pour la cellule de Purkinje 2 (PC2) est représentée en miroir pour permettre l'observation aisée des événements synchrones (échelle : 160 pA, 400 ms). Droite : Pourcentage de blocage des sIPSCs par la TTX. Le graphique représente la fréquence des sIPSCs avant (gris) et après (rouge) application de TTX, en fonction du pourcentage de l'amplitude maximale. **B)** gauche, centre : Corrélogrammes représentant le nombre de sIPSCs synchrones obtenus avant (gris) et après (rouge) l'application de TTX. Droite : Superposition des corrélogrammes moyens. **C)** Distribution des rise-times des sIPSCs reçus par la PC1 contre ceux de la PC2 en une représentation en nuage de point (haut) et un diagramme de densité (bas), obtenus avant (gauche, gris) et après (droite, rouge) application de TTX. **D)** Distribution des rise-times obtenus avant (gris) et après (rouge) application de TTX, sur la totalité des événements (haut) ou sur les événements synchrones uniquement (bas).

Dans un premier temps, j'ai appliqué un bloqueur des récepteurs AMPA (NBQX, 1  $\mu$ M, Figure 23) et mesuré les courants inhibiteurs spontanés arrivant sur deux cellules de Purkinje strictement voisines (cf. Figure 22). Cette application de NBQX a essentiellement le même effet que l'application de TTX, à savoir la diminution significative à la fois de l'amplitude et la fréquence de la population d'IPSC lents (Figure 23A et B). De plus, le blocage des récepteurs AMPA abolit également la présence d'évènements synchrones observés en condition contrôle entre deux cellules de Purkinje strictement voisines (Figure 23C et D), soulignant l'importance de l'activité excitatrice afférant sur ces cellules à une période clé du développement du cervelet.



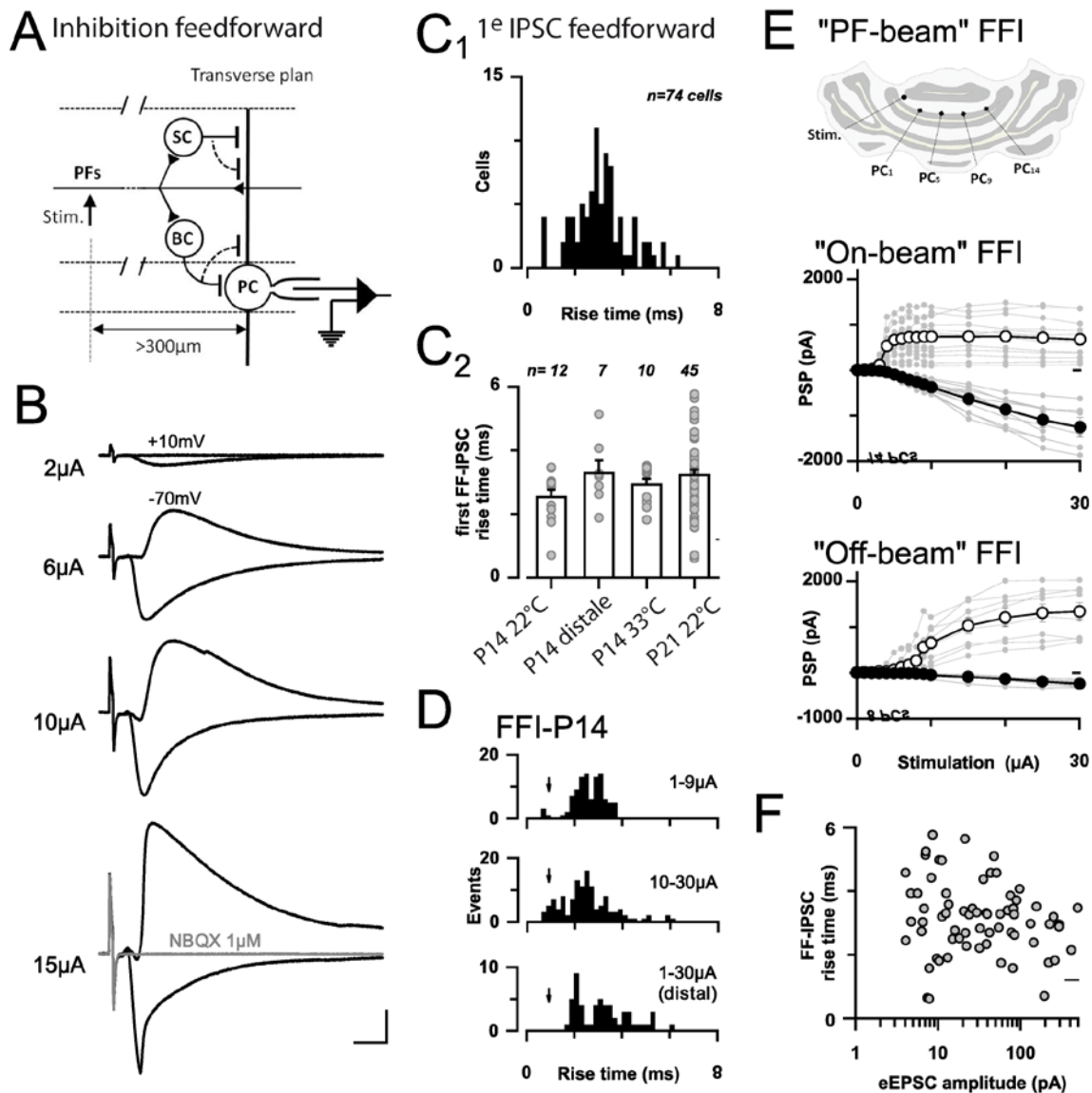
**Figure 23 : L'activité spontanée de la cellule étoilée est sous contrôle d'une conductance excitatrice.**

**A)** Histogrammes de distribution des 20-80 % rise-time des sIPSCs enregistrés au niveau de la cellule de Purkinje. Les données sont moyennées sur 7 enregistrements en condition contrôle (ACSF, en noir) avant, puis après application d'un bloqueur des récepteurs AMPA (NBQX 1  $\mu$ M, en gris, les barres horizontales reportent les fréquences de la condition contrôle). **B)** Histogramme moyen présentant l'effet de l'application de NBQX sur les populations somatiques et dendritiques des cellules présentées en A) (NS : non significatif, \* :  $p < 0,05$ , \*\* :  $p < 0,01$ ). **C)** Histogrammes moyens présentant la distribution des rise-time des sIPSCs synchrones enregistrés sur deux cellules de Purkinje strictement voisines présentées en A) et B). **D)** Histogramme présentant le pourcentage de corrélation pour les évènements somatiques et dendritiques des cellules présentées en A), B), C) (\*\* :  $p < 0,01$ , \*\*\* :  $p < 0,001$ ).

Dans un deuxième temps, j'ai directement examiné l'efficacité de la fibre parallèle à évoquer les populations rapides et lentes d'IPSCs sur les cellules de Purkinje (Figure 24). Cette expérience a été réalisée sur des tranches transversales de cervelet pour conserver l'intégrité de la fibre parallèle. De plus pour éviter de stimuler directement les interneurons de la couche moléculaire, j'ai positionné l'électrode de stimulation à une

distance supérieure à 300  $\mu\text{m}$  du corps cellulaire de la cellule de Purkinje enregistrée (Mittmann et al., 2005) (Figure 24A). Les IPSCs et EPSCs évoqués sont enregistrés respectivement à +10 et -70 mV, en présence d'une solution intracellulaire contenant du césium et de faibles concentrations en ions chlorure (Figure 24B). L'intensité croissante de stimulation des fibres parallèles montre des seuils proches pour les eEPSCs et les IPSCs recrutés en feedforward, bien que les eEPSCs présentent un seuil légèrement inférieur. J'ai enregistré un total de 74 cellules dans des conditions expérimentales différentes (Figure 24C) et dans 71 expériences sur 74, le premier IPSC appartenait à la population lente (20-80% rise-time moyen :  $3.3 \pm 0.13$  msec, allant de 1.56 à 6.38 msec, Figure 24C2). Pour les 3 autres expériences, le premier IPSC présentait des cinétiques rapides (20-80% rise-time moyen :  $0.65 \pm 0.03$  msec, allant de 0.61 à 0.7 msec, Figure 24C2). De plus, l'histogramme de distribution des 20-80% rise-times met en évidence des IPSCs qui répondent de manière hétérogène en fonction de l'intensité de stimulation : alors que les IPSCs lents sont recrutés par des stimulations faibles (1-9  $\mu\text{A}$ , Figure 24D), le recrutement des IPSCs rapides se fait par des intensités supérieures (10-30  $\mu\text{A}$ , Figure 24D).

Ainsi, s'il apparaît que les cellules étoilées sont recrutées efficacement par les fibres parallèles pour fournir aux cellules de Purkinje une inhibition feedforward, le seuil de recrutement des cellules en panier quant à lui se trouve être plus haut. D'autre part, les cellules en panier sont supposées fournir une inhibition « off-beam », causée par l'organisation parasagittale de ses dendrites et de son prolongement axonal et les cellules étoilées une inhibition « on-beam » (Altman et Bayer, 1997; Gao et al., 2006). Ainsi, notre stratégie expérimentale basée sur la détection des eEPSCs provenant des fibres parallèles afférant à la cellule de Purkinje (Figure 24), permettant de vérifier si le faisceau de fibres parallèles stimulé correspond bien au champ récepteur de la cellule de Purkinje, a certainement dû augmenter indirectement la distance entre les cellules en panier et le faisceau « on-beam » efficace. Cependant, aucune relation entre l'amplitude du premier eEPSC entraînant une inhibition de type feedforward (allant de 2 à 492 pA) et sa cinétique n'a pu être détectée (non montré), ce qui suggère que le recrutement des cellules étoilées par les fibres parallèles était systématiquement plus facile à atteindre que pour les cellules en panier, indépendamment de sa position « on » ou « off-beam ».



**Figure 24 : Recrutement du feedforward inhibiteur en tranche transversale de cervelet.**

A) Représentation schématique de la procédure expérimentale utilisée pour stimuler les fibres parallèles dans le but de recruter les cellules étoilées et les cellules en panier par feedforward. L'électrode de stimulation (flèche) est placée à 300  $\mu\text{m}$  du soma de la cellule de Purkinje enregistrée. B) Enregistrements typiques des eEPSCs (à -70 mV) et du recrutement en feedforward des IPSCs (+10 mV) selon des intensités de stimulation croissantes (de 2 à 15  $\mu\text{A}$ ). A la fin de chaque expérience, 1  $\mu\text{M}$  de NBQX est appliqué dans le bain pour démontrer le réel recrutement en feedforward (trace grise) (échelle : 500 pA, 5 msec). C) C1 : Histogramme de distribution des rise-times du premier IPSC recruté par feedforward, obtenu dans chacune des expériences décrite en A). C2 : Histogramme présentant le rise-time moyen du premier IPSC recruté par feedforward dans différentes conditions. Dans tous les cas il appartient à la population lente. D) Même représentation qu'en C1, mais détaillant la distribution des rise-time en fonction de l'intensité de stimulation (1-9  $\mu\text{A}$  et 10-30  $\mu\text{A}$ ) pour toutes les conditions, ainsi que pour toutes les intensités mais uniquement pour des stimulations distales. Les flèches indiquent le rise-time moyen de la population rapide. E) En haut : représentation schématique de la procédure de recrutement des faisceaux de fibres parallèles. L'électrode de stimulation est fixe et plusieurs cellules de Purkinje sont enregistrées comme indiqué. En bas : courbes « entrée / sortie » des recrutements « on-beam » et « off-beam » des interneurons, obtenues selon la procédure décrite plus haut. F) L'amplitude de l'eEPSCs n'influence pas le recrutement d'une population d'IPSC plus qu'une autre.

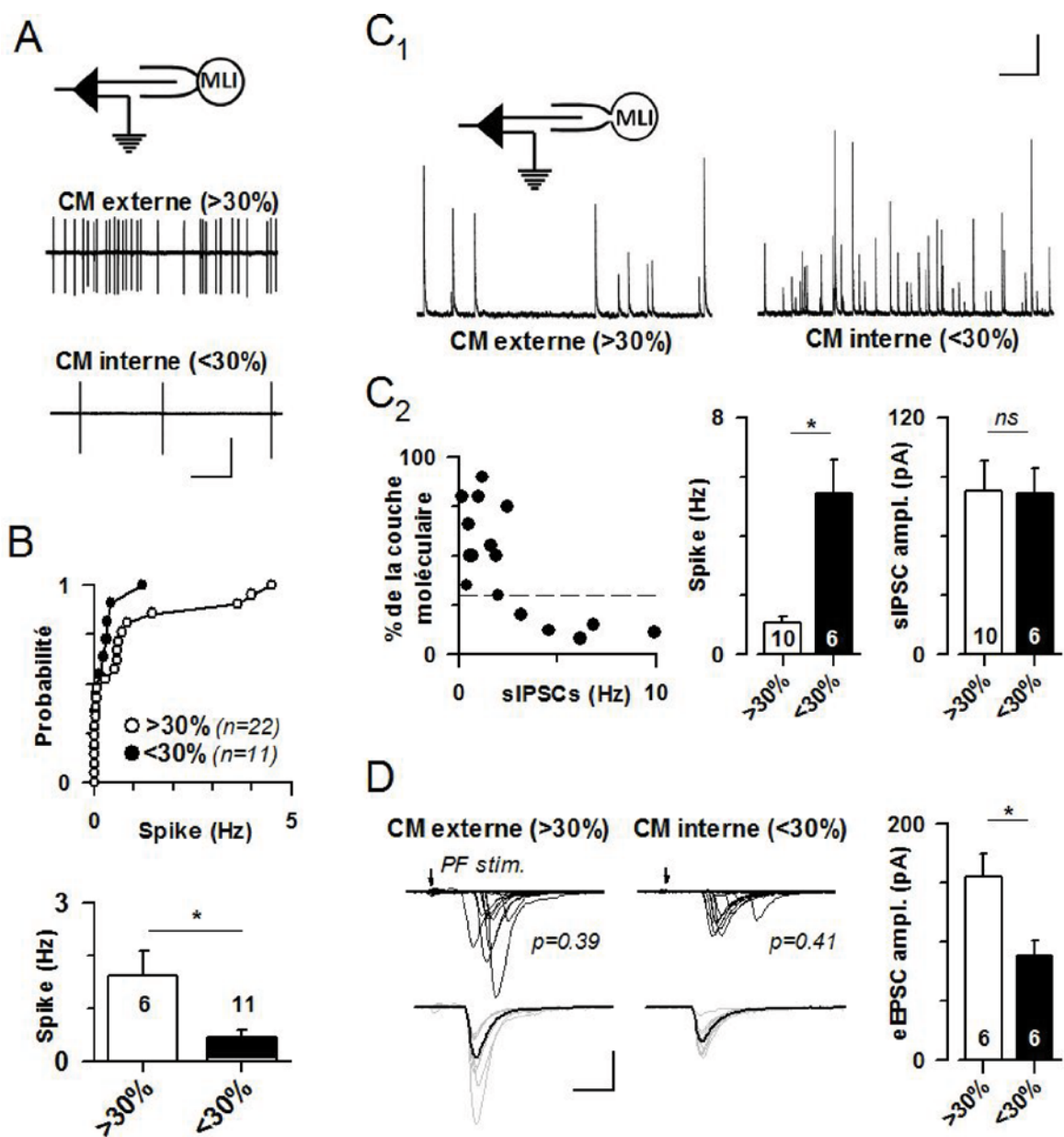


### 2.2.2. Les cellules étoilées et les cellules en panier n'expriment pas le même patron d'activité

Le profil de réponse des interneurons de la couche moléculaire doit refléter soit une excitabilité différente, peut être liée à une activité GABAergique afférente (Häusser et Clark, 1997), soit une différence dans le quantum de neurotransmission aux synapses entre les cellules étoilées et la cellule de Purkinje comparativement aux synapses entre les cellules en panier et la cellule de Purkinje. J'ai testé ces deux hypothèses par des enregistrements de ces interneurons à différents niveaux de la couche moléculaire à température physiologique en tranche transversale de cervelet de souris âgées de 14 jours (Figure 25). Pour éviter d'enregistrer par mégarde des cellules granulaires en migration, nous n'avons pris en compte dans l'étude uniquement les interneurons ayant subi toute la procédure expérimentale décrite ci-dessous en trois étapes, et répondant à une stimulation des fibres parallèles selon le protocole indiqué sur la Figure 25D.

Dans un premier temps, j'ai mesuré l'activité de décharge des interneurons de la couche moléculaire par des enregistrements en configuration cellule attachée (Figure 25A). Comme parfaitement illustré sur la Figure 25A, la fréquence moyenne de décharge des cellules étoilées (>30%, fréquence des PA :  $1.61 \pm 0.48$  Hz, n=11, Figure 25B) est significativement supérieure à celle des cellules en panier (<30%, fréquence des PA :  $0.43 \pm 0.16$  Hz, n=6,  $p < 0.05$ ). De manière intéressante, la fréquence de décharge des cellules étoilées correspond à la fréquence des IPSCs de grande taille TTX sensibles enregistrés sur la cellule de Purkinje.

Dans un deuxième temps, ces interneurons sont « ouverts » et maintenus à 0 mV pour pouvoir enregistrer les sIPSCs (Figure 25C). En tenant compte de la position de la cellule enregistrée dans la couche moléculaire, on observe que la fréquence des sIPSCs reçus par les cellules étoilées est significativement inférieure à celle reçue par les cellules en panier (>30%:  $1.05 \pm 0.2$  Hz, n=10, <30%:  $5.43 \pm 1.2$  Hz, n=6,  $p < 0.05$ , Figure 25C2). A l'inverse, l'amplitude de ces événements ne semble pas dépendante de la localisation (Figure 25C2). Ainsi, il apparaît que le niveau d'inhibition spontanée afférant aux interneurons de la couche moléculaire est clairement différent entre les cellules étoilées et les cellules en panier.



**Figure 25 : Il existe un gradient radial de l'activité dans la couche moléculaire.**

A) Enregistrements typiques de l'activité de décharge des cellules étoilées et des cellules en panier en configuration cellule attachée (échelle : 100 pA, 2 sec). B) en haut : Probabilité cumulée des enregistrements correspondants. En bas : Histogramme des fréquences moyennes correspondantes (\* :  $p < 0.05$ ). C) C<sub>1</sub> : Enregistrements des sIPSCs reçus par les cellules étoilées (outer, gauche) et les cellules en panier (inner, droite) (échelles : 100 pA, 1 sec). C<sub>2</sub> : gauche : Graphique présentant la fréquence des sIPSCs en fonction de la position de l'interneurone enregistré dans la couche moléculaire (%). Centre : Fréquences moyenne des sIPSCs reçues par les cellules étoilées (blanc) et les cellules en panier (noir) (\* :  $p < 0.05$ ). Droite : même représentation pour mes amplitudes (ns : non significatif). D) En haut : Enregistrements typiques des EPSCs évoqués par la stimulation minimale des fibres parallèles sur les cellules étoilées (gauche) et les cellules en panier (droite). En bas : Alignement et moyennage des mêmes enregistrements (echelle : 125 pA, 10 msec). Le taux de succès est représenté (p). A droite : Amplitude moyenne des eEPSCs reçus par les cellules étoilées (blanc) et les cellules en panier (noir) (\* :  $p < 0.05$ ).

Dans un troisième temps, les interneurones sont enregistrés à -70 mV simultanément à la réalisation de stimulations minimales de la fibre parallèle, afin d'évoquer des courants postsynaptiques excitateurs (eEPSCs) (Figure 25D). Comme pour les précédents travaux réalisés sur le rat (Carter et Regehr, 2002), nous avons observé que les stimulations minimales étaient suffisantes à l'activation de décharges de potentiels d'action sur les cellules étoilées (non montré). A nouveau, les résultats sont ségrégués en deux groupes, suivant la localisation du corps cellulaire de l'interneurone enregistré. Les eEPSCs moyens enregistrés sont différents entre les deux groupes, et apparaissent comme deux fois plus grands sur les cellules étoilées (Figure 25D).

L'ensemble de ces résultats suggère que les deux populations d'interneurones ont des niveaux d'activité différents, la grande majorité de l'activité étant observée sur les cellules étoilées qui reçoivent une charge inhibitrice plus faible ainsi qu'une charge excitatrice plus forte que les cellules en panier. Cependant, si la question de l'activité de chacun de ces interneurones a été abordée ici, il n'en reste pas moins la question de leur fonctionnement intégré au sein du réseau. Ceci implique aussi bien l'organisation du microcircuit dans lequel ils sont inclus, que l'organisation latérale par rapport aux bandes parasagittales. En effet, l'existence de faisceaux distincts « on-beam » et « off-beam » (Eccles et al., 1967) ainsi qu'une étude récente montrant un recrutement hétérogène de l'inhibition *in vivo*, superposable à l'organisation en bandes parasagittales de Zébrine-II (Gao et al., 2006), sont autant d'indices témoignant de leur forte implication dans le fonctionnement général du cervelet. Ainsi, nous avons cherché à déterminer l'organisation fonctionnelle de l'inhibition des cellules de Purkinje par les cellules étoilées et les cellules en panier, par rapport au patron d'expression en bandes zébrine.

### **2.3. Organisation des interneurones de la couche moléculaire par rapport aux bandes zébrine**

Dans le cortex cérébelleux, les bandes zébrine peuvent être associées à des microzones fonctionnelles définies par une organisation topographique des afférences grimpantes et restreintes à une région précise des noyaux profonds cibles. Une étude d'imagerie fonctionnelle *in vivo* réalisée sur le cervelet de souris suggère que l'inhibition évoquée par la stimulation d'un faisceau de fibres parallèles suit les bandes Zébrine-II positives (Gao et al., 2006). Ceci suggère que les interneurones de la couche moléculaire, qui sont contactés par les fibres parallèles, ne sont pas activés de manière homogène, mais

suivant une compartimentalisation parasagittale. Ainsi, nous nous proposons d'étudier la connectivité des interneurons de la couche moléculaire en fonction des bandes parasagittales délimitées classiquement par Zébrine-II.

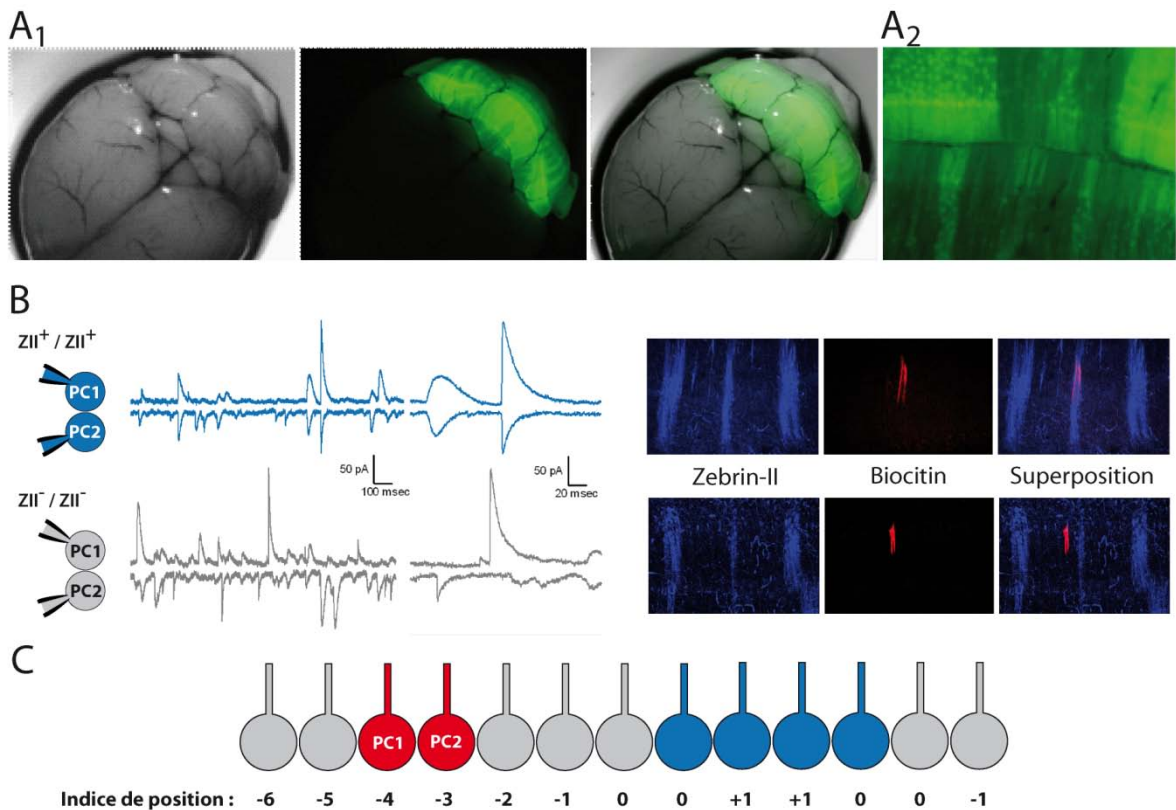
### 2.3.1. Approche méthodologique

Cette étude est abordée par des techniques électrophysiologiques et réalisée sur le cervelet de souris rapportrices, qui expriment la GFP sous le promoteur EAAT4 (Gincel et al., 2007) (Figure 26A). L'expression d'EAAT4 est quasi superposable à celle de Zébrine-II (Dehnes et al., 1998), ce qui nous permet d'appréhender les délimitations sur notre modèle de tranches transversales, dans le but de cibler les enregistrements. L'enregistrement des IPSCs sur des paires de cellules de Purkinje strictement voisines est réalisé de la même façon que décrit précédemment (Publication 1), et restreint à une zone centrée sur les bandes P1+, P1-, P2+ du lobe antérieur (Figure 26B).

Pour vérifier *a posteriori* la position précise des cellules enregistrées par rapport à l'expression de Zébrine-II, de la Neurobiotine est ajoutée au milieu intracellulaire contenu dans les pipettes d'enregistrement et un immunomarquage dirigé contre Zébrine-II est réalisé sur chacune des tranches (Figure 26B). Brièvement, les tranches aiguës de cervelet dont les cellules de Purkinje ont été enregistrées sont fixées (PFA 10 %, NaOH 0,4 % dans l'ACSF) pour subir un postmarquage selon un protocole classique utilisant :

- de la Streptavidine-AlexaFluor555 (dilution 1/500) pour révéler la Neurobiotine (0,02%) contenue dans les cellules enregistrées,
- un anticorps primaire monoclonal de souris dirigé contre zébrine-II (dilution 1/50, généreux don de R. Hawkes) et un anticorps secondaire polyclonal de lapin dirigé contre les antigènes de souris, marqué d'un AlexaFluor633 (dilution 1/500) pour révéler les bandes Zébrine-II.

L'analyse des évènements synchrones décrite dans la précédente section, ainsi que l'ensemble de la méthodologie utilisée pour isoler physiologiquement les cellules étoilées et les cellules en panier nous a permis de comparer la contribution respective de ces interneurons dans les différentes bandes parasagittales.



**Figure 26 : Approche expérimentale de l'étude de l'activité des interneurons de la couche moléculaire en fonction des bandes zébrines.**

**A) A1 :** La souris EAAT4-GFP permet la visualisation des bandes parasagittales *in vivo* et en tranche aiguë (A2) sous un microscope à épifluorescence. **B) Enregistrements de paires de cellules de Purkinje dans les bandes zébrine-positives (bleu) ou zébrine-négatives (gris) du lobe antérieur.** Le remplissage des cellules enregistrées est nécessaire au positionnement précis de ces cellules dans les bandes. **C) Schéma illustrant le positionnement des cellules enregistrées par rapport à la frontière entre les bandes.**

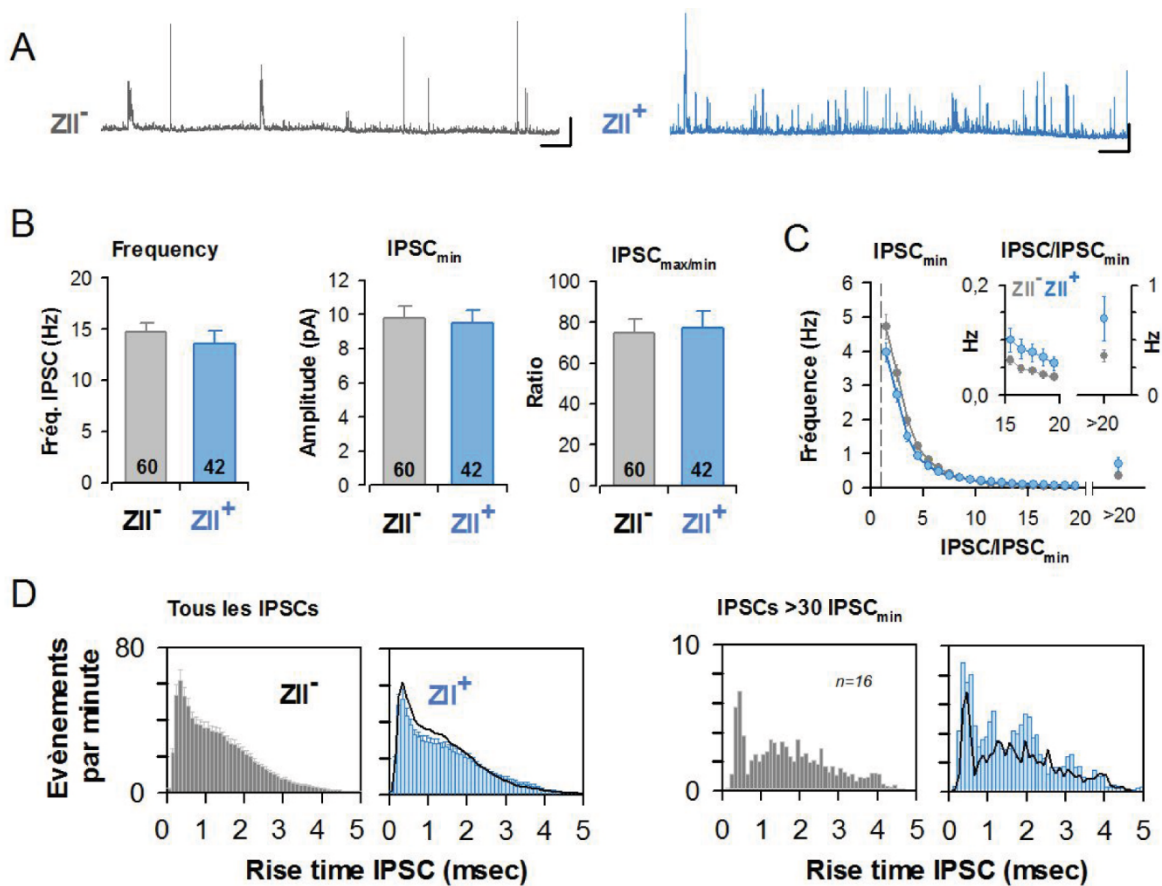
### 2.3.2. Analyse qualitative et quantitative des IPSCs reçus par les cellules de Purkinje en fonction des bandes zébrine.

Dans le cadre de notre étude des interneurons de la couche moléculaire, j'ai cherché à savoir dans un premier temps si la charge inhibitrice reçue par les cellules de Purkinje pouvait être différente entre les bandes zébrine-positives (ZII+) et zébrine-négatives (ZII-) (Figure 27). En comparant les fréquences et amplitudes de la globalité des sIPSCs enregistrés, aucune différence frappante n'a pu être observée entre ces deux populations de cellules (Figure 27A et B). L'analyse de la distribution des rise-times sur ces mêmes populations montre également des profils similaires (Figure 27D). Cependant, si l'on examine la distribution de l'amplitude normalisée des sIPSCs (Figure 27C) on observe une légère différence dans la fréquence des événements les plus grands (> 20 IPSCmin) entre les bandes ZII+ et ZII-. Cette différence est aussi observée

sur la distribution des rise-times de ces grands évènements (Figure 27D), qui semble composée d'une troisième population d'IPSCs de cinétique intermédiaire dans les bandes ZII+. La probabilité qu'un troisième type cellulaire puisse exister dans les bandes ZII+ paraît très peu vraisemblable, ainsi ce phénomène peut être le résultat d'une organisation différente des connexions entre les interneurons de la couche moléculaire et la cellule de Purkinje dans les bandes ZII+. Pour tester cette hypothèse, j'ai enregistré des paires de cellules de Purkinje strictement voisines, comme réalisé dans les expériences précédentes, dans le but d'isoler la population d'évènements synchrones. Cette condition expérimentale peut en effet nous renseigner sur l'organisation latérale des projections et des contacts synaptiques des interneurons sur les cellules de Purkinje dans les bandes ZII+ comparativement aux bandes ZII-.

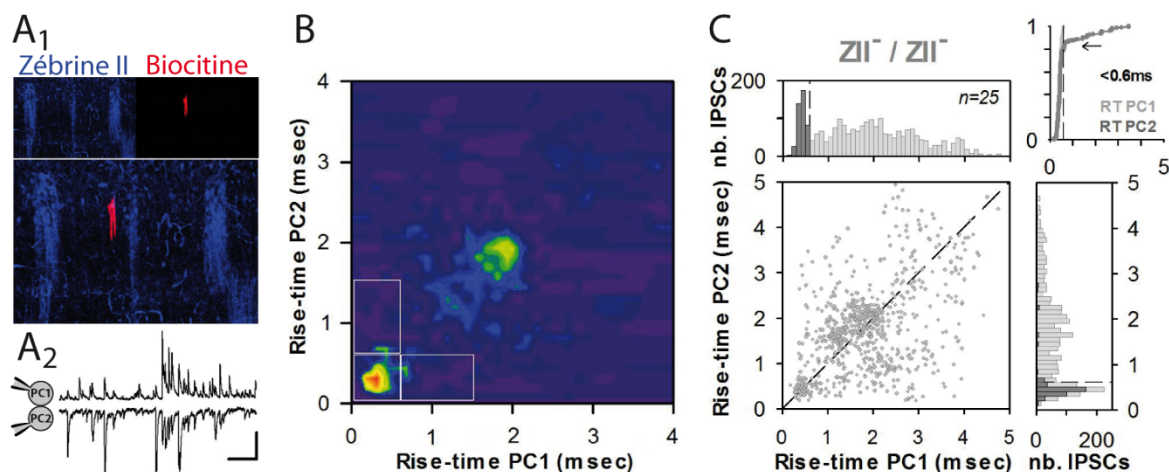
L'enregistrement des paires de cellules de Purkinje strictement voisines dans les bandes ZII- (Figure 28) met en évidence deux populations cinétiques d'évènements, une rapide, une lente, comparables à celles observées sur l'ensemble des travaux que nous avons réalisés (cf. Figure 18C, Figure 27C). Ceci indique que dans les bandes ZII-, deux cellules de Purkinje voisines sont contactées chacune d'une part par les cellules étoilées via un contact dendritique et d'autre part par les cellules en panier via un contact somatique. Dans la bande ZII+ nous avons identifié une population de cinétique intermédiaire (Figure 27C) que nous retrouvons sur les enregistrements en paires d'IPSCs synchrones (Figure 29). En effet nous observons l'apparition d'IPSCs synchrones qui ont des cinétiques rapides sur l'une des cellules de Purkinje et intermédiaire sur la deuxième (Figure 29B). Ceci traduit une organisation latérale différente des connexions entre les collatérales de la cellule en panier et la cellule de Purkinje dans les bandes ZII+, que nous n'observons pas pour les cellules étoilées. D'un point de vue physiologique, l'existence de cette population de cinétique intermédiaire pourrait être expliquée par un contact synaptique non pas somatique avec formation de la synapse en pinceau, mais un contact proximal au niveau du tronc dendritique de la cellule de Purkinje, comme il a pu être observé en imagerie (Palay et Chan-Palay, 1974).

Ainsi l'organisation des collatérales de la cellule en panier est différente au sein des bandes ZII+ et ZII-. J'ai à ce moment cherché à savoir si ce phénomène est observé sur toute la largeur de la bande parasagittale en analysant les profils obtenus par rapport à la frontière entre deux bandes.



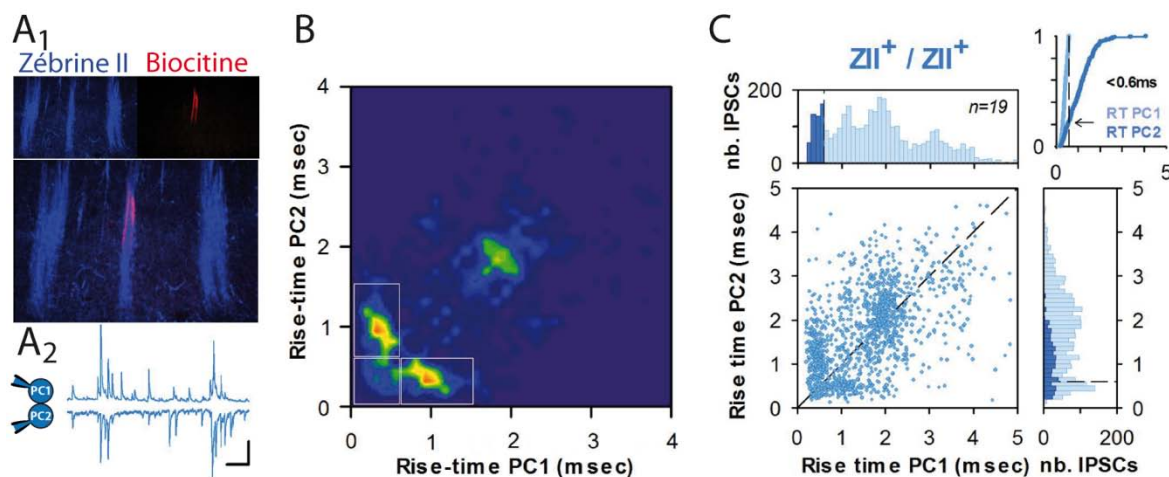
**Figure 27 : Les bandes zébrines positives et négatives reçoivent une activité inhibitrice spontanée similaire.**

**A)** Enregistrements typiques des IPSCs reçus de manière spontanée sur des cellules de Purkinje en bande zébrine-négative (ZII<sup>-</sup>, gris) et en bande zébrine positive (ZII<sup>+</sup>, bleu). **B)** La fréquence globale, l'amplitude du plus petit évènement (IPSC<sub>min</sub>), ainsi que la gamme d'amplitude globale normalisée entre le plus grand (max) et le plus petit (min) IPSC, reçus par les cellules de Purkinje sont similaires dans les bandes ZII<sup>+</sup> et ZII<sup>-</sup>. **C)** La distribution de l'amplitude des IPSCs normalisée par le plus petit évènement montre que pour les évènements les plus grand (>20 IPSCs min) il existe une différence significative entre les bandes ZII<sup>+</sup> et ZII<sup>-</sup>. **D)** Profils de distribution des 20-80% rise-times en fonction des bandes ZII<sup>+</sup> (bleu) et ZII<sup>-</sup> (gris), obtenus sur l'ensemble des IPSCs enregistrés (gauche) et sur les IPSC >30 IPSC<sub>min</sub> (droite).



**Figure 28 : Caractéristiques des sIPSCs reçus par les cellules de Purkinje dans les bandes zébrine négatives.**

A) A1 : Le postmarquage dirigé contre Zébrine II nous permet de positionner la paire de cellules de Purkinje enregistrée dans ce cas-ci dans une bande ZII-. A2 : condition expérimentale et tracés typiques obtenus par l'enregistrement de deux cellules de Purkinje voisines, PC1 et PC2. B) Diagramme de densité de la distribution des rise-times de la PC1 contre les rise-times de la PC2, montrant l'existence de deux populations cinétiquement distinctes. B3 : Nuage de points et histogrammes correspondants et les cellules en panier (noir) (\* :  $p < 0.05$ ).



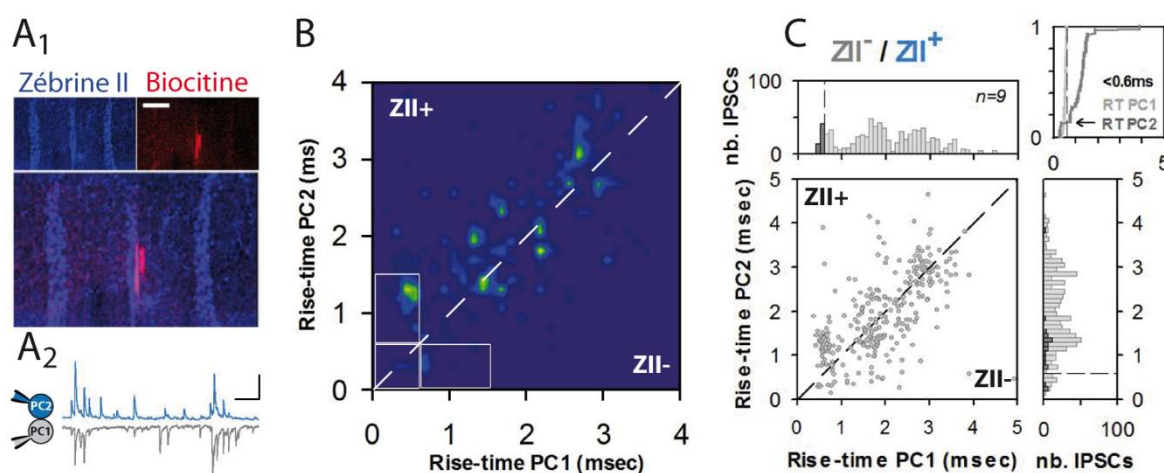
**Figure 29 : Caractéristiques des sIPSCs reçus par les cellules de Purkinje dans les bandes zébrine positives.**

A) B) et C) Mêmes représentations que pour la Figure 28. Les cellules de Purkinje sont enregistrées dans une bande ZII+ et le diagramme de densité montre l'existence de deux populations rapides distinctes (cadres), qui ont des cinétiques « intermédiaires ».



### 2.3.3. Analyse de l'organisation latérale des connexions à la frontière entre deux bandes parasagittales.

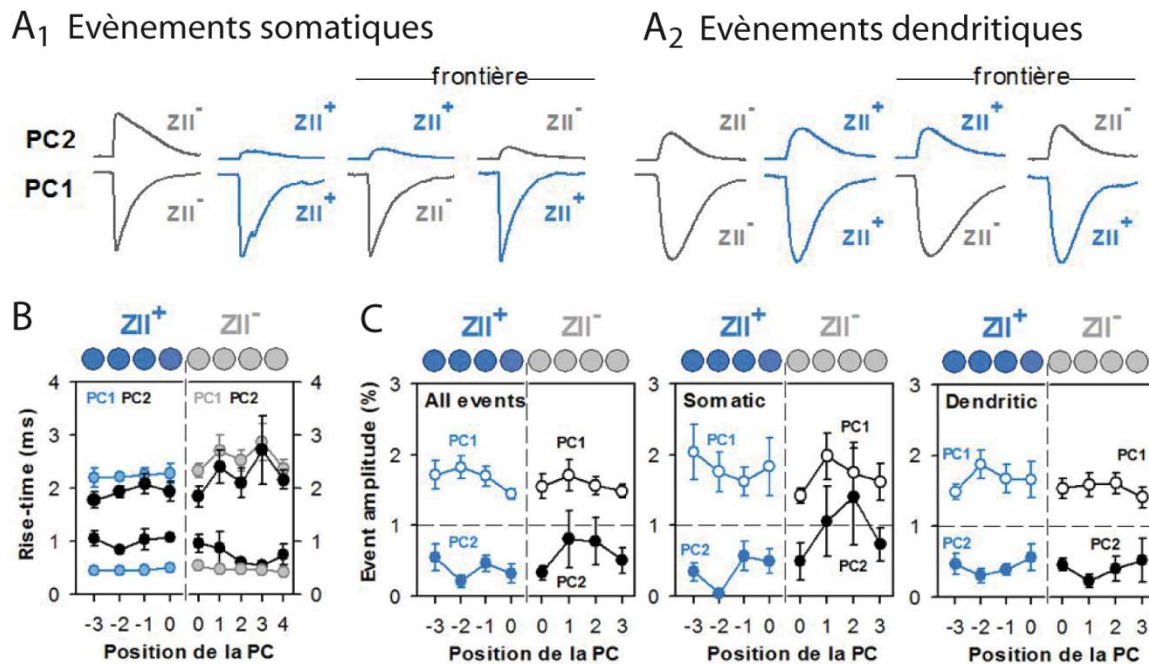
Si l'organisation des projections des cellules en panier semble globalement différente entre les deux types de bandes, il serait intéressant de vérifier si le phénomène suit strictement ou non les frontières du patron d'expression de Zébrine-II. En effet, ces marqueurs zébrés en bandes parasagittales sont fortement suspectés délimiter une organisation fonctionnelle sous-jacente, observée entre autre pour les afférences grimpantes (pour revue : Apps et Hawkes, 2009), mais qui serait également vraie pour les interneurons de la couche moléculaire (pour revue : Jörntell et al., 2010). Ainsi, j'ai enregistré des paires de cellules de Purkinje strictement voisines, à cheval sur la frontière entre les bandes ZII+ et ZII- (Figure 30). Dans cette condition, la fréquence des évènements inhibiteurs synchrones n'est pas nulle, ce qui indique qu'il existe des collatérales secondaires de l'axone de certains interneurons qui traversent la frontière entre les deux bandes. La distribution des rise-times obtenue pour ces évènements synchrones montre un profil inhabituel, pour lequel on distingue la population de cinétique intermédiaire sur la cellule ZII+ et rapide sur la cellule ZII- d'une part et un ensemble d'évènements lents d'autre part, prenant des valeurs relativement disparates (Figure 30B et C). Cette observation suggère que l'organisation des connexions des cellules en panier par rapport aux bandes Zébrine-II prend effet directement à la frontière entre deux bandes. De plus, le profil observé nous fait penser que les collatérales des axones des cellules en panier qui franchissent la frontière entre deux bandes ne forment pas de synapse somatique en pinceau sur les cellules de Purkinje appartenant à la bande ZII+, mais plutôt des synapses sur les dendrites proximaux.



**Figure 30 : Caractéristiques des sIPSCs reçus par les cellules de Purkinje en frontière de bandes.**

A) B) et C) mêmes représentations que pour les Figures 28 et 29. Les cellules de Purkinje sont enregistrées à cheval sur la frontière entre une bande ZII+ et ZII-.

La [Figure 31](#) reporte certains paramètres synaptiques en fonction de la position des paires de cellules de Purkinje enregistrées par rapport à la frontière de bande (cf. [Figure 26C](#)), illustrant que le phénomène est observé sur l'ensemble de la bande.



**Figure 31 : Les cellules en panier ont une organisation des projections qui est différente entre les bandes zébrine-positives et zébrine-négative.**

**A)** IPSCs typiques représentant la population somatique (A1) et dendritique (A2) dans toutes les conditions d'enregistrement : dans la bande ZII+ (bleu) dans la bande ZII- (gris) et à la frontière entre deux bandes. **B)** Diagramme représentant le rise-time de la PC1 (bleu pour la bande ZII+, gris pour la bande ZII-) par rapport à la PC2 (noir), en fonction du positionnement de la paire par rapport à la frontière et pour les populations dendritiques (cinétiques lentes, en haut) et somatiques (cinétiques rapides, en bas). **C)** Diagrammes présentant l'amplitude en pourcentage du seuil de détection pour tous les évènements (gauche), la population somatique (centre) et dendritique (droite).

En conclusion, on constate que l'organisation des projections des interneurons de la couche moléculaire n'est pas comparable entre les cellules étoilées et les cellules en panier. En effet, contrairement aux cellules étoilées, les projections des cellules en panier paraissent sensibles à « l'identité » de la cellule de Purkinje cible, en fonction de la bande longitudinale délimitée par le marqueur Zébrine-II à laquelle celle-ci appartient. Ce phénomène est vrai pour toute la largeur de la bande, et ce dès la frontière qui les sépare, renforçant l'idée que les marqueurs en patron zébré délimitent des zones anatomiques et fonctionnelles.



## TROISIEME PARTIE : DISCUSSION GENERALE

# 1. Validité des modèles et méthodes d'étude

## 1.1. Le modèle animal pour mimer la physiologie humaine

L'étude des systèmes pathologiques permet d'une part d'aller vers la compréhension des mécanismes à leur origine dans le but de trouver des traitements, et d'autre part d'enrichir la compréhension des mécanismes biologiques et comportementaux sains. L'intérêt d'étudier les pathologies humaines sur le modèle animal plutôt que sur des patients est multiple. La raison principale est un souci évident d'éthique, car une grande partie de nos connaissances en biochimie, physiologie ou pharmacologie, n'auraient pu être expérimentées sur l'homme. L'utilisation des modèles animaux comme base de l'expérimentation est à ce moment possible étant donné que tous les êtres vivants présentent des similitudes biologiques que nous pouvons aisément exploiter. Prenons un exemple ; la jonction neuromusculaire de grenouille a été utilisée dans les années 1950 pour étudier le principe de la neurotransmission (Fatt et Katz, 1951) en raison de sa facilité d'accès et de la bonne qualité des enregistrements obtenus avec la technologie de cette époque. Effectivement, la neurotransmission chez les batraciens est analogue à celle des mammifères, et ne diffère que légèrement par l'architecture de la plaque motrice. Ainsi un « bon » modèle sera défini pour une condition expérimentale qui possède le plus de similitudes avec le phénomène étudié chez l'homme, et ne peut en aucun cas être appréhendé indépendamment de la problématique posée. Dans notre contexte global d'étude de la physiologie synaptique du cervelet, nous avons fait le choix du modèle murin, qui, comme l'homme, fait partie de la classe des mammifères. A ce titre, tous deux possèdent une organisation semblable du système nerveux et *a fortiori* du cervelet, ce qui nous permet de penser que les phénomènes observés chez la souris pourront par extension possiblement être transposés chez l'homme.

Une autre dimension apportée par les modèles animaux concerne la fabrication d'animaux transgéniques, modifiés génétiquement dans des buts divers : surexprimer ou invalider un gène pour étudier les conséquences de la modification, ou encore exprimer un gène rapporteur de manière constitutive afin de pouvoir suivre la localisation grâce à une protéine chimère. La souris fait partie de la petite portion d'animaux chez qui les manipulations génétiques sont possibles depuis plus d'une décennie. Dans le cadre de ma problématique de thèse, j'ai bénéficié de cette technologie pour étudier d'une part les conséquences physiologiques de l'inactivation du gène *il1rap1* chez la souris « KO *il1rap1* ». Dans ce cas, l'inactivation du gène chez la

souris mime une mutation du gène humain, toutes deux impliquant l'absence d'expression de la protéine il1rapl1. Cet animal nous permet donc d'étudier les conséquences de l'absence de la protéine IL1RAPL1 sur un organisme proche de celui de l'homme. D'autre part, j'ai pu utiliser la souris « EAAT4-GFP », qui exprime une protéine chimère couplée à la célèbre protéine fluorescente verte, pour visualiser la compartimentalisation du cervelet. Cette technique est nécessaire à la visualisation *ex vivo* des bandes parasagittales sur les tranches aiguës de cervelet, dans le but de cibler les enregistrements de neurones. Cependant, l'organisation modulaire du cervelet est plus classiquement délimitée selon le patron de Zébrine-II, et non pas suivant le patron de la protéine EAAT4. Or, il apparaît que le patron d'expression de cette dernière est quasi superposable à celui de Zébrine-II, ce qui nous permet d'utiliser cet animal comme souris « rapportrice » de la segmentation du cervelet.

Quatre critères proposés par Weiss et Kilts en 1998 sont communément utilisés pour évaluer la validité des modèles animaux créés pour mimer une pathologie humaine : 1) le critère d'étiologie, qui implique que les causes du syndrome induit chez la souris, soient similaires à celles de la pathologie humaine, 2) le critère d'homologie, qui implique que les manifestations observées chez l'animal ressemblent aux symptômes cliniques des patients, 3) le critère de physiopathologie, qui veut que les mécanismes pathologiques soient analogues chez l'humain, et 4) le critère de réponse au traitement qui se doit de concorder entre le modèle et le patient.

Dans notre contexte, la souris KO il1rapl1, comme beaucoup de modèles animaux du retard mental lié au chromosome X, nous permet de satisfaire au moins un critère de validité : le critère d'étiologie. Celui-ci est respecté par définition chez notre animal transgénique, puisqu'il recrée la perte de fonction d'une protéine, suite à la mutation du gène correspondant. Les autres critères quant à eux sont plus difficiles à satisfaire. Le critère de physiopathologie par exemple, ne pourra être validé complètement que lorsque l'ensemble des dysfonctionnements sera étudié à la fois chez la souris et chez l'homme, ce qui constitue un objectif très lointain. Toutefois, la lumière a pu être faite sur certaines problématiques. Par exemple, chez les patients atteints de retard mental, il est couramment observé que les neurones présentent une altération de la morphologie des épines dendritiques qui est également retrouvée dans la plupart des modèles animaux du retard mental (Kaufmann et Moser, 2000 ; Humeau et al., 2009). Le critère de réponse au traitement est intimement lié au critère de physiopathologie, car pour traiter un trouble, il faut d'abord connaître les mécanismes pathologiques qui l'engendrent avant d'imaginer la manière de les corriger. De plus, cela implique que le médicament soit non seulement déjà testé sur l'animal, mais également en stade de test clinique pour que ce critère soit validé, mais dans le cas de il1rapl1, aucun traitement n'existe à

ce jour. Le dernier critère, le critère d'homologie, peut sembler inapproprié dans le cadre de l'étude des retards mentaux. En effet, s'il peut être étudié chez l'animal des comportements alimentaires, moteurs, sensoriels, etc. il paraît difficile d'étudier la similitude de symptômes cognitifs comme la baisse des capacités intellectuelles, et d'autant plus dans les cas de retards mentaux non-syndromiques comme ceux provoqués par la mutation de *IL1RAPL1*, pour lesquels seules les déficiences mentales sont observées.

Le modèle KO *il1rapl1* ne satisfait donc que peu de critères de validité, mais il convient à ce moment de se poser la question d'une part de la pertinence de chacun de ces critères et d'autre part du bien fondé de vouloir obtenir un modèle dit « valide ». En effet, un modèle « valide » deviendrait à ce moment parfaitement inutile à la recherche puisqu'il aura entièrement rempli sa fonction qui est de reproduire l'origine, les mécanismes pathologiques et les conditions de traitement à la fois chez l'homme et le modèle. Cette discussion nous amène toutefois à la question de la légitimité d'utiliser le cervelet de souris comme modèle d'étude du réseau neuronal, de surcroît dans le cadre général du retard mental.

## **1.2. La tranche aiguë de cervelet dans le contexte du retard mental**

Le modèle que nous utilisons pour étudier la physiopathologie synaptique des retards mentaux est la tranche aiguë de cervelet, prélevée sur des souris mutées pour un gène impliqué dans des retards mentaux monogéniques liés au chromosome X. Le choix du cervelet avait été fait avant mon arrivée dans le laboratoire, pour de multiples raisons : 1) le cervelet possède une organisation précise, répétitive et bien documentée car cette apparente simplicité a attiré un grand nombre de chercheurs, notamment en électrophysiologie, 2) l'équipe en place a une bonne connaissance de cette structure, étant donné qu'elle lui sert de modèle depuis de longues années, 3) le développement du cervelet se fait après la naissance chez la souris, ce qui nous a permis d'étudier certains aspects de la maturation des circuits ([Publication 1](#)), 4) les protéines synaptiques liées à un retard mental dont nous disposons des animaux mutés ont un fort taux d'expression dans le cervelet et dans les cellules de Purkinje en particulier, et 5) il existe un courant d'idées qui impliquerait le cervelet dans les fonctions supérieures et la cognition, dont nous discuterons plus bas dans cette section.

Le choix d'utiliser la tranche aiguë présente un certain nombre d'avantages et d'inconvénients. En effet celle-ci permet entre autre une rapidité de préparation et une grande facilité d'accès aux cellules pour l'enregistrement qui ne sont pas possibles lors d'expérimentations *in vivo*, ainsi que la conservation des cellules du réseau dans un état plus proche de leur environnement original comparativement à des cellules en culture. En revanche, si elles permettent d'avoir une bonne idée du réseau local, comme par exemple la connectivité des interneurons de la couche moléculaire sur les cellules de Purkinje, elles ne permettent pas d'avoir une vue intégrée de l'ensemble du fonctionnement de la structure, ce qu'il serait intéressant d'envisager pour l'étude du fonctionnement modulaire par exemple. De plus, l'organisation géométrique des cellules du cortex cérébelleux fait que certains dendrites et axones sont organisés transversalement (c'est le cas des fibres parallèles, qui courent sur des longueurs pouvant aller jusqu'à plusieurs millimètres) et d'autres longitudinalement (comme les cellules de Purkinje), ce qui peut être problématique pour conserver les longs prolongements. Ainsi, sur les deux principaux travaux que j'ai réalisés durant ma thèse, j'ai été amenée à pratiquer des tranches de section parasagittale ([Publication 1](#)) et des tranches de section transversale / horizontale ([Publication 2](#)). Les tranches parasagittales permettent de visualiser le cortex cérébelleux ainsi que les noyaux profonds et de garder intactes l'arbre dendritique des cellules de Purkinje et leurs projections aux noyaux profonds. Les tranches transversales étaient nécessaires à la conservation des fibres parallèles, la visualisation des compartiments délimités par les bandes zébrine et à l'étude des connections des collatérales des interneurons au sein de ces bandes. De ce fait, la cellule de Purkinje ne devrait pas strictement recevoir la même activité dans ces deux configurations, et en effet, les profils de distribution des rise-times des sIPSCs ne sont pas parfaitement identiques. En tranches parasagittales, nous observons systématiquement deux populations cinétiques ([Figure 18](#)), alors qu'en tranches transversales il semblerait que l'on ait plus tendance à observer une troisième population de cinétique intermédiaire en plus des deux autres ([Figure 27](#)), que nous avons identifiée comme correspondant aux collatérales des cellules en panier.

Le cervelet est bien connu pour ses fonctions dans le contrôle de la motricité, mais depuis quelques décennies des évidences renforcent la possibilité qu'il soit impliqué dans les fonctions cognitives. Sans revenir sur les exemples déjà cités dans le présent manuscrit à la section 1.5.2, je pense nécessaire d'apporter quelques compléments à ce stade de la discussion, notamment en ce qui concerne l'implication du cervelet dans le retard mental. En effet, des études cliniques font indirectement le lien entre le cervelet



et la cognition, à travers des cas cliniques de retard mental et dont quelques exemples sont cités ci-dessous.

Le groupe des lissencéphalies dites de type II, présente des malformations cérébrales complexes, affectant en premier lieu le cervelet, les voies optiques et les muscles. A un stade avancé, les cortex cérébral et cérébelleux sont totalement désorganisés, sans aucune ébauche architectonique, avec alternance de zones d'agyrie et de micropolygyrie ; il existe en outre une hypoplasie vermienne, un défaut de myélinisation et une hydrocéphalie (des Portes et al., 2000).

Une pathologie découverte récemment, dénommée « cerebellar cognitive affective syndrome » (Schmahmann et Sherman, 1997, 1998 ; Tavano et al., 2007) pour laquelle les patients présentent des lésions du lobe postérieur du cervelet et/ou du vermis, se manifeste par différents troubles cognitifs comme une altération des fonctions exécutives telles que la planification, la fluidité verbale, le raisonnement abstrait et la mémoire de travail ; des difficultés avec la cognition spatiale, impliquant la mémoire, l'organisation visuo-spatiale etc.

Si l'on prend en compte l'importance, toujours grandissante, des travaux qui soulignent une relation entre le cervelet et la cognition ou plus particulièrement dans notre cas le cervelet et le retard mental, il paraît difficile de rejeter complètement le fait que cette structure puisse avoir une influence sur les fonctions supérieures. Du reste, pour élargir le débat, il paraît plutôt réducteur d'essayer d'assigner une fonction précise à une structure précise, car le système nerveux doit être considéré comme un réseau de structures interconnectées les unes avec les autres. Pour ma part, je préfère considérer le circuit cérébelleux d'avantage comme un modèle d'étude de la physiopathologie des synapse et de la maturation des circuits neuronaux, que comme un réel modèle d'étude d'une structure cognitive dont la déficience entraîne les symptômes mentaux connus.

Dans ce cadre, il paraît intéressant en outre de se demander si les résultats que l'on obtient avec les synapses cérébelleuses peuvent être généralisés à l'ensemble des synapses du système nerveux central, autrement dit, si le cervelet est un bon modèle de circuit synaptique. A ce titre un élément de perspective qui peut être apporté à mon travail serait d'élargir l'étude des déficits observés sur le KO *il1rap1* à d'autres structures comme l'hippocampe, le cortex cérébral, l'amygdale, mais également d'aller vers une étude comparative des différents troubles observés lors de différentes mutations. Un élément de réponse peut déjà être apporté à cette question, puisqu'il a été démontré par notre équipe que la synapse entre les afférences corticales et l'amygdale latérale présente un déficit de LTP chez les modèles murins de retard mental (*il1rap1*, *ophn1*, *rsk2* et *gdi1*).

De plus, au delà de notre modèle en tranche aiguë de cerveau, il paraît intéressant d'envisager *in vivo* l'étude des circuits neuronaux et des mécanismes qui sous-tendent certaines fonctions cognitives. Dans le cervelet ceci pourrait être appréhendé par l'étude du conditionnement du réflexe de « eyeblink ». En effet, du fait de la simplicité du paradigme, le phénomène de conditionnement décrit par Ivan Pavlov en 1927 est encore largement utilisé pour étudier l'apprentissage et la formation de la mémoire (Boele et al., 2010). Brièvement, le réflexe de fermeture de la paupière est un réflexe défensif observé naturellement chez les animaux. Il peut être évoqué par une stimulation de la zone périoculaire par un flux d'air par exemple (US, unconditioned stimulus). Suite à une période d'entraînement, ce réflexe de fermeture de la paupière peut être évoqué par une stimulation normalement neutre pour l'animal, comme par exemple un son (CS, conditioned stimulus). La période d'entraînement (de conditionnement), consiste à présenter à l'animal les deux stimuli successivement, pour qu'il associe le stimulus neutre (le son) au stimulus agressif (le souffle d'air), provoquant une réponse conditionnée (CR), c'est-à-dire concrètement un réflexe de fermeture de la paupière suite à la stimulation sonore. Dans ce processus d'apprentissage, ce qui est classiquement étudié est la latence d'apparition du conditionnement, qui est fortement dépendante du cervelet dans ce cas-ci (Koekkoek et al., 2003). Or il a été observé dans des cas de retards mentaux comme le syndrome du X Fragile, que cette latence était retardée par rapport aux individus contrôle (chez l'homme : Tobia et Woodruff-Pak, 2009). Ainsi, ces différentes approches, impliquant différents niveaux d'étude, semblent être de bonnes pistes pour explorer les altérations du traitement de l'information qui ont lieu chez des individus présentant des pathologies mentales.

Pour conclure, il apparaît inévitable d'utiliser des modèles animaux (*in vivo*, *ex vivo*) ou des modèles de substitution (*in vitro*, culture cellulaire, modélisation *in silico* etc.) dans la recherche en sciences de la vie, mais ceci ne trouve du sens que dans la mesure où ils peuvent être comparés aux mécanismes observés chez l'humain, et en connaissant les limites associées à l'utilisation de ces modèles. En effet, inévitablement, les différences entre les cerveaux humains et dans notre cas murins, comme par exemple l'absence de circonvolutions cérébrales chez la souris, les divergences qui existent durant le développement, ou le fait même que les animaux ne soient pas doués des mêmes capacités de cognition que nous, restent des obstacles majeures à l'obtention d'une compréhension totale du fonctionnement du système humain.

### 1.3. Utilisation des paramètres synaptiques dans l'étude des circuits neuronaux

De nombreuses molécules (lipidiques, protéiques) composent la synapse, aussi bien du côté pré- que postsynaptique et sont nécessaires au bon fonctionnement de la neurotransmission (Tritsch et al., 1999). Celle-ci engendre un changement transitoire du potentiel de membrane de la cellule postsynaptique, qui peut être visualisé en patch clamp en configuration cellule entière, comme un courant postsynaptique (PSC). Ces courants sont caractérisés par leur « rise-time », « decay-time » et amplitude qui renseignent sur la physiologie des compartiments pré- et postsynaptiques, ainsi que de leur fréquence qui reflète l'activité du circuit en amont. Or certaines mutations provoquant un retard mental chez l'individu peuvent toucher un gène à l'origine d'une protéine participant au fonctionnement de la synapse (Chelly et al., 2006 ; Humeau et al., 2009 ). L'absence de cette protéine impliquera dans certains cas la modification de la transmission synaptique, cette modification pouvant être visualisée en suivant les paramètres synaptiques des neurones du réseau étudié.

IL1RAPL1 est un récepteur orphelin, connu pour interagir d'une part avec NCS-1 du côté présynaptique, et d'autre part avec PSD-95 du côté postsynaptique. Son influence sur la neurotransmission a pu être mise en évidence par l'étude électrophysiologique de réseaux de neurones dans des conditions spécifiques. En effet, nous avons choisi d'enregistrer les courants postsynaptiques inhibiteurs spontanés et évoqués sur des cellules de Purkinje maintenues à un potentiel de +10/+30 mV, en utilisant une solution intracellulaire contenant du césium (Cs) et du QX314, pour éviter que la dépolarisation n'entraîne la décharge de potentiels d'actions. Cette condition expérimentale nous permet d'isoler les courants inhibiteurs des courants excitateurs, sans avoir à appliquer de bloqueurs sur la tranche aiguë. Cette précaution est nécessaire dans nos expériences pour observer le recrutement de type feedforward exercé par la fibre parallèle et conserver le réseau dans un état plus physiologique.

Dans la [Publication 1](#), nous avons montré un réveil précoce des interneurons de la couche moléculaire, qui se traduit par une forte augmentation de l'amplitude des courants postsynaptiques entre p10 et P14 chez le KO il1rapl1, dépendante de l'activité feedforward de la fibre parallèle. De par la nature quantique de la neurotransmission, l'amplitude des courants postsynaptiques est liée d'un côté au nombre d'évènements de fusion vésiculaire déclenchés par l'arrivée du potentiel d'action présynaptique, et de l'autre par la composition en sous-unité du récepteur qui détermine la conductance

unitaire des récepteurs (pour revue, voir Mayer et Armstrong 2004). Ainsi, aux vues de l'interaction de IL1RAPL1 avec NCS1 et PSD-95, on pourrait donc imaginer à la fois un dysfonctionnement dans le processus de libération des neurotransmetteurs au niveau de la présynapse et une altération des mécanismes postsynaptiques impliquant les récepteurs canaux à la synapse entre les fibres parallèles et les interneurons de la couche moléculaire, causés respectivement par ces protéines. Pour vérifier ces hypothèses, l'utilisation des seuls paramètres synaptiques est insuffisante. Il conviendrait de mener une étude et une analyse des paramètres quantiques de la neurotransmission pour connaître l'origine précise du dysfonctionnement.

## **2. Importance de l'activité neuronale pendant le développement**

Le fonctionnement du système nerveux repose schématiquement sur une organisation des connexions qui se mettent en place au cours du développement et les modifications qui s'acquièrent lors de l'expérience de l'individu. Concernant le premier point, il est connu que la formation des connexions se fait en un processus en plusieurs étapes : la croissance chimioguidée des axones des neurones par le cône de croissance dans des voies spécifiques, la reconnaissance de la cible pour l'établissement de la connexion initiale puis une étape de dynamique de la synapse pendant laquelle les connexions s'affinent, se remodelent, se rétractent ou se renforcent etc. pour arriver d'une synapse grossière à une synapse mature (pour revue : Goodman et Shatz, 1993). Contrairement aux deux premières étapes, cette dernière nécessite une activité neuronale et ne s'arrête pas à la fin du développement du système nerveux, mais continue tout au long de la vie. En effet, les entrées sensorielles provenant du monde extérieur continuent de modifier la structure des dendrites (Purves et al., 1986 ; Bailey et Chen, 1989), les prolongements axonaux ou la force des synapses, ce qui constitue le phénomène appelé « plasticité neuronale ».

Dans le cervelet, il est connu que la dendritogenèse particulière de la cellule de Purkinje a lieu en même temps que le développement des afférences synaptiques et que celles-ci sont nécessaires à son bon développement. En effet, chez les souris weaver et reeler par exemple, pour lesquelles le cervelet ne possède pas de cellules granulaires qui constituent habituellement plus de 90 % des connexions afférant à la cellule de Purkinje, les somas des cellules de Purkinje sont mal alignés, ont des dendrites désorientés, moins ramifiés, et qui présentent un retard de croissance (Sotelo, 1978, 2004; Crepel et al., 1980; García-López et al., 2010). Un autre exemple célèbre de

développement dépendant de l'activité neuronale est la formation de la carte retinotectale, qui ne pourrait atteindre le degré de précision observé sans la décharge des neurones du nerf optique (grenouille : Meyer, 1982, 1983 ; poulet : Kobayashi et al., 1990 ; souris : Benedetti, 1995). De plus, ces décharges doivent avoir non seulement lieu dans une fenêtre temporelle précise, mais également selon un patron de décharge précis (Schmidt et Eisele, 1985 ; Cook et Becker, 1990) pour produire un effet permanent, alors qu'en dehors de ces conditions elles n'auront pas d'effet. Mais ces périodes critiques du développement, largement illustrée sur les systèmes sensoriels et moteurs, peuvent-elles avoir une influence au niveau du comportement ou de la cognition ? D'une part, dans notre contexte, de nombreuses mutations de gènes impliquées dans le développement neuronal ont été associées à des cas sévères de retards mentaux (Vaillend et al., 2008b). D'autre part, nous pouvons également citer une expérience menée par Harry Harlow en 1958, qui a démontré que la privation maternelle et sociale de macaques rhésus nouveaux nés, entraînait au moment de leur réinsertion, des comportements autistiques qui ne sont pas observés chez des individus isolés à des âges plus avancés. Bien que les mécanismes physiologiques de ce phénomène ne soient pas connus, il semblerait que l'activité neuronale que l'on pourrait observer chez ces individus affectés soit différente de celle des individus non affectés.

Ainsi, aux vues de ces exemples, il est tentant de penser que toute anomalie, même transitoire, de l'activité électrique des neurones pourrait être responsable de l'étiologie de pathologies mentales.

D'un point de vue moins intégré, nos résultats amènent un certain nombre de questions. Premièrement la question très générale de la fonction de IL1RAPL1 dans le système nerveux central. Ce récepteur est-il activé par un mécanisme / une molécule connu ? Une partie de réponse a été apportée récemment par nos collaborateurs, l'équipe de Jamel Chelly, qui suggèrent que IL1RAPL1 pourrait être le récepteur, ou le co-récepteur, de IL-1 $\beta$ . Cette molécule induirait la modulation des fonctions cognitives via la voie IL-1/IL1RAPL1/JNK dans les neurones pour modifier la localisation de PSD-95 (Avital et al., 2003 ; Ross et al., 2003 ; Goshen et al., 2009 ; Pavlowsky et al., 2010b), tout du moins dans les synapses excitatrices. Si ces découvertes à l'échelle moléculaire et comportementale sont avérées, il n'en reste pas moins la question des mécanismes physiopathologiques à l'échelle du réseau neuronal, à laquelle notre équipe pourrait éventuellement répondre.

Pour arriver à une étude complète, il faudrait pouvoir déterminer les mécanismes qui sous-tendent le réveil précoce des interneurones de la couche moléculaire, ainsi que les

conséquences induites sur le cervelet, le système nerveux, l'organisme, voir l'individu entier avec son expérience, ses comportements et ses émotions. En effet, nous savons que le développement implique une succession de mécanismes qui doivent être suivis dans un contrôle spatial et temporel strictes, mais est-ce réellement le cas du phénomène que nous avons observé ? Autrement dit, la période entre P10 et P14 chez la souris est-elle une période critique du développement des connexions du cervelet ? En tout les cas cette période correspond précisément au début des connexions précoces entre la fibre parallèle et les cellules de Purkinje, entre les interneurons de la couche moléculaire et les cellules de Purkinje, ainsi que la disparition de la multiinervation des cellules de Purkinje par les fibres grimpanes. De plus la suractivation de ces neurones entre P10 et P14 provoque une levée d'inhibition de la cellule de Purkinje sur les noyaux profonds cérébelleux pendant la même période, mais influence-t-elle l'activité synaptique durablement ? A ce jour il est difficile dans ces conditions expérimentales de vérifier si après P14 il y a un retour à la normale de l'activité synaptique sur les noyaux profonds ou si le phénomène persiste, car les neurones qui les composent sont difficiles à enregistrer après P14. Influence-t-elle l'activité des noyaux profonds cérébelleux vers ses cibles ? Etant donné la diversité et la localisation des cibles des noyaux profonds il paraît également impossible de répondre à cette question dans la configuration expérimentale actuelle, *ex vivo*. Par contre, une perspective à court terme serait de pouvoir identifier qui des cellules étoilées ou des cellules en panier contribue au réveil précoce de l'inhibition de la cellule de Purkinje.

### **3. Physiologie et rôles des interneurons de la couche moléculaire**

La question du rôle respectif des cellules en panier et des cellules étoilées n'a jamais pu être clairement déterminée, principalement en raison de l'absence de marqueurs spécifiques permettant de les différencier (Simat et al., 2007; Schilling et al., 2008). Dans l'étude qui fait l'objet de la [Publication 2](#), nous avons pu séparer physiologiquement ces deux types cellulaires grâce aux paramètres synaptiques que chacun exprime sur les courants postsynaptiques inhibiteurs enregistrés au niveau de la cellule de Purkinje. Ce critère d'identification nous a permis de tester leur rôle respectif au sein du cortex cérébelleux, et en particulier par rapport aux modules parasagittaux délimités par le marqueur Zébrine-II.

### **3.1. La cinétique des IPSCs enregistrés sur les PCs permet d'identifier les interneurons de la couche moléculaire**

L'une des principales observations de notre étude est l'existence de deux populations d'évènements synaptiques, chacune caractérisée par des cinétiques spécifiques. Cette différence doit vraisemblablement résulter de propriétés intrinsèques différentes entre les interneurons de la couche moléculaire, telles que la localisation de leurs contacts synaptiques sur la cellule de Purkinje. Ces deux populations d'évènements cinétiquement différents avaient déjà été observées par Llano et ses collaborateurs (2000), qui proposaient que la population rapide devait correspondre à des IPSCs non filtrés, arrivant à proximité du soma des cellules de Purkinje où a lieu l'enregistrement. Cette hypothèse n'avait pas été vérifiée expérimentalement jusqu'à ce jour, et l'ensemble des résultats présentés dans la section 2.1 nous conforte dans cette idée. En effet d'une part, l'étude développementale (Figure 19) de la variabilité des rise-times suggère que les évènements lents proviennent de synapses se formant en parallèle à la croissance de l'arbre dendritique de la cellule de Purkinje, contrairement aux évènements rapides qui y sont relativement insensibles ; et d'autre part, la stimulation directe (Figure 21) ainsi que le recrutement feedforward (Figure 24) des interneurons donne systématiquement naissance aux deux populations évoquées possédant les mêmes caractéristiques cinétiques que les IPSCs spontanés. Toutefois, il n'est pas exclu que ces populations soient « contaminées » par des contacts récurrents provenant des cellules de Purkinje voisines, mais ceux-ci sont relativement peu fréquents dans un cervelet mature (Watt et al., 2009) et de plus probablement coupés par la section transversale des tranches aiguës (Figure 24).

Ceci nous permet de conclure que les cellules étoilées, qui forment des contacts dendritiques présentent des cinétiques lentes par rapport aux cellules en panier dont les cinétiques sont rapides du fait de la localisation de leur contact synaptique somatique massif, connu sous le nom de synapse en pinceau (Palay et Chan-Palay, 1974; Ango et al., 2004).

### **3.2. La cellule en panier est susceptible de participer à l'organisation latérale de l'inhibition du cortex cérébelleux**

La possibilité d'identifier les cellules étoilées des cellules en panier étant rendue possible, nous avons pu mettre en évidence certaines différences fonctionnelles entre ces deux types d'interneurones. Ainsi, en addition aux travaux de Carter et Regehr

(2002) qui indiquent que la cellule étoilée est très fortement influencée par un unique quantum de neurotransmetteur, nos résultats suggèrent qu'il existe un gradient d'activité dans la couche moléculaire, qui favorise l'excitabilité des cellules étoilées par rapport aux cellules en panier, les rendant plus sensibles à de faibles stimulations des faisceaux de fibres parallèles (Figure 25). Ces résultats soulignent le fait que le recrutement feedforward de chacun des types d'interneurones de la couche moléculaire n'est pas équivalent au sein d'un microcircuit cérébelleux. Mais la question du contrôle de l'activité de la cellule de Purkinje par les interneurones de la couche moléculaire, ainsi que du rôle respectif de chacun d'entre eux, notamment dans l'inhibition latérale, n'est pas élucidée. En effet, bien qu'il soit clairement démontré que l'activation de l'inhibition corticocérébelleuse par la stimulation des faisceaux de fibres parallèles soit hétérogène et suive le patron du marqueur Zébrine-II (Gao et al., 2006), celle-ci ne semble pas reposer sur une réalité anatomique, puisque l'organisation ultrastructurale des connexions des fibres parallèles et des interneurones sur les cellules de Purkinje apparaît comme homogène sur toute la largeur du folium (Palay et Chan-Palay, 1974). Cependant cette activation hétérogène doit nécessairement reposer sur une organisation latérale particulière des connexions inhibitrices arrivant sur la cellule de Purkinje, car les seuls patrons d'expression des zébrines ne pourraient pas expliquer la totalité du phénomène. Nos résultats, qui montrent qu'il existe une organisation latérale différente des collatérales des cellules en panier en fonction des bandes parasagittales pourrait y contribuer. En effet, les cellules en panier semblent établir des connexions somatiques dans les bandes Zébrine-II négatives et dendritiques proximales dans les bandes Zébrine-II positives, qui ne traversent pas la frontière entre les bandes Zébrine-II. Ce dernier point pourrait éventuellement contribuer à un cloisonnement d'un certain type d'information dans les bandes parasagittales.

Par contre, nos observations n'expliquent pas le fait que les bandes Zébrine-II positives répondent plus fortement à la stimulation des fibres parallèles que les bandes Zébrine-II négatives mis en évidence par Gao et ses collaborateurs (2006). Toutefois nous avons mesuré une légère tendance des grands événements dendritiques à être plus fréquents dans les bandes Zébrine-II positives, ce qui pourrait contribuer à accentuer la différence d'inhibition enregistrée à la surface du folium par ces chercheurs. Parmi les autres facteurs pouvant contribuer à cette différence, le profil de connectivité des interneurones entre eux (Kondo et Marty, 1998) pourrait également faire l'objet d'une étude. Nous ne pouvons pas non plus négliger le grand nombre de molécules qui ont un patron d'expression semblable ou complémentaire à Zébrine-II, dont certains ont des rôles dans les voies cellulaires ou la neurotransmission et qui doivent d'une certaine manière contribuer à former l'organisation modulaire du cervelet.



## BIBLIOGRAPHIE



- A -

- Ahn AH, Dziennis S, Hawkes R, Herrup K (1994) The cloning of zebrin II reveals its identity with aldolase C. *Development* 120:2081-2090
- Altman J (1972)(a) Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. II. Phases in the maturation of Purkinje cells and of the molecular layer. *J. Comp. Neurol* 145:399-463
- Altman J (1972)(b) Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. 3. Maturation of the components of the granular layer. *J. Comp. Neurol* 145:465-513
- Altman J, Bayer SA (1997) *Development of the cerebellar system: In relation to its evolution, structure, and functions* CRC Press.
- Andersson G, Oscarsson O (1978) Climbing fiber microzones in cerebellar vermis and their projection to different groups of cells in the lateral vestibular nucleus. *Exp Brain Res* 32:565-579
- Ango F, di Cristo G, Higashiyama H, Bennett V, Wu P, Huang ZJ (2004) Ankyrin-based subcellular gradient of neurofascin, an immunoglobulin family protein, directs GABAergic innervation at purkinje axon initial segment. *Cell* 119:257-272
- Antar LN, Bassell GJ (2003) Sunrise at the synapse: the FMRP mRNP shaping the synaptic interface. *Neuron* 37:555-558
- APA (2004) *DSM-IV-TR: manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux*. Elsevier Masson.
- Apps R, Garwicz M (2005) Anatomical and physiological foundations of cerebellar information processing. *Nat. Rev. Neurosci* 6:297-311
- Apps R, Hawkes R (2009) Cerebellar cortical organization: a one-map hypothesis. *Nat. Rev. Neurosci* 10:670-681
- Armstrong CL, Hawkes R (2000) Pattern formation in the cerebellar cortex. *Biochem. Cell Biol* 78:551-562
- Armstrong DM, Harvey RJ, Schild RF (1973) The spatial organisation of climbing fibre branching in the cat cerebellum. *Exp Brain Res* 18:40-58
- Armstrong D, Dunn JK, Antalffy B, Trivedi R (1995) Selective dendritic alterations in the cortex of Rett syndrome. *J. Neuropathol. Exp. Neurol* 54:195-201
- Augustine GJ, Charlton MP, Smith SJ (1985) Calcium entry and transmitter release at voltage-clamped nerve terminals of squid. *J. Physiol. (Lond.)* 367:163-181
- Aumann TD, Fetz EE (2004) Oscillatory activity in forelimb muscles of behaving monkeys evoked by microstimulation in the cerebellar nuclei. *Neurosci. Lett* 361:106-110
- Avital A, Goshen I, Kamsler A, Segal M, Iverfeldt K, Richter-Levin G, Yirmiya R (2003) Impaired interleukin-1 signaling is associated with deficits in hippocampal memory processes and neural plasticity. *Hippocampus* 13:826-834

- B -

- Bahi N, Friocourt G, Carrié A, Graham ME, Weiss JL, Chafey P, Fauchereau F, Burgoyne RD, Chelly J (2003) IL1 receptor accessory protein like, a protein involved in X-linked mental retardation, interacts with Neuronal Calcium Sensor-1 and regulates exocytosis. *Hum. Mol. Genet* 12:1415-1425
- Bai J, Chapman ER (2004) The C2 domains of synaptotagmin--partners in exocytosis. *Trends Biochem. Sci* 29:143-151

- Bailey CH, Chen M (1989) Structural plasticity at identified synapses during long-term memory in *Aplysia*. *J. Neurobiol* 20:356-372
- Barmack NH, Baughman RW, Eckenstein FP, Shojaku H (1992) Secondary vestibular cholinergic projection to the cerebellum of rabbit and rat as revealed by choline acetyltransferase immunohistochemistry, retrograde and orthograde tracers. *J. Comp. Neurol* 317:250-270
- Barmack NH, Yakhnitsa V (2008) Functions of interneurons in mouse cerebellum. *J. Neurosci* 28:1140-1152
- Bauman ML, Kemper TL, Arin DM (1995) Microscopic observations of the brain in Rett syndrome. *Neuropediatrics* 26:105-108
- Becker LE, Armstrong DL, Chan F (1986) Dendritic atrophy in children with Down's syndrome. *Ann. Neurol* 20:520-526
- Belichenko PV, Oldfors A, Hagberg B, Dahlström A (1994) Rett syndrome: 3-D confocal microscopy of cortical pyramidal dendrites and afferents. *Neuroreport* 5:1509-1513
- Ben-Ari Y (2002) Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat. Rev. Neurosci* 3:728-739
- Benedetti F (1995) Differential formation of topographic maps on the cerebral cortex and superior colliculus of the mouse by temporally correlated tactile- tactile and tactile-visual inputs. *Eur. J. Neurosci* 7:1942-1951
- Bishop GA, Chen YF, Burry RW, King JS (1993) An analysis of GABAergic afferents to basket cell bodies in the cat's cerebellum. *Brain Res* 623:293-298
- Bishop GA, Ho RH (1985) The distribution and origin of serotonin immunoreactivity in the rat cerebellum. *Brain Res* 331:195-207
- Boegman RJ, Parent A, Hawkes R (1988) Zonation in the rat cerebellar cortex: patches of high acetylcholinesterase activity in the granular layer are congruent with Purkinje cell compartments. *Brain Res* 448:237-251
- Boele H-J, Koekkoek SKE, De Zeeuw CI (2010) Cerebellar and extracerebellar involvement in mouse eyeblink conditioning: the ACDC model. *Front Cell Neurosci* 3:19
- Born TL, Smith DE, Garka KE, Renshaw BR, Bertles JS, Sims JE (2000) Identification and characterization of two members of a novel class of the interleukin-1 receptor (IL-1R) family. Delineation of a new class of IL-1R-related proteins based on signaling. *J. Biol. Chem* 275:29946-29954
- Brehm P, Eckert R (1978) An electrophysiological study of the regulation of ciliary beating frequency in *Paramecium*. *J. Physiol. (Lond.)* 283:557-568
- Brenowitz SD, Best AR, Regehr WG (2006) Sustained elevation of dendritic calcium evokes widespread endocannabinoid release and suppression of synapses onto cerebellar Purkinje cells. *J. Neurosci* 26:6841-6850
- Brenowitz SD, Regehr WG (2007) Reliability and heterogeneity of calcium signaling at single presynaptic boutons of cerebellar granule cells. *J. Neurosci* 27:7888-7898
- Briatore F, Patrizi A, Viltono L, Sassoè-Pognetto M, Wulff P (2010) Quantitative organization of GABAergic synapses in the molecular layer of the mouse cerebellar cortex. *PLoS ONE* 5:e12119
- Brochu G, Maler L, Hawkes R (1990) Zebrin II: a polypeptide antigen expressed selectively by Purkinje cells reveals compartments in rat and fish cerebellum. *J. Comp. Neurol* 291:538-552

- Brose N, Petrenko AG, Südhof TC, Jahn R (1992) Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science* 256:1021-1025
- Brunel N, Hakim V, Isope P, Nadal J-P, Barbour B (2004) Optimal information storage and the distribution of synaptic weights: perceptron versus Purkinje cell. *Neuron* 43:745-757
- Burgoyne RD, Weiss JL (2001) The neuronal calcium sensor family of Ca<sup>2+</sup>-binding proteins. *Biochem. J* 353:1-12
- Buzsáki G, Chrobak JJ (1995) Temporal structure in spatially organized neuronal ensembles: a role for interneuronal networks. *Curr. Opin. Neurobiol* 5:504-510

- C -

- Callaway JC, Lasser-Ross N, Ross WN (1995) IPSPs strongly inhibit climbing fiber-activated [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increases in the dendrites of cerebellar Purkinje neurons. *J. Neurosci* 15:2777-2787
- Campbell NC, Armstrong DM (1983) The olivocerebellar projection in the rat: an autoradiographic study. *Brain Res* 275:215-233
- Carpenter MB (1991) *Core Text of Neuroanatomy*. Williams & Wilkins.
- Carper RA, Courchesne E (2000) Inverse correlation between frontal lobe and cerebellum sizes in children with autism. *Brain* 123 ( Pt 4):836-844
- Carrié A et al. (1999) A new member of the IL-1 receptor family highly expressed in hippocampus and involved in X-linked mental retardation. *Nat. Genet* 23:25-31
- Carter AG, Regehr WG (2002) Quantal events shape cerebellar interneuron firing. *Nat. Neurosci* 5:1309-1318
- Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J (2005) International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol. Rev* 57:411-425
- Chambers WW, Sprague JM (1955) Functional localization in the cerebellum. I. Organization in longitudinal cortico-nuclear zones and their contribution to the control of posture, both extrapyramidal and pyramidal. *J. Comp. Neurol* 103:105-129
- Chan-Palay V, Nilaver G, Palay SL, Beinfeld MC, Zimmerman EA, Wu JY, O'Donohue TL (1981) Chemical heterogeneity in cerebellar Purkinje cells: existence and coexistence of glutamic acid decarboxylase-like and motilin-like immunoreactivities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 78:7787-7791
- Chapman ER (2008) How does synaptotagmin trigger neurotransmitter release? *Annu. Rev. Biochem* 77:615-641
- Chelly J (1999) Breakthroughs in molecular and cellular mechanisms underlying X-linked mental retardation. *Hum. Mol. Genet* 8:1833-1838
- Chelly J (2000) [Recent advances in the genetics and physiopathology of X chromosomal mental retardation]. *Arch Pediatr* 7 Suppl 2:114s-118s
- Chelly J, Mandel JL (2001) Monogenic causes of X-linked mental retardation. *Nat. Rev. Genet* 2:669-680
- Chelly J, Khelifaoui M, Francis F, Chérif B, Bienvenu T (2006) Genetics and pathophysiology of mental retardation. *Eur. J. Hum. Genet* 14:701-713
- Conti R, Tan YP, Llano I (2004) Action potential-evoked and ryanodine-sensitive spontaneous Ca<sup>2+</sup> transients at the presynaptic terminal of a developing CNS inhibitory synapse. *J. Neurosci* 24:6946-6957

Cook JE, Becker DL (1990) Spontaneous Activity as a Determinant of Axonal Connections. *Eur. J. Neurosci* 2:162-169

Crepel F, Delhay-Bouchaud N, Dupont JL, Sotelo C (1980) Dendritic and axonic fields of Purkinje cells in developing and x-irradiated rat cerebellum. A comparative study using intracellular staining with horseradish peroxidase. *Neuroscience* 5:333-347

- D -

Dani VS, Chang Q, Maffei A, Turrigiano GG, Jaenisch R, Nelson SB (2005) Reduced cortical activity due to a shift in the balance between excitation and inhibition in a mouse model of Rett syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 102:12560-12565

Davie JT, Clark BA, Häusser M (2008) The origin of the complex spike in cerebellar Purkinje cells. *J. Neurosci* 28:7599-7609

Dehnes Y, Chaudhry FA, Ullensvang K, Lehre KP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC (1998) The glutamate transporter EAAT4 in rat cerebellar Purkinje cells: a glutamate-gated chloride channel concentrated near the synapse in parts of the dendritic membrane facing astroglia. *J. Neurosci* 18:3606-3619

Dittman J, Ryan TA (2009) Molecular circuitry of endocytosis at nerve terminals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* 25:133-160

Dolphin AC (2003) Beta subunits of voltage-gated calcium channels. *J. Bioenerg. Biomembr* 35:599-620

Dum RP, Strick PL (2003) An unfolded map of the cerebellar dentate nucleus and its projections to the cerebral cortex. *J. Neurophysiol* 89:634-639

- E F -

Eccles JC, Llinás R, Sasaki K (1966)(a) The excitatory synaptic action of climbing fibres on the Purkinje cells of the cerebellum. *J. Physiol. (Lond.)* 182:268-296

Eccles JC, Llinás R, Sasaki K (1966)(b) Intracellularly recorded responses of the cerebellar Purkinje cells. *Exp Brain Res* 1:161-183

Ehrlich I, Klein M, Rumpel S, Malinow R (2007) PSD-95 is required for activity-driven synapse stabilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 104:4176-4181

Ekerot C-F, Jörntell H (2003) Parallel fiber receptive fields: a key to understanding cerebellar operation and learning. *Cerebellum* 2:101-109

El-Husseini AE, Schnell E, Chetkovich DM, Nicoll RA, Brecht DS (2000) PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science* 290:1364-1368

Fatt P, Katz B (1951) An analysis of the end-plate potential recorded with an intra-cellular electrode. *The Journal of Physiology* 115:320-370

Fields RD, Guthrie PB, Russell JT, Kater SB, Malhotra BS, Nelson PG (1993) Accommodation of mouse DRG growth cones to electrically induced collapse: kinetic analysis of calcium transients and set-point theory. *J. Neurobiol* 24:1080-1098

Fishburn J, Turner G, Daniel A, Brookwell R (1983) The diagnosis and frequency of X-linked conditions in a cohort of moderately retarded males with affected brothers. *Am. J. Med. Genet* 14:713-724

Foster M (1889) *A textbook of physiology*. London: Macmillan.

Fox CA, Barnard JW (1957) A quantitative study of the Purkinje cell dendritic branchlets and their relationship to afferent fibres. *J. Anat* 91:299-313

Frints SGM, Froyen G, Marynen P, Fryns J-P (2002) X-linked mental retardation: vanishing boundaries between non-specific (MRX) and syndromic (MRXS) forms. *Clin. Genet* 62:423-432

- G -

- Gähwiler BH (1976) Spontaneous bioelectric activity of cultured Purkinje cells during exposure to glutamate, glycine, and strychnine. *J. Neurobiol* 7:97-107
- Gambino F, Khelifaoui M, Poulain B, Bienvenu T, Chelly J, Humeau Y (2010) Synaptic maturation at cortical projections to the lateral amygdala in a mouse model of Rett syndrome. *PLoS ONE* 5:e11399
- Gambino F, Pavlowsky A, Béglé A, Dupont J-L, Bahi N, Courjaret R, Gardette R, Hadjkacem H, Skala H, Poulain B, Chelly J, Vitale N, Humeau Y (2007) IL1-receptor accessory protein-like 1 (IL1RAPL1), a protein involved in cognitive functions, regulates N-type Ca<sup>2+</sup>-channel and neurite elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 104:9063-9068
- Gao W, Chen G, Reinert KC, Ebner TJ (2006) Cerebellar cortical molecular layer inhibition is organized in parasagittal zones. *J. Neurosci* 26:8377-8387
- Gao X, Xi G, Niu Y, Zhang S, Fu R, Zheng Z, Zhang K, Lv S, He H, Xue M, Zhang F (2008) A study on the correlation between IL1RAPL1 and human cognitive ability. *Neurosci. Lett* 438:163-167
- García-López P, García-Marín V, Martínez-Murillo R, Freire M (2010) Cajal's achievements in the field of the development of dendritic arbors. *Int. J. Dev. Biol* 54:1405-1417
- Gécz J, Shoubridge C, Corbett M (2009) The genetic landscape of intellectual disability arising from chromosome X. *Trends in Genetics* 25:308-316
- Gincel D, Regan MR, Jin L, Watkins AM, Bergles DE, Rothstein JD (2007) Analysis of cerebellar Purkinje cells using EAAT4 glutamate transporter promoter reporter in mice generated via bacterial artificial chromosome-mediated transgenesis. *Exp. Neurol* 203:205-212
- Glickstein M, Strata P, Voogd J (2009) Cerebellum: history. *Neuroscience* 162:549-559
- Glickstein M, Sultan F, Voogd J (2011) Functional localization in the cerebellum. *Cortex* 47:59-80
- Goodman CS, Shatz CJ (1993) Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell* 72 Suppl:77-98
- Goshen I, Avital A, Kreisel T, Licht T, Segal M, Yirmiya R (2009) Environmental enrichment restores memory functioning in mice with impaired IL-1 signaling via reinstatement of long-term potentiation and spine size enlargement. *J. Neurosci* 29:3395-3403
- Graf ER, Zhang X, Jin S-X, Linhoff MW, Craig AM (2004) Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins. *Cell* 119:1013-1026
- Granit R, Phillips CG (1956) Excitatory and inhibitory processes acting upon individual Purkinje cells of the cerebellum in cats. *J. Physiol. (Lond.)* 133:520-547
- Gravel C, Eisenman LM, Sasseville R, Hawkes R (1987) Parasagittal organization of the rat cerebellar cortex: direct correlation between antigenic Purkinje cell bands revealed by mabQ113 and the organization of the olivocerebellar projection. *J. Comp. Neurol* 265:294-310
- Gray EG (1959) Electron microscopy of synaptic contacts on dendrite spines of the cerebral cortex. *Nature* 183:1592-1593
- Gruol DL, Deal CR, Yool AJ (1992) Developmental changes in calcium conductances contribute to the physiological maturation of cerebellar Purkinje neurons in culture. *J. Neurosci*

## - H -

- Haines DE, Manto M-U (2009) The discovery and definitive proof of cerebellar nucleocortical projections 1976. *Cerebellum* 8:1-18; discussion 3 pages following p.18
- Halling DB, Aracena-Parks P, Hamilton SL (2005) Regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels by calmodulin. *Sci. STKE* 2005:re15
- Hallonet M, Teillet M, Le Douarin N (1990) A new approach to the development of the cerebellum provided by the quail-chick marker system. *Development*. 108:19-31
- Harlow HF (1958) The Nature of Love. *American Psychologist*:673-685
- Hashimoto K, Kano M (2005) Postnatal development and synapse elimination of climbing fiber to Purkinje cell projection in the cerebellum. *Neurosci. Res* 53:221-228
- Häusser M, Clark BA (1997) Tonic synaptic inhibition modulates neuronal output pattern and spatiotemporal synaptic integration. *Neuron* 19:665-678
- Hawkes R, Leclerc N (1987) Antigenic map of the rat cerebellar cortex: the distribution of parasagittal bands as revealed by monoclonal anti-Purkinje cell antibody mabQ113. *J. Comp. Neurol* 256:29-41
- Heitz S, Lutz Y, Rodeau J-L, Zanjani H, Gautheron V, Bombarde G, Richard F, Fuchs J-P, Vogel MW, Mariani J, Bailly Y (2007) BAX contributes to Doppel-induced apoptosis of prion-protein-deficient Purkinje cells. *Dev Neurobiol* 67:670-686
- Herrup K, Kuemerle B (1997) The compartmentalization of the cerebellum. *Annu. Rev. Neurosci* 20:61-90
- Hilfiker S (2003) Neuronal calcium sensor-1: a multifunctional regulator of secretion. *Biochem. Soc. Trans* 31:828-832
- Hines RM, Wu L, Hines DJ, Steenland H, Mansour S, Dahlhaus R, Singaraja RR, Cao X, Sammler E, Hormuzdi SG, Zhuo M, El-Husseini A (2008) Synaptic imbalance, stereotypies, and impaired social interactions in mice with altered neuroligin 2 expression. *J. Neurosci* 28:6055-6067
- Hirono M, Matsunaga W, Chimura T, Obata K (2008) Developmental enhancement of alpha2-adrenoceptor-mediated suppression of inhibitory synaptic transmission onto mouse cerebellar Purkinje cells. *Neuroscience* 156:143-154
- Humeau Y, Gambino F, Chelly J, Vitale N (2009) X-linked mental retardation: focus on synaptic function and plasticity. *J. Neurochem* 109:1-14
- Huttenlocher PR (1970) Dendritic development and mental defect. *Neurology* 20:381

## - I J -

- Inlow JK, Restifo LL (2004) Molecular and comparative genetics of mental retardation. *Genetics* 166:835-881
- Ireland DR, Davies PJ, McLachlan EM (1998) The role of N-type Ca<sup>2+</sup> channels in regulating excitability of guinea-pig sympathetic neurones. *J. Auton. Nerv. Syst* 73:109-114
- Ito M (2008) Control of mental activities by internal models in the cerebellum. *Nat. Rev. Neurosci* 9:304-313
- Jaeger D, Bower JM (1999) Synaptic control of spiking in cerebellar Purkinje cells: dynamic current clamp based on model conductances. *J. Neurosci* 19:6090-6101



- Jahn R, Scheller RH (2006) SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 7:631-643
- Jakab RL, Hátori J (1988) Quantitative morphology and synaptology of cerebellar glomeruli in the rat. *Anat. Embryol* 179:81-88
- Jinno S, Jeromin A, Roder J, Kosaka T (2002) Immunocytochemical localization of neuronal calcium sensor-1 in the hippocampus and cerebellum of the mouse, with special reference to presynaptic terminals. *Neuroscience* 113:449-461
- Jinno S, Jeromin A, Roder J, Kosaka T (2003) Compartmentation of the mouse cerebellar cortex by neuronal calcium sensor-1. *J. Comp. Neurol* 458:412-424
- Jo J, Heon S, Kim MJ, Son GH, Park Y, Henley JM, Weiss JL, Sheng M, Collingridge GL, Cho K (2008) Metabotropic glutamate receptor-mediated LTD involves two interacting Ca(2+) sensors, NCS-1 and PICK1. *Neuron* 60:1095-1111
- Jörntell H, Bengtsson F, Schonewille M, De Zeeuw CI (2010) Cerebellar molecular layer interneurons - computational properties and roles in learning. *Trends Neurosci* 33:524-532
- Jörntell H, Ekerot C-F (2002) Reciprocal bidirectional plasticity of parallel fiber receptive fields in cerebellar Purkinje cells and their afferent interneurons. *Neuron* 34:797-806
- Jörntell H, Ekerot C-F (2003) Receptive field plasticity profoundly alters the cutaneous parallel fiber synaptic input to cerebellar interneurons in vivo. *J. Neurosci* 23:9620-9631

- K -

- Kandel E, Schwartz J, Jessell T (2000) Principles of neural science 4<sup>e</sup> éd. New York: Elsevier Science Publication.
- Karakossian MH, Otis TS (2004) Excitation of cerebellar interneurons by group I metabotropic glutamate receptors. *J. Neurophysiol* 92:1558-1565
- Kaufmann WE, Moser HW (2000) Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cereb. Cortex* 10:981-991
- Kawa K (2002) Acute synaptic modulation by nicotinic agonists in developing cerebellar Purkinje cells of the rat. *J. Physiol. (Lond.)* 538:87-102
- Kelly RM, Strick PL (2003) Cerebellar loops with motor cortex and prefrontal cortex of a nonhuman primate. *J. Neurosci* 23:8432-8444
- Khan JA, Brint EK, O'Neill LAJ, Tong L (2004) Crystal structure of the Toll/interleukin-1 receptor domain of human IL-1RAPL. *J. Biol. Chem* 279:31664-31670
- Kim MJ, Futai K, Jo J, Hayashi Y, Cho K, Sheng M (2007) Synaptic accumulation of PSD-95 and synaptic function regulated by phosphorylation of serine-295 of PSD-95. *Neuron* 56:488-502
- Klingauf J, Kavalali ET, Tsien RW (1998) Kinetics and regulation of fast endocytosis at hippocampal synapses. *Nature* 394:581-585
- Knott GW, Quairiaux C, Genoud C, Welker E (2002) Formation of dendritic spines with GABAergic synapses induced by whisker stimulation in adult mice. *Neuron* 34:265-273
- Kobayashi T, Nakamura H, Yasuda M (1990) Disturbance of refinement of retinotectal projection in chick embryos by tetrodotoxin and grayanotoxin. *Brain Res. Dev. Brain Res* 57:29-35
- Koekkoek SKE, Hulscher HC, Dortland BR, Hensbroek RA, Elgersma Y, Ruigrok TJH, De Zeeuw CI (2003) Cerebellar LTD and learning-dependent timing of conditioned eyelid responses.

Science 301:1736-1739

Koh S, Higgins GA (1991) Differential regulation of the low-affinity nerve growth factor receptor during postnatal development of the rat brain. *J. Comp. Neurol* 313:494-508

Komuro H, Rakic P (1992) Selective role of N-type calcium channels in neuronal migration. *Science* 257:806-809

Kondo S, Marty A (1998) Synaptic currents at individual connections among stellate cells in rat cerebellar slices. *J. Physiol. (Lond.)* 509 ( Pt 1):221-232

Kraushaar U, Jonas P (2000) Efficacy and stability of quantal GABA release at a hippocampal interneuron-principal neuron synapse. *J. Neurosci* 20:5594-5607

- L -

Lainé J, Axelrad H (1994) The candelabrum cell: a new interneuron in the cerebellar cortex. *J. Comp. Neurol* 339:159-173

Larramendi LM (1969) Electron microscopic studies of cerebellar interneurons. *UCLA Forum Med Sci* 11:289-307

Larramendi LM, Lemkey-Johnston N (1970) The distribution of recurrent Purkinje collateral synapses in the mouse cerebellar cortex: an electron microscopic study. *J. Comp. Neurol* 138:451-459

Lein ES et al. (2007) Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* 445:168-176

Leiner HC, Leiner AL, Dow RS (1986) Does the cerebellum contribute to mental skills? *Behav. Neurosci* 100:443-454

Leprêtre F, Delannoy V, Froguel P, Vasseur F, Montpellier C (2003) Dissection of an inverted X(p21.3q27.1) chromosome associated with mental retardation. *Cytogenet. Genome Res* 101:124-129

Levitan IB (1999) It is calmodulin after all! Mediator of the calcium modulation of multiple ion channels. *Neuron* 22:645-648

Llano I, Gerschenfeld HM (1993) Inhibitory synaptic currents in stellate cells of rat cerebellar slices. *J. Physiol. (Lond.)* 468:177-200

Llano I, González J, Caputo C, Lai FA, Blayney LM, Tan YP, Marty A (2000) Presynaptic calcium stores underlie large-amplitude miniature IPSCs and spontaneous calcium transients. *Nat. Neurosci* 3:1256-1265

- M -

Mandel J-L, Chelly J (2004) Monogenic X-linked mental retardation: is it as frequent as currently estimated? The paradox of the ARX (Aristaless X) mutations. *Eur. J. Hum. Genet* 12:689-693

Mariani J, Changeux JP (1981) Ontogenesis of olivocerebellar relationships. I. Studies by intracellular recordings of the multiple innervation of Purkinje cells by climbing fibers in the developing rat cerebellum. *J. Neurosci* 1:696-702

Martens S, Kozlov MM, McMahon HT (2007) How synaptotagmin promotes membrane fusion. *Science* 316:1205-1208

Martinez S, Alvarado-Mallart RM (1989) Transplanted mesencephalic quail cells colonize selectively all primary visual nuclei of chick diencephalon: a study using heterotopic transplants. *Brain Res. Dev. Brain Res* 47:263-274

- Marz KE, Hanson PI (2002) Sealed with a twist: complexin and the synaptic SNARE complex. *Trends Neurosci* 25:381-383
- Masson J, Sagné C, Hamon M, Mestikawy SE (1999) Neurotransmitter Transporters in the Central Nervous System. *Pharmacological Reviews* 51:439-464
- McBain CJ, Fisahn A (2001) Interneurons unbound. *Nat Rev Neurosci* 2:11-23
- McKay BE, Turner RW (2005) Physiological and morphological development of the rat cerebellar Purkinje cell. *J. Physiol. (Lond.)* 567:829-850
- Meyer MZ, Déliot N, Chasserot-Golaz S, Premont RT, Bader M-F, Vitale N (2006) Regulation of neuroendocrine exocytosis by the ARF6 GTPase-activating protein GIT1. *J. Biol. Chem* 281:7919-7926
- Meyer RL (1982) Tetrodotoxin blocks the formation of ocular dominance columns in goldfish. *Science* 218:589-591
- Meyer RL (1983) Tetrodotoxin inhibits the formation of refined retinotopography in goldfish. *Brain Res* 282:293-298
- Midtgaard J (1992)(a) Stellate cell inhibition of Purkinje cells in the turtle cerebellum in vitro. *J. Physiol. (Lond.)* 457:355-367
- Midtgaard J (1992)(b) Membrane properties and synaptic responses of Golgi cells and stellate cells in the turtle cerebellum in vitro. *J. Physiol. (Lond.)* 457:329-354
- Mittmann W, Koch U, Häusser M (2005) Feed-forward inhibition shapes the spike output of cerebellar Purkinje cells. *J. Physiol. (Lond.)* 563:369-378
- Mugnaini E, Floris A (1994) The unipolar brush cell: a neglected neuron of the mammalian cerebellar cortex. *J. Comp. Neurol* 339:174-180

- N O -

- Nalefski EA, Falke JJ (1996) The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Sci* 5:2375-2390
- Napper RM, Harvey RJ (1988) Number of parallel fiber synapses on an individual Purkinje cell in the cerebellum of the rat. *J. Comp. Neurol* 274:168-177
- O'Connor SM, Berg RW, Kleinfeld D (2002) Coherent electrical activity between vibrissa sensory areas of cerebellum and neocortex is enhanced during free whisking. *J. Neurophysiol* 87:2137-2148
- Olson L, Fuxe K (1971) On the projections from the locus coeruleus noradrenaline neurons: the cerebellar innervation. *Brain Res* 28:165-171
- Orduz D, Llano I (2007) Recurrent axon collaterals underlie facilitating synapses between cerebellar Purkinje cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 104:17831-17836
- Ottersen OP, Zhang N, Walberg F (1992) Metabolic compartmentation of glutamate and glutamine: morphological evidence obtained by quantitative immunocytochemistry in rat cerebellum. *Neuroscience* 46:519-534

- P -

- Palay S, Chan-Palay V (1974) *Cerebellar cortex. Cytology and organization.* Berlin, Heidelberg, New-York, Springer Verlag.
- Palkovits M, Magyar P, Szentágothai J (1972) Quantitative histological analysis of the cerebellar cortex in the cat. IV. Mossy fiber-Purkinje cell numerical transfer. *Brain Res* 45:15-29

- Palmen SPMC, van Engeland H, Hof PR, Schmitz C (2004) Neuropathological findings in autism. *Brain* 127:2572-2583
- Paukert M, Huang YH, Tanaka K, Rothstein JD, Bergles DE (2010) Zones of enhanced glutamate release from climbing fibers in the mammalian cerebellum. *J. Neurosci* 30:7290-7299
- Pavlowsky A, Gianfelice A, Pallotto M, Zanchi A, Vara H, Khelifaoui M, Valnegri P, Rezai X, Bassani S, Brambilla D, Kumpost J, Blahos J, Roux MJ, Humeau Y, Chelly J, Passafaro M, Giustetto M, Billuart P, Sala C (2010)(a) A postsynaptic signaling pathway that may account for the cognitive defect due to IL1RAPL1 mutation. *Curr. Biol* 20:103-115
- Pavlowsky A, Zanchi A, Pallotto M, Giustetto M, Chelly J, Sala C, Billuart P (2010)(b) Neuronal JNK pathway activation by IL-1 is mediated through IL1RAPL1, a protein required for development of cognitive functions. *Commun Integr Biol* 3:245-247
- Perea G, Navarrete M, Araque A (2009) Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci* 32:421-431
- Pierce ET (1975) Histogenesis of the deep cerebellar nuclei in the mouse: an autoradiographic study. *Brain Res* 95:503-518
- Pijpers A, Winkelman BHJ, Bronsing R, Ruigrok TJH (2008) Selective impairment of the cerebellar C1 module involved in rat hind limb control reduces step-dependent modulation of cutaneous reflexes. *J. Neurosci* 28:2179-2189
- Piton A, Michaud JL, Peng H, Aradhya S, Gauthier J, Mottron L, Champagne N, Lafrenière RG, Hamdan FF, Joobert R, Fombonne E, Marineau C, Cossette P, Dubé M-P, Haghghi P, Drapeau P, Barker PA, Carbonetto S, Rouleau GA (2008) Mutations in the calcium-related gene IL1RAPL1 are associated with autism. *Hum. Mol. Genet* 17:3965-3974
- Pörtl A, Hauer B, Fuchs K, Tretter V, Sieghart W (2003) Subunit composition and quantitative importance of GABA(A) receptor subtypes in the cerebellum of mouse and rat. *J. Neurochem* 87:1444-1455
- des Portes V, Pinard JM, Francis F, Beldjord C, Ponsot G, Chelly J (2000) [Mental retardation and disorders of cortical development]. *Arch Pediatr* 7 Suppl 2:109s-111s
- Pouille F, Scanziani M (2001) Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition. *Science* 293:1159-1163
- Pouille F, Marin-Burgin A, Adesnik H, Atallah BV, Scanziani M (2009) Input normalization by global feedforward inhibition expands cortical dynamic range. *Nat. Neurosci* 12:1577-1585
- Pouzat C, Hestrin S (1997) Developmental regulation of basket/stellate cell-->Purkinje cell synapses in the cerebellum. *J. Neurosci* 17:9104-9112
- Purpura DP (1974) Dendritic spine « dysgenesis » and mental retardation. *Science* 186:1126-1128
- Purpura DP (1982) Normal and abnormal development of cerebral cortex in man. *Neurosci Res Program Bull* 20:569-577
- Purves D, Hadley RD, Voyvodic JT (1986) Dynamic changes in the dendritic geometry of individual neurons visualized over periods of up to three months in the superior cervical ganglion of living mice. *J. Neurosci* 6:1051-1060

- Q R -

- Rancillac A, Crépel F (2004) Synapses between parallel fibres and stellate cells express long-term changes in synaptic efficacy in rat cerebellum. *J. Physiol. (Lond.)* 554:707-720

- Rizo J, Rosenmund C (2008) Synaptic vesicle fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol* 15:665-674
- Ropers H-H, Hamel BCJ (2005) X-linked mental retardation. *Nat. Rev. Genet* 6:46-57
- Ross FM, Allan SM, Rothwell NJ, Verkhratsky A (2003) A dual role for interleukin-1 in LTP in mouse hippocampal slices. *J. Neuroimmunol* 144:61-67
- Roth A, Häusser M (2001) Compartmental models of rat cerebellar Purkinje cells based on simultaneous somatic and dendritic patch-clamp recordings. *J. Physiol. (Lond.)* 535:445-472
- Ruigrok TJ, Voogd J (2000) Organization of projections from the inferior olive to the cerebellar nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol* 426:209-228
- Rusakov DA, Saitow F, Lehre KP, Konishi S (2005) Modulation of presynaptic Ca<sup>2+</sup> entry by AMPA receptors at individual GABAergic synapses in the cerebellum. *J. Neurosci* 25:4930-4940

- S -

- Sabatini BL, Regehr WG (1996) Timing of neurotransmission at fast synapses in the mammalian brain. *Nature* 384:170-172
- Sakaba T (2008) Two Ca<sup>2+</sup>-dependent steps controlling synaptic vesicle fusion and replenishment at the cerebellar basket cell terminal. *Neuron* 57:406-419
- Santamaria F, Tripp PG, Bower JM (2007) Feedforward inhibition controls the spread of granule cell-induced Purkinje cell activity in the cerebellar cortex. *J. Neurophysiol* 97:248-263
- Sasaki R, Inamo Y, Saitoh K, Hasegawa T, Kinoshita E, Ogata T (2003) Mental retardation in a boy with congenital adrenal hypoplasia: a clue to contiguous gene syndrome involving DAX1 and IL1RAPL. *Endocr. J* 50:303-307
- Scheibel ME, Scheibel AB (1955) The inferior olive; a Golgi study. *J. Comp. Neurol* 102:77-131
- Scheiffele P, Fan J, Choih J, Fetter R, Serafini T (2000) Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell* 101:657-669
- Schikorski T, Stevens CF (1997) Quantitative ultrastructural analysis of hippocampal excitatory synapses. *J. Neurosci* 17:5858-5867
- Schilling K, Oberdick J, Rossi F, Baader SL (2008) Besides Purkinje cells and granule neurons: an appraisal of the cell biology of the interneurons of the cerebellar cortex. *Histochem. Cell Biol* 130:601-615
- Schmahmann JD, Sherman JC (1997) Cerebellar cognitive affective syndrome. *Int. Rev. Neurobiol* 41:433-440
- Schmahmann JD, Sherman JC (1998) The cerebellar cognitive affective syndrome. *Brain* 121 ( Pt 4):561-579
- Schmidt JT, Eisele LE (1985) Stroboscopic illumination and dark rearing block the sharpening of the regenerated retinotectal map in goldfish. *Neuroscience* 14:535-546
- Scott TG (1963) A UNIQUE PATTERN OF LOCALIZATION WITHIN THE CEREBELLUM. *Nature* 200:793
- Sillitoe RV, Gopal N, Joyner AL (2009) Embryonic origins of ZebrinII parasagittal stripes and establishment of topographic Purkinje cell projections. *Neuroscience* 162:574-588
- Simat M, Ambrosetti L, Lardi-Studler B, Fritschy J-M (2007) GABAergic synaptogenesis marks the onset of differentiation of basket and stellate cells in mouse cerebellum. *Eur. J. Neurosci* 26:2239-2256

- Sippy T, Cruz-Martín A, Jeromin A, Schweizer FE (2003) Acute changes in short-term plasticity at synapses with elevated levels of neuronal calcium sensor-1. *Nat. Neurosci* 6:1031-1038
- de Solages C, Szapiro G, Brunel N, Hakim V, Isope P, Buisseret P, Rousseau C, Barbour B, Léna C (2008) High-frequency organization and synchrony of activity in the purkinje cell layer of the cerebellum. *Neuron* 58:775-788
- Söllner T, Bennett MK, Whiteheart SW, Scheller RH, Rothman JE (1993) A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* 75:409-418
- Somogyi P, Halasy K, Somogyi J, Storm-Mathisen J, Ottersen OP (1986) Quantification of immunogold labelling reveals enrichment of glutamate in mossy and parallel fibre terminals in cat cerebellum. *Neuroscience* 19:1045-1050
- Sorra KE, Harris KM (2000) Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines. *Hippocampus* 10:501-511
- Sotelo C (1978) Purkinje cell ontogeny: formation and maintenance of spines. *Prog. Brain Res* 48:149-170
- Sotelo C, Llinás R (1972) Specialized membrane junctions between neurons in the vertebrate cerebellar cortex. *J. Cell Biol* 53:271-289
- Sotelo C (2004) Cellular and genetic regulation of the development of the cerebellar system. *Prog. Neurobiol* 72:295-339
- Soteropoulos DS, Baker SN (2006) Cortico-cerebellar coherence during a precision grip task in the monkey. *J. Neurophysiol* 95:1194-1206
- Spatkowski G, Schilling K (2003) Postnatal dendritic morphogenesis of cerebellar basket and stellate cells in vitro. *J. Neurosci. Res* 72:317-326
- Steinlin M (2008) Cerebellar disorders in childhood: cognitive problems. *Cerebellum* 7:607-610
- Stoodley CJ, Schmahmann JD (2009) Functional topography in the human cerebellum: a meta-analysis of neuroimaging studies. *Neuroimage* 44:489-501
- Sudhof TC (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu. Rev. Neurosci* 27:509-547
- Südhof TC (2008) Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature* 455:903-911
- Sugihara I, Bailly Y, Mariani J (2000) Olivocerebellar climbing fibers in the granulo-prival cerebellum: morphological study of individual axonal projections in the X-irradiated rat. *J. Neurosci* 20:3745-3760
- Sultan F, Bower JM (1998) Quantitative Golgi study of the rat cerebellar molecular layer interneurons using principal component analysis. *J. Comp. Neurol* 393:353-373
- Szabo B, Urbanski MJ, Bisogno T, Di Marzo V, Mendiguren A, Baer WU, Freiman I (2006) Depolarization-induced retrograde synaptic inhibition in the mouse cerebellar cortex is mediated by 2-arachidonoylglycerol. *J. Physiol. (Lond.)* 577:263-280
- Szapiro G, Barbour B (2007) Multiple climbing fibers signal to molecular layer interneurons exclusively via glutamate spillover. *Nat. Neurosci* 10:735-742

- T U -

- Takashima S, Becker LE, Armstrong DL, Chan F (1981) Abnormal neuronal development in the visual cortex of the human fetus and infant with down's syndrome. A quantitative and qualitative Golgi study. *Brain Res* 225:1-21

- Tavano A, Grasso R, Gagliardi C, Triulzi F, Bresolin N, Fabbro F, Borgatti R (2007) Disorders of cognitive and affective development in cerebellar malformations. *Brain* 130:2646-2660
- Tobia MJ, Woodruff-Pak DS (2009) Delay eyeblink classical conditioning is impaired in Fragile X syndrome. *Behav. Neurosci* 123:665-676
- Tritsch D, Chesnoy-Marchais D, Feltz A (1999) *Physiologie du neurone*. Editions Doin.
- Tsujimoto T, Jeromin A, Saitoh N, Roder JC, Takahashi T (2002) Neuronal calcium sensor 1 and activity-dependent facilitation of P/Q-type calcium currents at presynaptic nerve terminals. *Science* 295:2276-2279
- Uusisaari M, Knöpfel T (2010) Functional Classification of Neurons in the Mouse Lateral Cerebellar Nuclei. *Cerebellum*.

- V W -

- Vaillend C, Poirier R, Laroche S (2008) Genes, plasticity and mental retardation. *Behav. Brain Res* 192:88-105
- Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Reiner O, Richards S, Victoria MF, Zhang FP (1991) Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 65:905-914
- Vessey JP, Karra D (2007) More than just synaptic building blocks: scaffolding proteins of the post-synaptic density regulate dendritic patterning. *J. Neurochem* 102:324-332
- Vincent P, Marty A (1993) Neighboring cerebellar Purkinje cells communicate via retrograde inhibition of common presynaptic interneurons. *Neuron* 11:885-893
- Voogd J, Glickstein M (1998) The anatomy of the cerebellum. *Trends Neurosci* 21:370-375
- Voogd J (2010) Cerebellar Zones: A Personal History. *Cerebellum* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20967577>.
- Voogd J, Pardoe J, Ruigrok TJH, Apps R (2003) The distribution of climbing and mossy fiber collateral branches from the copula pyramidis and the paramedian lobule: congruence of climbing fiber cortical zones and the pattern of zebrin banding within the rat cerebellum. *J. Neurosci* 23:4645-4656
- Waites CL, Craig AM, Garner CC (2005) Mechanisms of vertebrate synaptogenesis. *Annu. Rev. Neurosci* 28:251-274
- Watt AJ, Cuntz H, Mori M, Nusser Z, Sjöström PJ, Häusser M (2009) Traveling waves in developing cerebellar cortex mediated by asymmetrical Purkinje cell connectivity. *Nat. Neurosci* 12:463-473
- Weiss JL, Hui H, Burgoyne RD (2010) Neuronal calcium sensor-1 regulation of calcium channels, secretion, and neuronal outgrowth. *Cell. Mol. Neurobiol* 30:1283-1292
- Whitney ER, Kemper TL, Rosene DL, Bauman ML, Blatt GJ (2009) Density of cerebellar basket and stellate cells in autism: evidence for a late developmental loss of Purkinje cells. *J. Neurosci. Res* 87:2245-2254
- Wojcik SM, Brose N (2007) Regulation of membrane fusion in synaptic excitation-secretion coupling: speed and accuracy matter. *Neuron* 55:11-24
- Womack MD, Khodakhah K (2004) Dendritic control of spontaneous bursting in cerebellar Purkinje cells. *J. Neurosci* 24:3511-3521
- Womack M, Khodakhah K (2002) Active contribution of dendrites to the tonic and trimodal

patterns of activity in cerebellar Purkinje neurons. *J. Neurosci* 22:10603-10612

Wulff P, Schonewille M, Renzi M, Viltono L, Sassoè-Pognetto M, Badura A, Gao Z, Hoebeek FE, van Dorp S, Wisden W, Farrant M, De Zeeuw CI (2009) Synaptic inhibition of Purkinje cells mediates consolidation of vestibulo-cerebellar motor learning. *Nat. Neurosci* 12:1042-1049

- X Y Z -

Zhang J, Hou L, Klann E, Nelson DL (2009) Altered hippocampal synaptic plasticity in the FMR1 gene family knockout mouse models. *J. Neurophysiol* 101:2572-2580

Zhang L, Goldman JE (1996) Generation of cerebellar interneurons from dividing progenitors in white matter. *Neuron* 16:47-54