

ÉCOLE DOCTORALE - 414

Sciences de la vie et de la santé

THÈSE présentée par :

Joseph Chaumont

soutenue le : 6 février 2014

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Neurosciences

**Organisation fonctionnelle de la boucle
olivo-cortico-nucléaire :
Influence de l'activité des cellules de Purkinje**

THÈSE dirigée par :

D^r Isope Philippe

P^r Cassel Jean-Christophe

DR2, Université de Strasbourg

PR1, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

P^r Collin Thibault

P^r Schiffmann Serge

PR1, Université Paris Descartes

Professeur, Université libre de Bruxelles

AUTRES MEMBRES DU JURY :

D^r Laure Rondi-Reig

D^r Pascal Darbon

DR2, Université Pierre et Marie Curie

MC, Université de Strasbourg



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

Thèse de doctorat de l'Université de Strasbourg

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

JOSEPH CHAUMONT

En vue d'obtenir le grade de docteur de l'université de Strasbourg

Spécialité : Neurosciences

**ORGANISATION FONCTIONNELLE DE LA BOUCLE
OLIVO-CORTICO-NUCLEAIRE :**

INFLUENCE DE L'ACTIVITE DES CELLULES DE PURKINJE

Membres du jury

- Pr. Thibault Collin *Rapporteur externe*
- Pr. Serge Schiffmann *Rapporteur externe*
- Dr. Laure Rondi-Reig *Examineur*
- Dr. Pascal Darbon *Président*

Directeurs de thèse - membres du jury

- Dr Philippe Isope
- Pr Jean-Christophe Cassel

"They did not know it was impossible, so they did it!"

Marc Twain

REMERCIEMENTS

Philippe, je tiens à te remercier de m'avoir accordé ta confiance il y a 3 ans en m'accueillant sur ce projet. C'est un réel privilège d'avoir pu travailler dans de telles conditions et avec un aussi bon encadrement. Merci d'avoir eu les "yeux de la foi" au moment où je doutais de mes résultats, d'avoir laissé ta porte ouverte tous les jours et d'avoir si bien su partager ta passion pour le cervelet. Il est difficile d'exprimer toute la reconnaissance et le respect que j'éprouve pour toi !

Merci également aux membres du jury qui me font l'honneur de juger ce travail. J'espère que vous trouverez un intérêt à la lecture de ce manuscrit et aux discussions qui en découleront. J'exprime ainsi toute ma reconnaissance au Professeur Thibault Collin, au Professeur Serge Schiffmann, au Docteur Laure Rondi-Reig et au Docteur Pascal Darbon.

Big up à mes deux agents infiltrés grâce auxquels j'ai pu intégrer ce labo. Merci pour le tuyau ! Vous avez été pairs et sain d'esprit pendant ces 1095 jours de jeux de mots douteux vécus à 3 dans 9 m². Merci pour ces moments quasi mystiques passés à dénouer les pièges d'illustrator, combattre WinWCP, choisir la couleur de fond des posters et autres powerpoints, corriger mes fautes d'orthographe/grammaire, boire des liquides caféïnés et/ou alcoolisés, vulgariser la science au sens propre, comme au figuré, subir le "tactactac" de mes doigts hyperactifs sur mon clavier hyperbruyant, construire des cages de Faraday à 2h du mat et pour tous ces instants que vous avez su rendre simples humainement dans un cadre de travail qui impose la complexité. Laetitia et Antoine... Si un jour j'ai des jumeaux dizygotes de sexe différents ($p = 0.0005$), ils porteront vos prénoms (en deuxième ou troisième position sur leur carte d'identité).

Passons maintenant aux merveilleux membres de l'équipe. Si ces 3 années ont été aussi bonnes, c'est principalement grâce à l'ambiance que vous avez su faire régner dans ce labo! Merci à toi Jean-Luc pour ces discussions rugbystiques, ces cafés politisés et le goût que tu as pour partager les choses que tu aimes. Merci à Anaïs pour ta bonne humeur omniprésente et ton sens inébranlable du dévouement (essaie de dire non un jour, juste pour voir). Merci à Jeff, Bobo-hipster-quadragénaire toujours présent, contrepétant et inébranlable même dans l'adversité (bon courage pour survivre dans cette Alsace qui t'es hostile). Merci Flavia d'avoir injecté un peu de jeunesse et d'insouciance par ta simple présence et vive toi pour tout les génotypages dont tu m'as aimablement préservé. Mes remerciements vont également à Alvaro, Bernard, Dorine, Didier, Ellen, Frédéric, Francesca, Jean, Jean-Louis, Lucie, Marie, Orkan et Sophie (l'ordre choisi est alphabétique, car c'est le seul qui convienne). Merci à vous tous pour ces moments riches humainement et scientifiquement.

Merci aux Parisiens d'avoir enrichi cette aventure de leurs connaissances et compétences ! J'entends inclure ici l'accueil et l'investissement de Clément, l'optimisme de Daniella, l'apport "opto-technique" de Guillaume, la fougue de Stéphane et les descentes (innombrables) de Nicolas. Mon respect et mes remerciements vont également à Fekrije qui, de son collègue, a obtenu un BAC sans lequel rien de tout cela n'eut été possible.

Je pense également aux copains de la promo de Master qui ont magnifié ces deux années de ma vie. Une telle solidarité et une telle ambiance sont suffisamment rares pour mériter d'être couchées sur le papier. Merci à Alex-Bambi (PhD), Catherine (soon), Elodie (PhD), Eric (PhD & soon),

Isshane (soon), Karelle (PhD), Karen (soon), Laurent (PhD NEW), Michael (PhD), Michel (PhD), Mona (Soon), Paulo (PhD), Romain (soigne toi bien !), Sarah (PhD), papa-Vivien (PhD NEW) et Virginie (PhD).

J'entends également remercier l'équipe Gasmann-Vitale (historiquement Bader), car cohabiter avec les électrophysiologistes que nous sommes ne doit pas être facile tous les jours. Merci pour cette bonne ambiance et ce taux de présence exceptionnel aux rencontres du vendredi soir. Je pense principalement à Annie, Audrey, Aurélie, Marion, Nicolas, Pauline, Séb, Stéphane² et Valou. L'INCI s'étendant à plus d'un étage, je souhaite ne pas oublier Alexis, Bruce, Christophe, Coco (qui a la serviette de Suly), Corine, Edith (qui fait la différence entre un pingouin et un manchot), Florimon (le noctambule), JBS, Stéphanie, Sylvain, Vy et Yannick.

Un grand merci également à Jean-Christophe Cassel qui, depuis le projet tuteuré en M1, a accompagné toutes mes années en neurosciences. Chacune de nos rencontres a été, pour moi, un enrichissement réel. Merci également aux autres membres du LNCA/LINC avec en tête de file Lucas et Romain auxquels s'ajoutent tous les excellents boulistes de ce laboratoire !

Merci également aux "doctoneuros" et aux rencontres du vendredi soir qui ont donné une autre dimension à ces trois années de thèse. Je souhaite à ces deux "collectifs" de vivre autant de belles choses que ce qu'ils ont déjà produit. Merci aux membres présents, passés et futurs pour l'investissement qu'ils ont et qu'ils vont consacrer à la vie de ces structures.

Je remercie également Planorbis, Ephemere, Z420 et XPS pour leur soutien numérique. Je pense aussi à leur "papa" Denis (fait de chair et d'os) qui, en plus d'être extrêmement compétent au niveau informatique, est admirable sur le plan humain. Bravo aux 1 142 234 potentiels d'actions présents dans ma base de données qu'ils soient simples ou complexes.

Merci également à tout le staff de l'animalerie qui, 365 jours par an, fait un boulot invisible et pourtant essentiel. Félicitations à Laurence pour sa capacité à mémoriser l'identité de toutes les souris. Merci également à Sophie et Dominique pour leurs innombrables conseils. Merci aux souris.

Je souhaite également remercier l'association Lolita et les membres qui la composent (ou l'ont composée). J'éviterai de citer des noms, parce que cela pourrait faire un BloK de révolution et que je suis plutôt un bureaucrate bisounours qui n'aime pas mettre le feu à Constantinople (comprendra qui pourra).

Un très grand merci à mon papa retraité et ma maman new retraitée. Puis, par ordre d'accession au trône, merci pour votre soutien fraternel (ou sœurternel), vos corrections et votre patience à Nicolas & Yu-Hsiu ; Sylvain, Marie et Elanore ; Céline, Alexandre et Amaury ; Hélène ; Jean-Baptiste et Marie. J'ai beaucoup de chance de vous avoir tous !

Comme j'aime bien garder le meilleur pour la fin, merci à toi Elsa pour ta patience, tes sourires, ta patience, tes bons p'tits plats, ta patience, tes attentions, ta patience, ton soutien et encore ta patience. Tu as rendu chaque jour de ces 3 années un peu plus beau et chaleureux. Les mots étant un peu superflus, j'essayerai de rattraper mes absences par mes actes à venir. Bisoux beaucoup.

AVANT PROPOS

Mon projet de thèse est initialement focalisé sur le développement de techniques manquantes à l'équipe au moment de mon arrivée au laboratoire en octobre 2010. Ma première année de doctorat a ainsi été centrée sur le développement de l'optogénétique par l'utilisation d'une lignée de souris transgénique exprimant la channelrhodopsin-2 spécifiquement dans les cellules de Purkinje. Les fondateurs de cette lignée étant déjà présents au laboratoire, mon travail a alors été d'isoler une descendance présentant une bonne expression de cette protéine, de la caractériser par des enregistrements électrophysiologiques *in vitro* et de contrôler l'absence d'expression d'un phénotype comportemental.

Ce premier objectif atteint, nous avons développé un poste d'électrophysiologie permettant de faire des enregistrements juxta-cellulaires *in vivo* couplés à des stimulations lumineuses par l'utilisation d'une fibre optique. L'objectif primaire était la caractérisation des réponses de cellules de Purkinje en fonction des variations des stimulations lumineuses. Les résultats de ces enregistrements préliminaires ont également permis de mettre à jour deux questionnements relatifs à l'influence des cellules de Purkinje au niveau :

- des microcircuits cérébelleux, par l'étude de l'action des collatérales des cellules de Purkinje sur les autres types de neurones corticaux.
- de la boucle fermée olivo-cortico-nucléaire, par l'étude de la modulation de l'activité des potentiels d'actions complexes, lors de l'activation optique d'un groupe de cellules de Purkinje.

Cette seconde question a été traitée dans le cadre d'une collaboration avec deux équipes parisiennes. Les travaux de Ferkrije SELIMI, de Clément LENA et de toutes les personnes qui, avec eux, ont accompagné ce projet ont été un enrichissement aussi bien scientifique que personnel. Cette association a abouti à la publication d'un article scientifique en octobre 2013.

J'aimerais également mentionner ici l'aspect compétitif de la recherche dont j'avais peu conscience et pour lequel je n'étais pas préparé au début de mon doctorat. En effet, une étude similaire à la notre est parue un mois avant l'acceptation de notre article. Les circonstances de cette publication nous laissent à penser qu'un des *reviewers* de notre travail a volontairement ralenti le processus de publication de notre article - la première des 4 soumissions datant du 4 février 2013 - afin de publier son étude dans un autre journal. Je ne souhaite ni fustiger quelqu'un, ni me plaindre de ma situation, mais je suis heureux que cette leçon de vie ait pu se faire sans trop de conséquences pour nos laboratoires ou pour ma carrière. Bonne lecture à vous.

"Malheureusement pour moi, d'autres courant la même carrière, virent plusieurs des choses que j'avois vuës, & s'étant fait un plan moins étendu, m'enlevèrent, en publiant leurs observations, une espèce d'honneur que je croiois avoir également mérité."

Pierre Lyonet, 1760

préface (p.2-3) du *Traité anatomique de la Chenille, qui ronge le Bois de Saule*.

TABLE DES MATIERES

Introduction

Partie I : Introduction générale	11
1. Historique	11
2. Description du cervelet	15
2.1. Structuration anatomique	15
2.2. Rôles & Sémiologie	17
2.3. Fonctions cognitives	18
3. Variations inter-espèces : choix du modèle	18
Partie II : Organisation anatomique et fonctionnelle du cervelet	21
1. Afférences cérébelleuses	21
1.1. La voie des fibres moussues	21
1.2. La voie des fibres grimpantes	25
2. Le cortex cérébelleux	26
2.1. Projections des fibres moussues et grimpantes dans le cortex cerebelleux	26
2.2. Cellules de Purkinje	28
2.3. Cellules en grain	31
2.4. Interneurones de la couche moléculaire	33
2.5. Les interneurones de la couche granulaire	34
3. Efferences cérébelleuses : noyaux cérébelleux et vestibulaires	37
3.1. Organisation et afférences	37
3.2. Efferences	38
Partie III : Organisation modulaire du cortex cérébelleux	41
1. Découverte d'une somatotopie cérébelleuse	41
2. Organisation des afférences olivaires dans le cortex cérébelleux	43
2.1. Classification en zones longitudinales	45
2.2. Classification en microzones	47
3. Organisation des afférences moussues dans le cortex cérébelleux	49
3.1. Observations électrophysiologiques	49
3.2. Observations anatomiques	51
3.3. "Blebs"	51
4. Compartimentation Histochimique	53
4.1. Bandes zébrines : Marqueurs hétérogènes des cellules de Purkinje	53
4.2. Expression phénotypique alterné des autres types cellulaires	55
5. Co-organisation des entrées moussues et grimpantes	55
5.1. Développement et organisation	55
5.2. Interactions fonctionnelles	56
Partie IV : Traitement de l'information dans la boucle olivo-cortico-nucleaire	59
1. Propriétés physiologiques et modulation de l'activité olivaire	59
1.1. Oscillations olivaires	59
1.2. Régulation de l'olive inférieure par les entrées excitatrices	61
1.3. Régulation de l'olive inférieure par les noyaux cérébelleux	61
2. Activité olivaire et fonctionnements cérébelleux	63
2.1. Rôles des fibres grimpantes	63
2.2. Régulation du cortex cérébelleux par l'activité olivaires	65
2.3. Régulation des noyaux cérébelleux par l'activité olivaire	69
3. Organisation fonctionnelle et somatotopie cérébelleuse	71
4. Questions et intérêt scientifique	72

Matériels et méthodes

L'optogénétique & l'étude des réseaux	75
1. Principes et fonctionnement	75
2. Les approches transgéniques et virales	77
3. La Channelrhodopsine2 (H134R) exprimée dans les cellules de Purkinje	78
Matériels et méthodes	79

Résultats

Caractérisation de la lignée	83
1. Expression de la ChR2	83
1.1. Expression de la ChR2-mCherry : lignée U123	83
1.2. Expression de la ChR2-YFP : lignée U126	85
2. Fonctionnalité de la ChR2	85
2.1. Contrôle des cellules de Purkinje par la lumière	85
2.2. Contrôle indirect de l'activité des noyaux cérébelleux	89
3. Absence de phénotype comportemental	89
3.1. Protocole d'apprentissage	89
3.2. Protocole de coordination motrice	89
Article	90
Données complémentaires à l'article	121
1. L'activation de la voie olivo-corticale n'affecte pas la morphologie des CS	121
2. Corrélation négative des activités SS et CS	121
3. Existence de Cellules de Purkinje "Silencieuses"	121
Etude des cibles de collatérales des cellules de Purkinje	124
1. Méthode	124
2. Inhibition des neurones corticaux par les collatérales de Purkinje	124
3. Autres influences de l'activation des cellules de Purkinje	128

Discussion et perspectives

Contrôle de l'activité olivaire par les cellules de Purkinje	133
1. Organisation fonctionnelle des efférences cérébelleuses	134
2. Organisation temporelle du rebond CS	135
3. Organisation topographique de la boucle	135
Fonctions potentielles de la boucle olivo-cortico-nucléo-olivaire	137
1. Plasticité synaptique	137
2. Apprentissages et modèles internes	137
3. Proposition d'un modèle	138
3.1. Divergence et convergence de l'information cérébelleuse	138
3.2. Modulation de l'activité des cellules de Purkinje par les entrées moussues	139
3.3. Modulation locale des plasticités corticales	139
Résultats préliminaires	143
1. Cellules de Purkinje silencieuses	143
2. Effet de la stimulation des Purkinje sur les autres neurones corticaux	143
2.1. Collatérales des cellules de Purkinje	143
2.2. Activations lentes d'autres types neuronaux	144

Bibliographie

LISTE DES ABREVIATIONS

AHP :	a fter h yper p olarization
AMPA :	α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozol-4-propionate
BAC :	b acterial a rtificial c hromosome
CC :	c urrent c lamp
ChR2 :	ch annel r hodopsin- 2
CS :	c omplex s pike
GABA :	acide γ -aminobutyrique
GABA _A :	récepteur GABA de type A
Hsp25 :	H eat s hock p rotein 25
IPSP :	i nhibitory p ostsynaptic p otential
LTP :	l ong- t erm p otentiation
LTD :	l ong- t erm d epression
LTOs :	l ow- t hreshold o scillations
PKC α :	p rotein k inase C α
SC :	s timulus c onditionnel
SI :	s timulus i nconditionnel
SI :	s upplementary i nformation (<i>uniquement pour l'article</i>)
SS :	s imple s pike
SSTOs :	s inusoidal s ub t hreshold o scillations
VC :	v oltage c lamp
wt :	w ild t ype
YFP :	y ellow f luorescent p rotein
ZII :	z ébrine I I

TABLE DES FIGURES

Introduction

- p. 14 **Figure 1** : Orientations et plans de coupes.
- p. 16 **Figure 2** : Divisions cérébelleuses.
- p. 20 **Figure 3** : Comparaison inter-espèces de l'anatomie cérébelleuse générale.
- p. 22 **Figure 4** : Organisation corticale et entrées cérébelleuses.
- p. 24 **Figure 5** : Organisation de l'olive inférieure.
- p. 27 **Figure 6** : Organisation des neurones cérébelleux.
- p. 27 **Figure 7** : La cellule de Purkinje.
- p. 30 **Figure 8** : Les cellules en grain.
- p. 32 **Figure 9** : Interneurones de la couche moléculaire.
- p. 32 **Figure 10** : Interneurones de la couche granulaire.
- p. 36 **Figure 11** : Organisation des noyaux cérébelleux.
- p. 42 **Figure 12** : Evolution de la somatotopie cérébelleuse.
- p. 44 **Figure 13** : Organisation zonale du cortex cérébelleux.
- p. 46 **Figure 14** : Organisation microzonale du cortex cérébelleux.
- p. 50 **Figure 15** : Organisation fonctionnelle des afférences moussues dans le cortex cérébelleux.
- p. 52 **Figure 16** : Organisation anatomique des afférences moussues dans le cortex cérébelleux.
- p. 52 **Figure 17** : Blebs de la couche granulaire.
- p. 54 **Figure 18** : Compartimentation histochimique du cortex cérébelleux.
- p. 58 **Figure 19** : Oscillations olivaires et afférences inhibitrices.
- p. 60 **Figure 20** : Oscillations olivaires et afférences excitatrices.
- p. 64 **Figure 21** : Propriétés comportementales du conditionnement de fermeture de la paupière.
- p. 66 **Figure 22** : Influence des CS sur la décharge des SS.
- p. 68 **Figure 23** : Dépression à long terme à la synapse grain-Purkinje.
- p. 70 **Figure 24** : Boucle olivo-cortico-nucléo-olivaire.
- p. 76 **Figure 25** : Optogénétique

Résultats

- p. 84 **Figure 26** : Constructions de souris transgéniques exprimant la ChR2 dans les cellules de Purkinje.
- p. 86 **Figure 27** : Caractérisation électrophysiologique des cellules de Purkinje in vitro.
- p. 87 **Figure 28** : Effet de la stimulation des cellules de Purkinje sur les neurones des noyaux cérébelleux.
- p. 88 **Figure 29** : Absence de phénotype comportemental.

Article : Figure 1 à 4 - Figure supplémentaire S1 à S6

- p. 120 **Figure 30** : La forme des CS n'est pas affectée lors du recrutement de la voie cortico-nucléo-olivaire.
- p. 122 **Figure 31** : Relation d'activité entre les SS et les CS.
- p. 123 **Figure 32** : Existence de cellules de Purkinje silencieuses.
- p. 125 **Figure 33** : Collatérales des cellules de Purkinje.
- p. 125 **Figure 34** : Remplissage et identification des neurones enregistrés.
- p. 127 **Figure 35** : Inhibition par les collatérales des cellules de Purkinje.
- p. 129 **Figure 36** : Effet de l'activation collective des cellules de Purkinje sur d'autres types neuronaux du cortex cérébelleux.

Discussion

- p. 140 **Figure 37** : Divergence et convergence des informations grimpantes
- p. 141 **Figure 38** : Modèle

INTRODUCTION

PARTIE I : INTRODUCTION GENERALE

1. HISTORIQUE

Les premières mentions connues du cervelet remontent à l'Antiquité où Aristote (384 - 322 avant J.C.) et Erasistratus (304 - 250 avant J.C.) le distinguent du cerveau (Malomo et al., 2006). Le nom de *paracephalon* (littéralement "semblable au cerveau") est utilisé, mais aucune description anatomique ou fonctionnelle n'est alors avancée. Galien (129 - 201) décrit ensuite cette structure chez l'animal comme étant située sous le cerveau en lui supposant un rôle dans la naissance des nerfs crâniens et de la moelle épinière. L'attachement de Galien à la théorie des humeurs (développée par Hippocrate au IV^e siècle avant JC) et sa grande influence sur ses successeurs figeront pendant plusieurs siècles l'avancée des connaissances en matière de recherches médicales.

Avec la Renaissance, les travaux d'André Vesale permettent de sortir du dogme du Galiénisme et d'obtenir la première description anatomique du cervelet (*De humanis corporis fabrica*, 1543 ; cité par (Glickstein et al., 2009)). Les progrès en matière de dissection portés par Constant Varole (1543-1575) ouvrent la porte à des recherches anatomiques plus détaillées. Il décrit et illustre ainsi de manière fine le pont (de Varole), une structure fortement liée au cervelet.

Une description plus précise de l'anatomie cérébrale est proposée par Thomas Willis en 1664 dans son ouvrage *Anatomy of the Brain*. Il remarque l'agencement arborescent des matières grises et blanches du cervelet et donne une bonne description du réseau sanguin. Outre les aspects anatomiques, il propose que le tronc cérébral et le cervelet soient rattachés aux réflexes et aux instincts. En 1665, Marcello Malpighi décrit un réseau de fibres ayant pour origine la moelle épinière et projetant, à travers le tronc, jusqu'au cortex cérébelleux. La première mention des noyaux cérébelleux revient à Raymond de Vieussens qui, en 1684, les nomme *corpus rhomboideum*. Il les décrit comme "*une zone gris-cendrée enfouie dans la substance blanche du cervelet*". Felix Vicq d'Âzyr (1746 - 1794) en fait une description plus précise et les renomme *corps dentelés*. Les autres noyaux sont ensuite appelés *emboliformes*, *globuleux* et *fastigiaux* par Stilling en 1864.

Au XVIII^e siècle, Vincenzo Malacarne (1744 - 1816) publie le premier ouvrage entièrement consacré au cervelet (Malacarne, 1776) dans lequel il fait une description bien plus détaillée du cortex cérébelleux et des noyaux que ses prédécesseurs. Il propose une dénomination en lobes et lobules et identifie une atrophie du cervelet chez des personnes souffrantes de crétinisme (attribué à un manque d'iode dans sa région d'Italie). Vers la fin du XVIII^e siècle, Johann Christian Reil (1759 - 1813) et Karl Friedrich Burdach (1776 - 1847) proposent, sur la base des travaux de Malacarne, une nomenclature des lobules du cervelet humain.

Les bases anatomiques étant posées, la compréhension des fonctions cérébelleuses est alors rendue possible par l'expérimentation animale qui devient précise et systématique au début du XIX^e siècle. Luigi Rolando, en 1809, établit que des lésions cérébelleuses provoquent des troubles moteurs sans atteindre les fonctions sensorielles ou intellectuelles. En 1822, Flourens va plus loin en observant que les animaux avec une lésion au cervelet sont toujours capables de se déplacer, mais le font de manière maladroite et sans coordination (d'après (Ito, 2002a)). Il conclut, en opposition avec Rolando, que le cervelet n'est pas la source de l'initiation des mouvements (qu'il place alors dans la

moelle épinière et dans le bulbe rachidien). Luigi Luciani, en 1891, observe en détail la récupération qui se produit après une lésion partielle ou une ablation totale du cervelet et fait la distinction entre effets transitoires et effets à long terme. Les trois symptômes cérébelleux selon lui sont l'asthénie (faiblesse ou fatigue physique), l'atonie musculaire et l'astasia (impossibilité de se maintenir debout).

Par la suite Joseph Babinski (1857 – 1932) et Gordon Holmes (1876 – 1965) font des interprétations cliniques plus détaillées concluant, entre autres, que des lésions cérébelleuses produisent des symptômes du même côté du corps (ipsilatéral). Babinski, sur la base des travaux de Flourens, met en avant des déficits de coordination des muscles antagonistes lors de séquences de mouvements rapides (*dysdiadochokinesis*). Holmes, s'appuyant sur des observations faites lors de la première guerre mondiale, confirme l'origine cérébelleuse de la triade de symptômes décrite par Luciani (Holmes, 1917). Ainsi, les premiers concepts des fonctions cérébelleuses sont posés dès le XIXe siècle.

En parallèle, Lodewijk Bolk (1866 – 1930) compare et décrit l'anatomie cérébelleuse de 69 mammifères différents. Il divise le cervelet en 4 régions (un lobe antérieur, un vermis postérieur et deux hémisphères) et remarque qu'il y a, pour toutes les espèces observées, une continuité des foliations du vermis et des hémisphères. Bolk et Larsell contribuent au développement d'une nomenclature cérébelleuse toujours utilisée à l'heure actuelle (Glickstein and Voogd, 1995). Ainsi, les termes de crus I et II, de lobule simplex et paramédian sont attribués à Bolk et la subdivision en 10 lobules du vermis à Larsell. Bolk propose également l'existence d'une unique carte somatotopique à la surface du cervelet. Cependant, Adrian ainsi que Snider et Stowell, démontrent l'existence d'une seconde carte respectivement dans les hémisphères et dans le lobule paramédian (Adrian, 1943; Snider and Stowell, 1944).

La première description d'une cellule du cerveau (et du cervelet) remonte à 1837 par Jan Evangelista Purkinje, 2 ans avant que Schwann (1839) ne propose la théorie cellulaire. L'apparition des marquages cellulaires issus des travaux de Camillo Golgi (1883) contribua grandement au développement des connaissances histologiques et à l'établissement de la théorie neuronale. Santiago Ramón y Cajal (1852 - 1930), s'appuyant sur cette technique, est le premier à décrire que les interactions neuronales se font par contact (et non par fusion) d'un axone sur une dendrite ou un corps cellulaire d'un autre neurone (Ramon y Cajal, 1911). Il décrit aussi en 1894 la structure histologique du cervelet, en révélant précisément les deux afférences du cortex cérébelleux : les fibres grimpantes et les fibres moussues. Les observations et les hypothèses qu'il développe ont posé des bases solides pour les recherches sur le cervelet et ses questionnements sont encore d'actualité aujourd'hui.

Même si le rôle du cervelet dans le contrôle moteur est établi depuis le début du XIXe siècle, il faut attendre les années 60, avec le développement de la microscopie électronique et des enregistrements par microélectrode, pour que soient testées les hypothèses de Ramón y Cajal. Les études morphologiques de Janos Szentàgothai et les enregistrements électrophysiologiques de John Eccles fournissent une image de l'architecture fonctionnelle du cortex cérébelleux (Szentagothai and Rajovits, 1959; Eccles et al., 1967). En 1974, Palay et Chan-Palay décrivent de manière fine l'ultrastructure des synapses cérébelleuses. Les années 70 à 90 voient éclore les premières cartes somatotopiques précises, la subdivision du cervelet en différentes zones ou encore de nouvelles populations cellulaires (Palay and Chan-Palay, 1974). Les études des 40 dernières années, aidées par

de grandes évolutions techniques, ont permis de définir un rôle du cervelet dans différentes formes d'apprentissage, de fonctions cognitives ou encore émotionnelles.

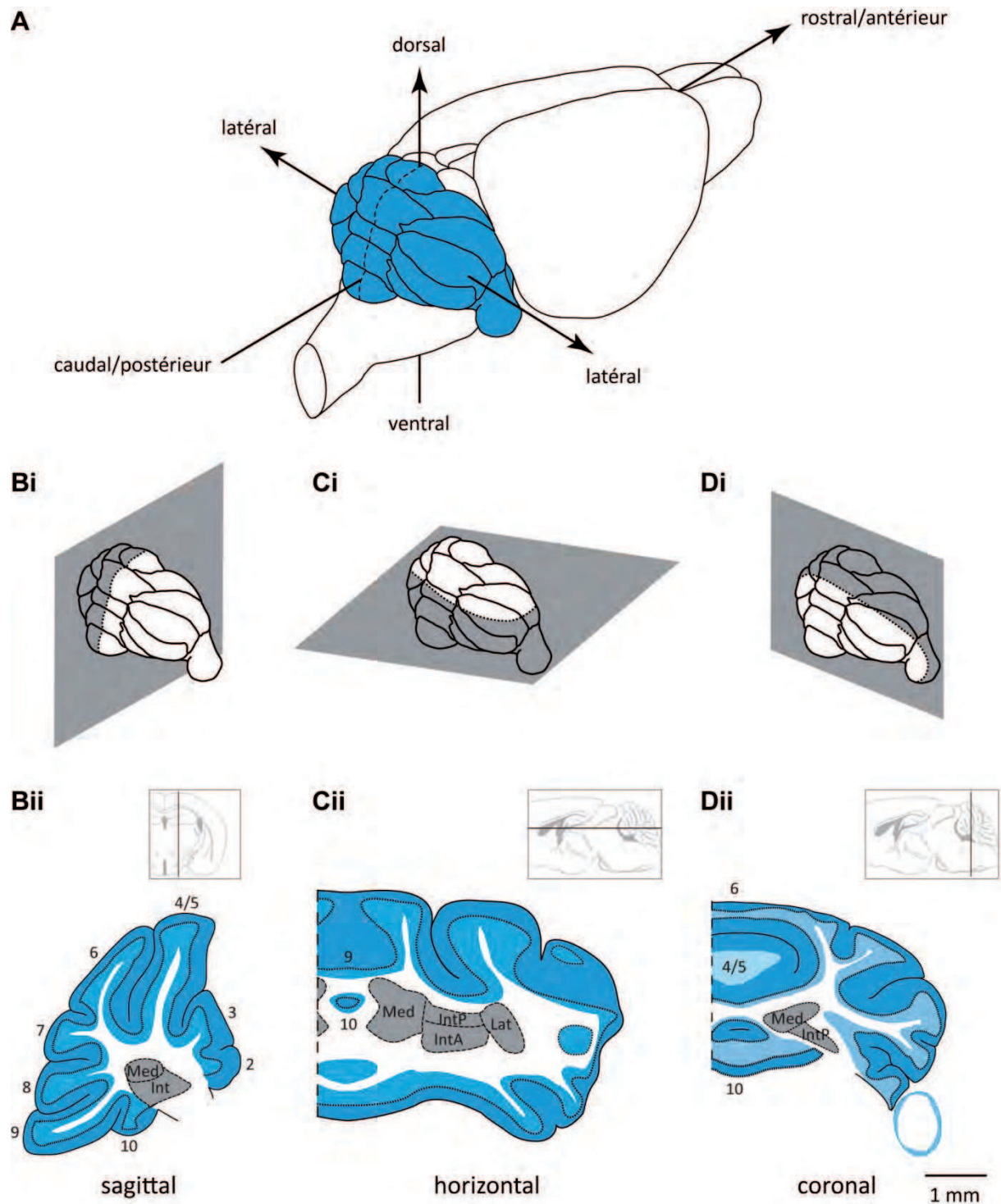


Figure 1 : Orientations et plans de coupes. **A** : Représentation du cervelet d'une souris et des 3 orientations anatomiques. La ligne médiane est représentée en pointillés. **Bi, Ci, Di** : Représentations tridimensionnelles des plans de coupes sagittale (Bi), horizontale/transversale (Ci) et coronale (Di). **Bii, Cii, Dii** : Coupes de cervelet sur lesquelles sont représentés : en gris les noyaux cérébelleux, en bleu clair la couche granulaire, en bleu foncé la couche moléculaire. Adapté de la troisième version de "the mouse brain" par Franklin et Paxinos.

Abbréviations : Int = interposed nucleus ; IntA = anterior interposed nucleus ; IntP = posterior interposed nucleus ; Lat = lateral cerebellar nucleus ; Med = medial cerebellar nucleus.

2. DESCRIPTION DU CERVELET

Le cervelet est une structure du système nerveux central située sous le télencéphale, à l'arrière du tronc cérébral et du bulbe. Il est la seconde structure de l'encéphale en terme de taille, représentant environ 10% du volume du cerveau, et contient plus de neurones que le reste du système nerveux central (Andersen et al., 1992; Herculano-Houzel et al., 2007; Sarko et al., 2009). Sur le plan phylogénétique on le trouve chez l'ensemble des vertébrés, bien qu'il existe également une structure analogue chez les céphalopodes, portant le nom de lobe pédonculaire ou encore lobe visuo-moteur (Hobbs and Young, 1973). A l'image du télencéphale, l'aspect extérieur du cervelet est marqué par la présence de différents sillons. L'organisation histologique est également comparable puisque le cervelet présente un cortex en surface et des structures en noyaux situées dans la substance blanche (figure 1).

2.1. Structuration anatomique

Le patron de foliation du cervelet est invariant au sein d'une espèce donnée, procurant ainsi d'excellents repères anatomiques. La souris étant notre modèle d'étude, je vais présenter la structuration générale du cervelet de cet animal que l'on peut anatomiquement observer selon les trois plans de coupe classiques : sagittal – transversal/horizontal – coronal (figure 1).

2.1.1. Organisation anatomique générale

Chez les mammifères, le cervelet peut être partagé selon l'axe rostro-caudal en 3 lobes : antérieur, postérieur et flocculo-nodulaire (figure 2A) ; eux-mêmes divisibles en lobules numérotés de I à X dans le vermis (figure 2A) (Larsell, 1952). Une présentation déroulée du cervelet - regroupant les axes rostro-caudal et dorso-ventral sur un même plan - permet une visualisation de l'ensemble des divisions et est rendue possible par une organisation tissulaire homogène dans ces 2 axes (figure 2Aii). Selon l'axe médio-latéral le cervelet se partage, de part et d'autre de la ligne médiane, en 3 divisions parasagittales : le vermis (cervelet médial), le paravermis (cervelet intermédiaire ou *pars intermedia*) et l'hémisphère (cervelet latéral ; figure 2B).

Sous les foliations corticales se situe la substance blanche dans laquelle se trouvent 3 paires de noyaux cérébelleux portant, chez les rongeurs, les noms de noyau médial, interposé - antérieur et postérieur - et latéral. Ces noyaux constituent, avec les noyaux vestibulaires, la sortie du cervelet (figure 2C).

2.1.2. Organisation fonctionnelle

Il est possible de distinguer trois régions cérébelleuses fonctionnelles, plus ou moins étendues selon le degré d'évolution phylogénétique, qui sont associées à des afférences et efférences spécifiques.

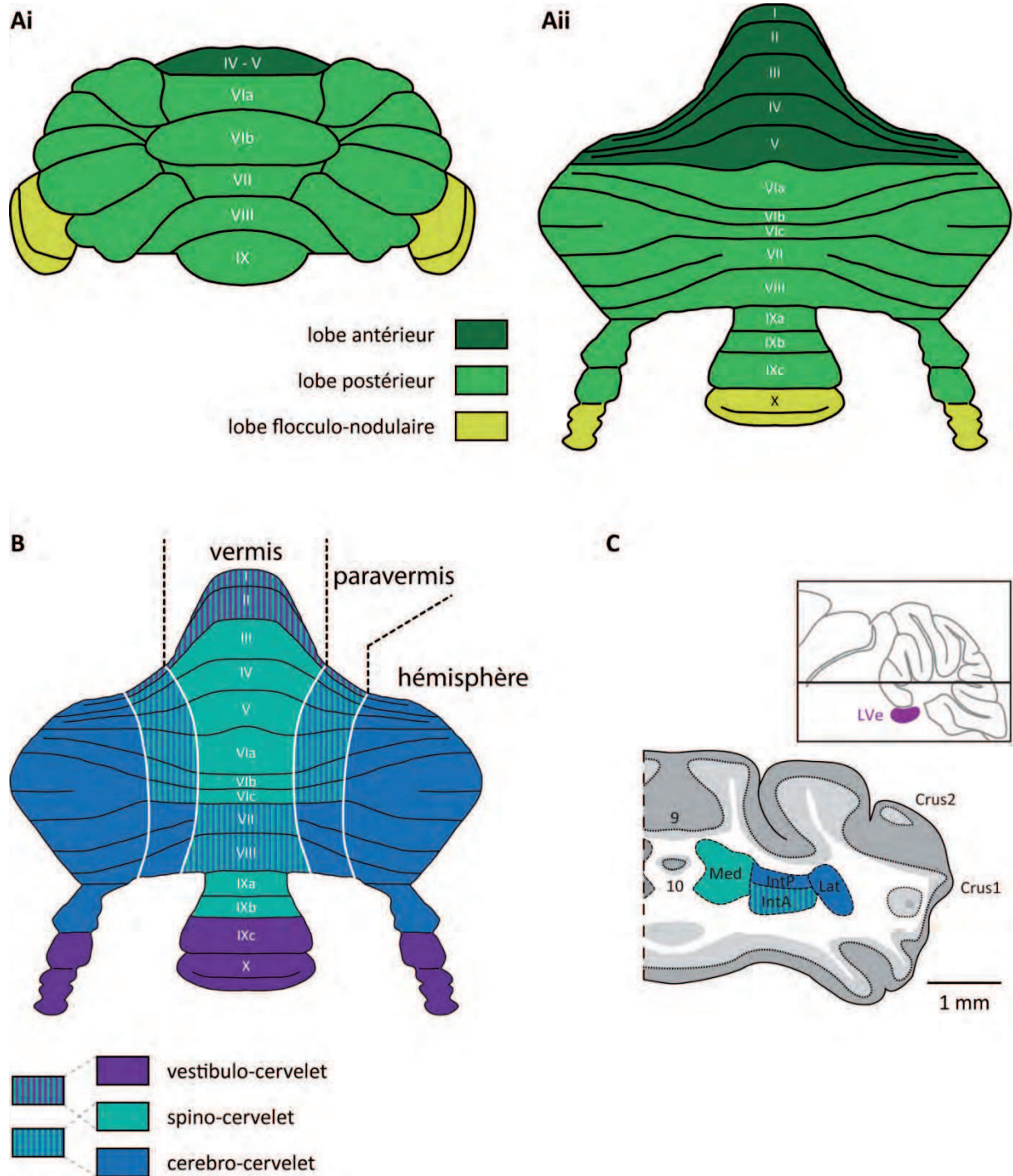


Figure 2 : Divisions cérébelleuses. **A** : Divisions anatomiques du cervelet selon l'axe antéro-postérieur. **Ai** : Représentation tridimensionnelle. **Aii** : Présentation du même cervelet sous une forme "déroulée" pour laquelle la numérotation des 10 lobules est visible. Adapté de Sugihara et Shinoda, 2004. **B** : Divisions fonctionnelles du cervelet selon l'axe médio-latéral. **C** : Zones de projection vers les noyaux cérébelleux (en vert et bleu) et vestibulaires (en violet dans l'insert).

Abréviations : I à X = numérotation des 10 lobules proposée par Larsell ; IntA = anterior interposed nucleus ; IntP = posterior interposed nucleus ; Lat = lateral cerebellar nucleus ; LVe = lateral vestibular nucleus ; Med = medial cerebellar nucleus.

Le vestibulo-cervelet (ou archéo-cervelet) correspond à la partie la plus ancestrale et est composé des lobes flocculo-nodulaires. Il reçoit des afférences vestibulaires, proprioceptives et cutanées et projette sur les noyaux vestibulaires (figure 2B). Le vestibulo-cervelet est impliqué dans les processus réflexes d'équilibration ou encore dans la gestion des réflexes oculomoteurs. Une lésion à son niveau se traduit par des troubles de l'équilibre et/ou un nystagmus.

Le spino-cervelet (ou paléo-cervelet) apparaît chez les reptiles et correspond aux régions vermale et paravermale du lobe antérieur. Il reçoit des afférences proprioceptives, mais aussi somesthésiques, vestibulaires et sensorielles. Le spino-cervelet émet des efférences en direction du noyau médial (fastigial), vers la partie antérieure du noyau interposé et vers les noyaux vestibulaires (figure 2B). Il est impliqué dans les réflexes de redressement et d'adaptation de la posture. Une lésion de cette région se traduit par des troubles de la marche - généralement une ataxie - et de la coordination des membres inférieurs.

Le cérébro-cervelet (ou néo-cervelet) apparaît avec les mammifères et correspond aux hémisphères ainsi qu'à la zone centrale et postérieure du paravermis. Il reçoit principalement des informations corticales qui transitent via les noyaux du pont, en plus d'afférences de même nature que le spino-cervelet. Le néo-cervelet contacte principalement les noyaux latéraux, mais également les noyaux interposés antérieurs et postérieurs (figure 2B). Il est impliqué dans la planification et la régulation des mouvements fins et balistiques, par le contrôle et la coordination des muscles agonistes et antagonistes impliqués.

2.2. Rôles & Sémiologie

Le cervelet joue un rôle fondamental dans la coordination, l'ajustement, la planification et l'automatisation des mouvements, dans le maintien de la posture et de l'équilibre ou encore dans la modulation de certains réflexes. Pour ce faire, il va collecter des informations motrices et sensorielles provenant aussi bien du cortex cérébral que du reste du corps via la moelle épinière.

Lors de l'initiation d'un mouvement volontaire, une copie de la commande motrice efférente provenant du cortex cérébral est envoyée vers le cervelet (Sperry, 1950; Von Holst, 1954; Wolpert et al., 1998). Au cours de l'exécution de ce dernier, des informations somesthésiques, vestibulaires, visuelles et auditives parviennent au cervelet en suivant différentes voies d'entrées. Les renseignements ainsi collectés représentent le contexte somatosensoriel du corps et sont, parfois, déjà hautement intégrés avant d'atteindre le cervelet. Une des fonctions du cervelet serait, à partir de la copie de la commande motrice, de prédire le retour sensoriel correspondant à l'ordre moteur. Cette prédiction est alors comparée avec les informations sensorielles ascendantes afin de détecter une éventuelle erreur motrice et, si besoin, la corriger (Wolpert et al., 1998; Bastian, 2006). Cette comparaison du mouvement programmé et du mouvement réel perçu par le retour sensoriel pourrait, entre autre, donner au cervelet le statut de comparateur entre l'intention et la performance (Thach et al., 1992; Jueptner and Weiller, 1998).

Les troubles moteurs consécutifs à une lésion cérébelleuse varient en fonction de la localisation et de l'étendue de la zone atteinte (Holmes, 1917) et sont généralement limités à l'hémicorps ipsilatéral à la lésion. Ils s'appliquent aussi bien à la coordination des membres, aux

mouvements fins, à la posture, à la démarche, à l'oculomotricité ou encore à la parole. Les principaux symptômes associés au cervelet sont :

- L'hypotonie : correspond à une diminution du tonus et de la résistance des muscles. Cette manifestation est souvent transitoire.
- L'ataxie : se manifeste par un manque de coordination des mouvements volontaires se traduisant par des troubles de l'équilibre, du maintien postural et de la coordination oculomotrice.
- L'incoordination cinétique : s'exprime par différents symptômes cérébraux, avec par exemple une hyper- ou une hypométrie, provoquant des mouvements d'amplitude anormales ; une adiadicocinésie, identifiée par une incapacité à alterner des mouvements rapides et fins ; ou encore, des tremblements.

2.3. Fonctions cognitives

L'implication du cervelet a également été montrée pour certains processus cognitifs (Leiner et al., 1993; D'Angelo and Casali, 2012). Sur le plan clinique, il existe un syndrome cérébelleux qui se traduit par une atteinte des fonctions exécutives de la planification, de la mémoire de travail visuo-spatiale, de la fluence verbale et par des changements émotionnels (Schmahmann and Sherman, 1998; Schmahmann and Caplan, 2006). Plus généralement, le cervelet pourrait également jouer un rôle dans l'autisme, la schizophrénie et la dyslexie (Hashimoto et al., 1995; Andreasen et al., 1998; Nicolson et al., 2001).

Un rôle du cervelet dans les apprentissages impliquant la mémoire spatiale a pu être montré expérimentalement (Goodlett et al., 1992; Lalonde, 1997; Petrosini et al., 1998). De plus, l'utilisation de souris transgéniques et d'approches pharmacologiques perturbant les fonctions cérébelleuses a mis en avant un déficit de mémoire procédurale dans le test de la piscine de Morris (Rondi-Reig and Burguière, 2005).

La fonctionnalité de ces processus cognitifs serait sous-tendue par les mêmes réseaux que ceux utilisés pour les traitements sensori-moteurs (Glickstein et al., 2011; D'Angelo and Casali, 2012). Cependant, le rôle du cervelet dans les fonctions cognitives est toujours débattu, probablement parce qu'il est difficile de dissocier les déficits moteurs des déficits cognitifs dans les paradigmes expérimentaux.

3. VARIATIONS INTER-ESPECES : CHOIX DU MODELE

Les études inter-espèces ont permis de constater que la taille du vermis, des paravermis et des hémisphères varie de façon non proportionnelle avec l'évolution des vertébrés (Bolk, 1906; Sultan and Braitenberg, 1993). L'anatomie du cervelet passe d'une structure simple, chez les amphibiens et les reptiles, à des formes plus complexes, chez les poissons, oiseaux et mammifères. Malgré ces variations, le cervelet conserve une organisation stable au cours du développement phylogénétique des mammifères sur le plan des compartiments cytoarchitecturaux, des structures

majeures et des fonctions principales (Bolk, 1906). Au cours de la phylogénèse, le développement des hémisphères s'est fait au détriment de celui du vermis, et les foliations ont été de plus en plus nombreuses (figure 3). Chez les mammifères, la densité de neurones et la surface du cervelet sont directement corrélées à la taille du corps, renforçant l'idée de sa forte implication dans les phénomènes moteurs. La densité des cellules de Purkinje exprimée par rapport à celle des cellules en grains semble être un bon marqueur du stade de développement phylogénétique (Lange, 1975). Une diminution de ratio est ainsi observée avec l'évolution des espèces (homme = 1:2991 ; singe écureuil = 1:1864 ; souris = 1:778). Cependant, indépendamment de ces variations de taille et de ratio cellulaire, l'organisation histologique et la structuration cérébelleuse semblent être bien conservées entre les espèces.

Les modèles animaux utilisés historiquement pour les recherches sur le cervelet ont d'abord été le singe, le chat et le lapin, puis plus récemment le rat et la souris. Malgré cette variabilité inter-espèces, la majeure partie des avancées scientifiques observées sur un modèle ont pu être reproduites dans les autres. L'étude présentée dans ce manuscrit utilise un modèle de souris transgéniques, c'est pourquoi les schémas et les données de la littérature utilisées feront préférentiellement appel aux modèles murins lorsque cela est possible.

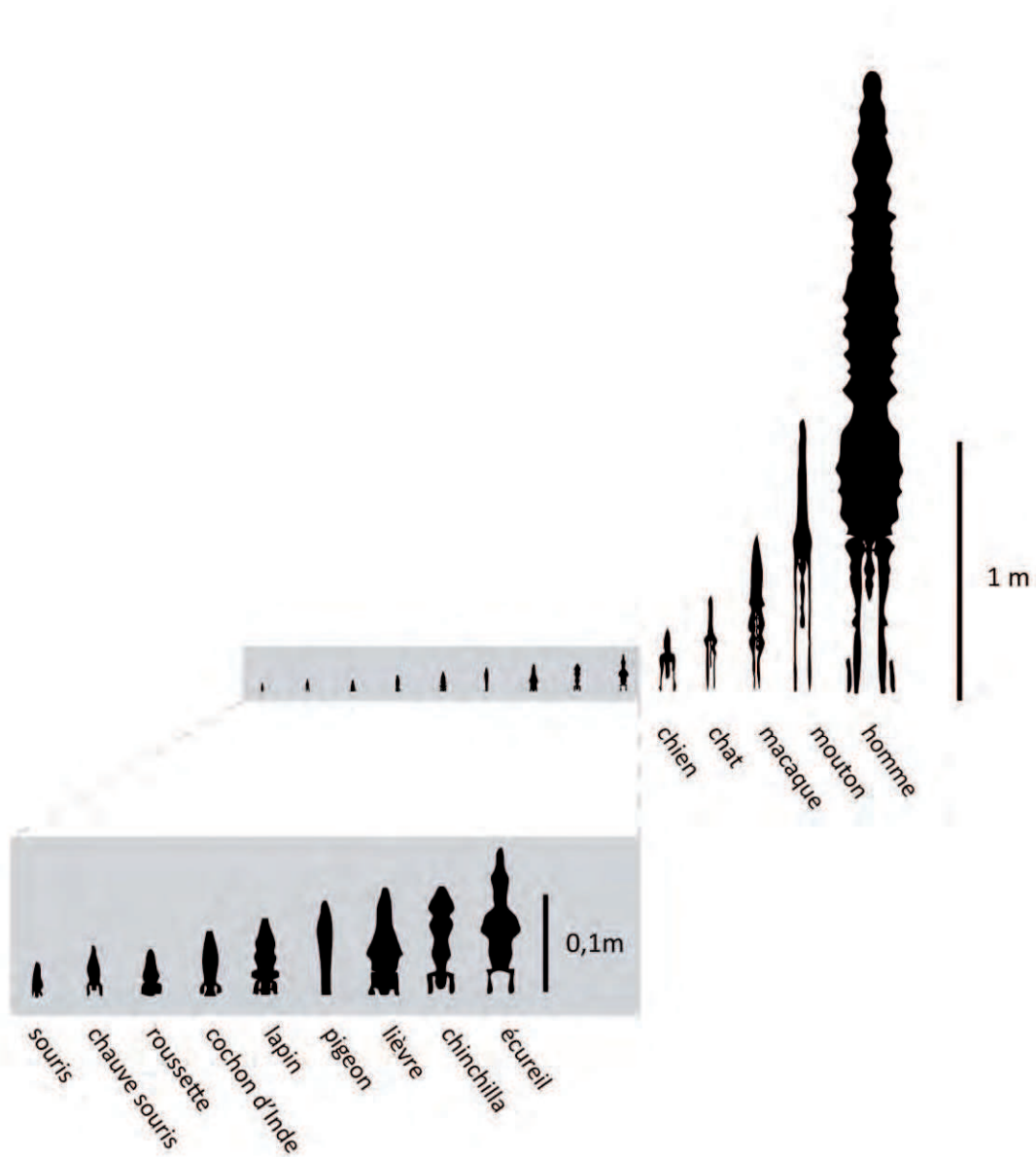


Figure 3 : Comparaison inter-espèces de l'anatomie cérébelleuse générale. Cervelet "déroulé" des différents mammifères. Cette représentation fait apparaître les différentes divisions ainsi que les variations de longueur des lobes postérieurs et floclunodulaires. L'échelle est la même pour les directions latéro-latérales et antéro-postérieures. Adapté de Sultan et Braitenberg, 1993.

PARTIE II : ORGANISATION ANATOMIQUE ET FONCTIONNELLE DU CERVELET

L'information entrante et sortante du cervelet passe systématiquement par les pédoncules cérébelleux - inférieurs, moyens et supérieurs - qui rattachent le cervelet au reste de l'encéphale. Les fibres grimpantes et les fibres moussues constituent les afférences principales qui projettent vers le cortex cérébelleux. Ce dernier intègre et traite l'information au sein des couches granulaires et moléculaires avant de la transmettre, via les cellules de Purkinje, aux noyaux cérébelleux et vestibulaires, lesquels constituent l'unique voie de sortie du cervelet (figure 1 & 4A). Afin de respecter cette logique physiologique d'intégration du signal, je présenterai l'anatomie de ces structures dans cet ordre.

1. AFFERENCES CEREBELLEUSES

Les fibres moussues et les fibres grimpantes jouent un rôle central et complémentaire dans l'acheminement et le traitement des informations par le cervelet. Ces deux entrées glutamatergiques projettent dans des couches distinctes du cortex cérébelleux. Des afférences sérotoninergiques, dopaminergiques, noradrenergiques ou encore cholinergiques projettent également dans cette structure (Schweighofer et al., 2004; Oostland and van Hooft, 2013), cependant, elles ne seront pas développées dans ce manuscrit.

Le cortex cérébelleux procède au traitement des informations arrivant des fibres grimpantes et des fibres moussues séparément. C'est dans l'étude de l'intégration et de l'interaction de ces deux entrées que réside la compréhension des fonctionnements majeurs de cette structure. Ainsi, bien que notre travail porte essentiellement sur les interconnexions entre les fibres grimpantes et le cervelet, nous présenterons également l'organisation des afférences moussues. Les interactions possibles entre ces deux systèmes d'information seront discutés ultérieurement.

1.1. La voie des fibres moussues

Les fibres moussues sont issues des noyaux pré-cérébelleux et de la moelle épinière. Elles sont appelées ainsi car leurs terminaisons, projetant dans la couche granulaire du cortex cérébelleux, forment un complexe synaptique ayant l'aspect d'un morceau de mousse (Ramon y Cajal, 1911). Arrivé dans la substance blanche cérébelleuse, l'axone des fibres moussues va produire des collatérales qui peuvent croiser la ligne médiane et se distribuer bilatéralement dans le cortex cérébelleux, ou simplement rester ipsilatérales. Chaque fibre moussue produit ainsi une centaine de ces terminaisons également appelées "rosettes" (Quy et al., 2011). Une partie d'entre elles envoie également une collatérale vers les noyaux cérébelleux (Gerrits and Voogd, 1987; Mihailoff, 1993; Matsushita and Yaginuma, 1995). L'information sensorielle acheminée par les fibres moussues peut suivre deux voies. Tout d'abord, la voie directe va convoier des informations provenant de la face - voie trigémino-cérébelleuse - ou de la périphérie - voie spino-cérébelleuse - renseignant essentiellement sur la position des membres, la pression cutanée, l'inclinaison de la tête ou encore l'orientation des yeux. La voie indirecte - ou cérébro-cérébelleuse - va transmettre des informations

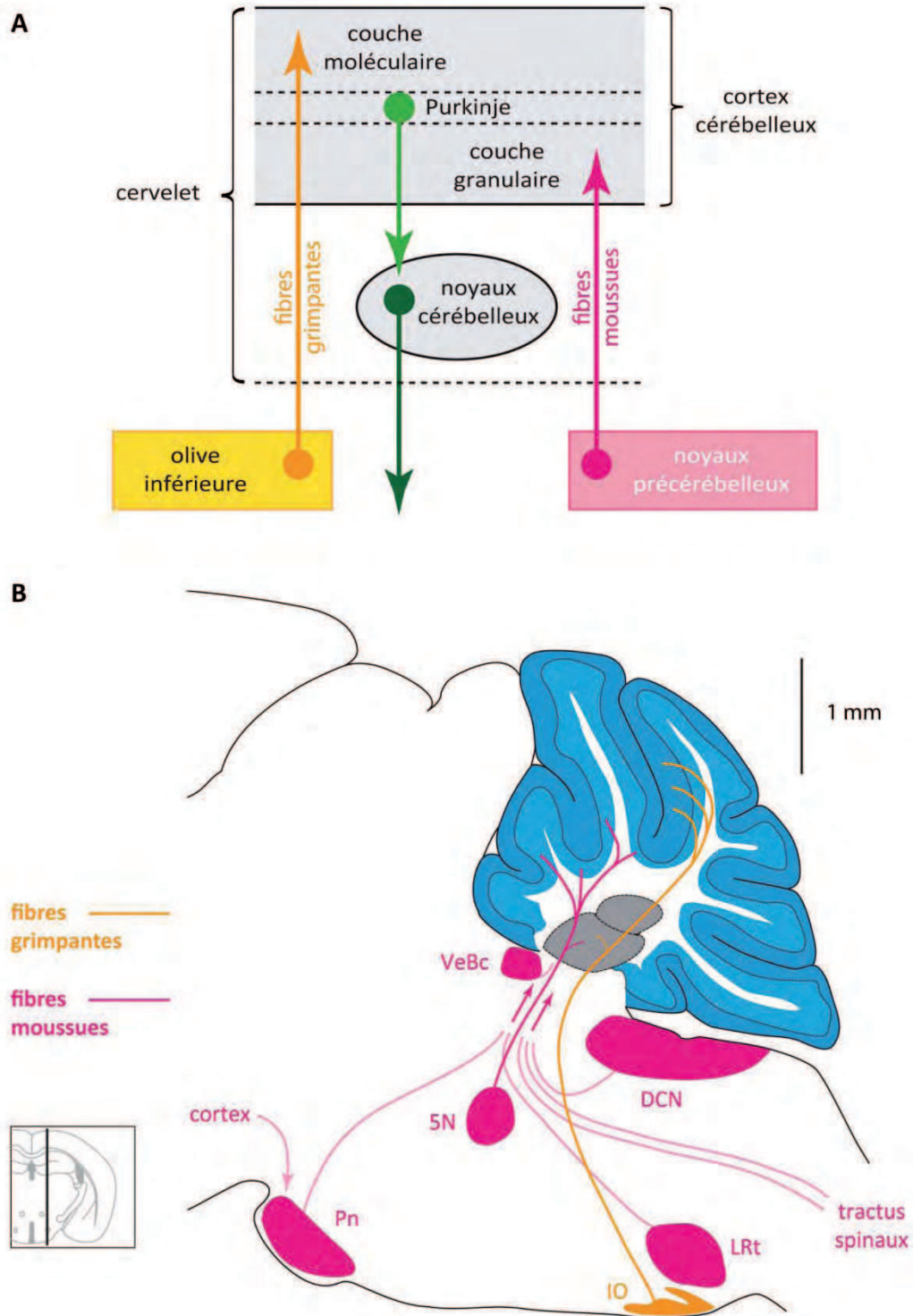


Figure 4 : Organisation corticale et entrées cérébelleuses. **A** : Schéma simplifié de l'organisation cérébelleuse. **B** : Détail des noyaux de projection des fibres moussues (en rose) et représentation de l'olive inférieure projetant les fibres grimpantes (en orange).

Abréviations : 5N = motor trigeminal nucleus ; DCN = column dorsal nuclei ; IO = inferior olive ; Lrt = Lateral Reticular nucleus ; Pn = pontine nuclei ; VeBc = Vestibulocerebellar nucleus.

déjà intégrées provenant essentiellement des cortex cérébraux sensoriels et moteurs (Morissette and Bower, 1996).

1.1.1. Noyaux précérébelleux

La majorité des afférences moussues provient du tronc cérébral et plus particulièrement d'une série de noyaux relais transférant tous types d'informations motrices et sensorielles en provenance des cortex cérébraux, du corps et de la face (pour revue voir (Ruigrok, 2004)). Il est possible de distinguer différents types de noyaux précérébelleux (figure 4B) :

- Les noyaux du pont constituent une voie importante de projection des fibres moussues vers le cortex cérébelleux (Serapide et al., 2001). Ils reçoivent principalement des entrées cérébrales sensorimotrices et visuelles, puis dans une moindre mesure, des entrées auditives et des aires associatives. Ainsi, les informations qui parviennent au cervelet par ce biais ont déjà fait l'objet d'un traitement cortical (Schmahmann and Pandya, 1997).
- Les noyaux réticulaires latéraux contactent l'ensemble des régions cérébelleuses à l'exception du lobe flocculo-nodulaire et envoient systématiquement une collatérale aux noyaux cérébelleux (Wu et al., 1999). Ils reçoivent des afférences principalement de la moelle épinière, mais également de quelques structures supra-spinales (Bruckmoser et al., 1970).
- Les noyaux des nerfs crâniens, dont les afférences proviennent majoritairement du noyau principal et mésencéphalique des noyaux trigéminals, convoient des informations somato-sensorielles de la face (Van Ham and Yeo, 1992). Peu d'études relatent l'existence de collatérales en direction des noyaux cérébelleux.
- Les noyaux vestibulaires projettent principalement sur le lobe flocculo-nodulaire en apportant essentiellement des informations provenant du corps genouillé latéral et du colliculus supérieur (figure 4B).
- Les noyaux de la colonne dorsale, situés dans le tronc cérébral, relaient également les informations spinales. Ils sont composés des noyaux cunéiformes internes, externes et des noyaux graciles. Des marquages rétrogrades et antérogrades ont pu établir une connexion principalement ipsilatérale avec le cervelet (Gerrits et al., 1985; Quy et al., 2011). Cette voie est majoritairement impliquée dans le transfert des informations somato-sensorielles provenant du corps (figure 4B). Les collatérales en direction des noyaux cérébelleux seraient peu nombreuses, de l'ordre de 1 pour 15 axones (Quy et al., 2011).

Différents faisceaux provenant de la moelle épinière envoient directement des fibres moussues dans le cortex du cervelet. Les voies spino-cérébelleuses dorsales et ventrales sont dédiées à l'information provenant des membres inférieurs, la voie rostrale - faisant un relai dans les noyaux de la colonne dorsale - étant consacrée aux membres supérieurs (Yaginuma and Matsushita, 1986). Ces voies transmettent l'information proprioceptive et somesthésique en renseignant le cervelet sur l'état spatial et dynamique des membres à un instant précis. Les entrées cérébelleuses ainsi produites forment également des collatérales qui ciblent les noyaux du cervelet (figure 4B).

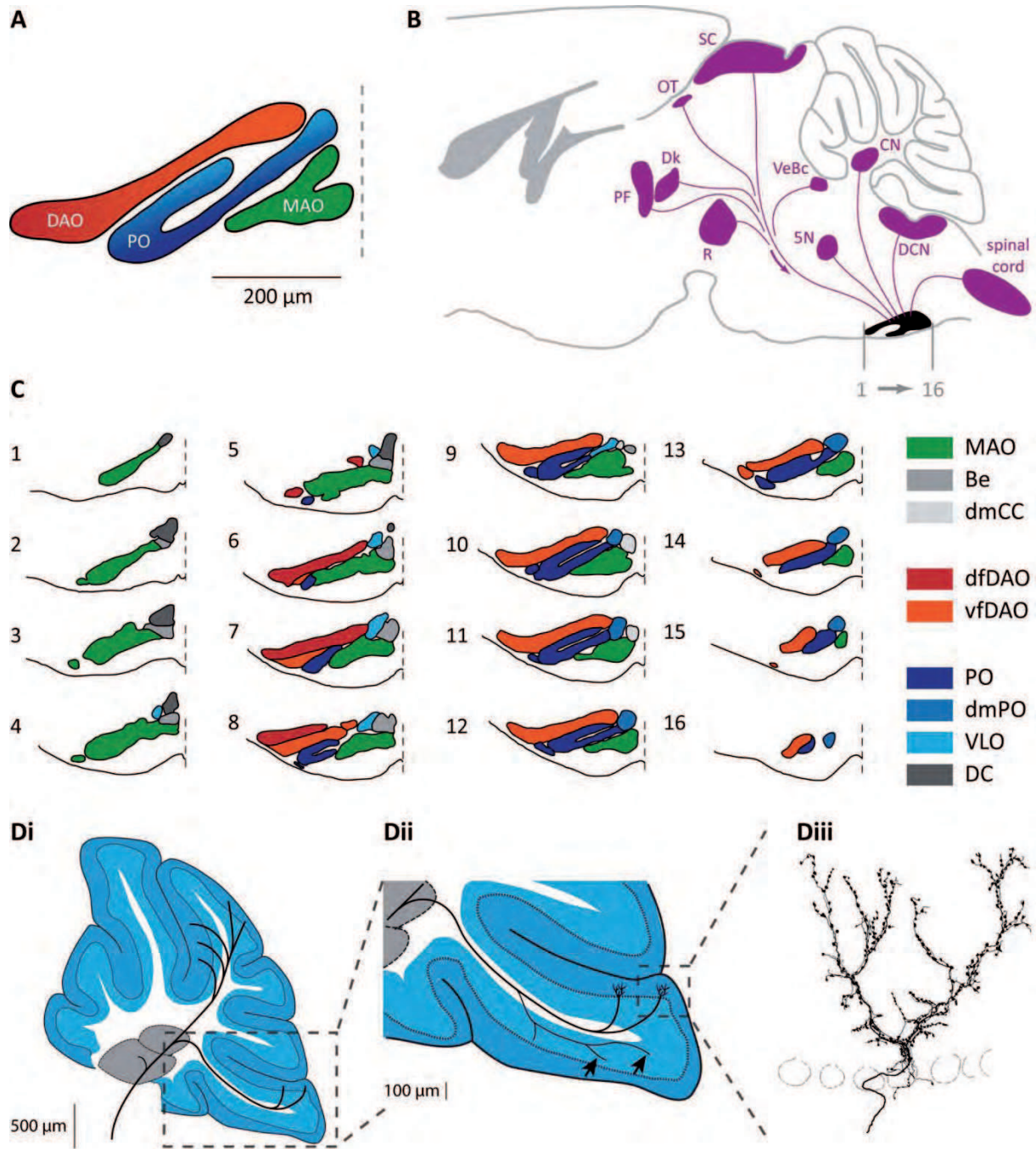


Figure 5 : Organisation de l'olive inférieure. **A** : Présentation simplifiée de l'olive inférieure en coupe coronale. **B** : Représentation des afférences olivaires. **C** : Détail des subdivisions olivaires lors de sections coronales sériées dans le sens caudal (1) vers rostral (16) avec 160 μm d'intervalle. Les pointillés symbolisent la ligne médiane. Adapté de Ruigrok, 1997. **D** : Projection d'une fibre grimpante dans le cervelet. **Di** : On distingue 7 branches projetant dans le cortex et une collatérale dans les noyaux cérébelleux. **Dii** : Représentation des fibres grimpantes dans la couche moléculaire (bleu foncé) et des collatérales de l'axone olivaire dans la couche granulaire (bleu clair) indiquées par les flèches. **Diii** : Reconstruction d'une fibre grimpante - les traces grisées indiquent les corps cellulaires des cellules de Purkinje. D'après Sugihara et Sihnodea, 2004.

Abréviations : Pannel B : 5N = motor trigeminal nucleus ; CN = cerebellar nucleus ; DCN = column dorsal nuclei ; Dk = nucleus of Darkschewitsch ; OT = nucleus of the optical tract ; PF = parafascicular thalamus nucleus ; R = red nucleus ; SC = superior colliculus ; VeBc = Vestibulocerebellar nucleus.

Abréviations : Pannel A/C : Be = Beta subnucleus ; DAO = dorsal accessory olive ; DC = dorsal cap ; dfDAO = dorsal fold of the DAO ; dmCC = dorsomedial cell column ; dmPO = dorsomedial groupe of the PO ; MAO = medial accessory olive ; PO = principal olive ; vfDAO = ventral fold of the DAO ; VLO = ventrolateral outgrowth.

1.1.2. Voie moussue nucléo-cérébelleuse

Il existe également une projection moussue de type *feedback* provenant des noyaux cérébelleux (Trott et al., 1998a, 1998b). Cependant, cette connexion n'apporte pas d'informations extérieures au cervelet.

1.2. La voie des fibres grimpantes

L'olive inférieure est une structure bien définie divisible en différentes sous unités dans la partie ventrale du tronc cérébral caudal (figure 4B). La plupart des études sur l'anatomie bulbaire suit la description initialement faite par Kooy qui divise le complexe olivaire des mammifères en 3 parties (figure 5A & C) : l'olive principale (PO), l'olive accessoire dorsale (DAO) et l'olive accessoire médiale (MAO). Il existe en plus 4 autres petites sous-divisions (figure 5C) : le chapeau dorsal (DC), l'excroissance ventrolatérale (VLO), la colonne de cellule dorso-médial (dmCC) et le noyau bêta (Be) (Kooy, 1916; Ruigrok, 2004). Une nomenclature différente a également été proposée par Altman et Bayer, basée sur le développement et l'organisation des connexions olivo-cérébelleuses (Altman and Bayer, 1987).

Des informations multiples provenant à la fois de structures spinales et supra-spinales sont acheminées vers l'olive inférieure. Cette dernière reçoit ainsi, outre les entrées spino-olivaires, des afférences des noyaux vestibulaires, des noyaux du trijumeau et du tectum (Van Ham and Yeo, 1992). Les informations cérébrales sont majoritairement issues du cortex sensorimoteur et sont acheminées soit directement, soit via des structures relais (figure 5B). Cependant, malgré une bonne connaissance générale, peu d'études détaillent précisément l'organisation des afférences de l'olive inférieure.

Les projections olivaires sont glutamatergiques et se font principalement sur l'arbre dendritique des cellules de Purkinje au niveau de la couche moléculaire (figure 5D). L'axone d'une cellule olivaire se divise pour aller faire contact avec plusieurs cellules de Purkinje (Armstrong et al., 1973), ces branches respectent une orientation parasagittale (figure 5Di) et très occasionnellement médiolatérale. Les collatérales des fibres grimpantes se font majoritairement dans la substance blanche et occasionnellement dans la couche granulaire (Sugihara et al., 1999). Le rapport entre le nombre de fibres grimpantes et le nombre de cellules de Purkinje serait de 1:7 chez le rat (Schild, 1970; Sugihara et al., 2001), de 1:9 à 1:11 chez le chat (Escobar et al., 1968; Mlonyeni, 1973) et de 1:15 chez l'homme (Escobar et al., 1968). Cette ramification se fait de façon controlatérale et peut couvrir plusieurs lobes cérébelleux. Chez les souris adultes, il existe également des collatérales "fines" projetant dans la couche granulaire (figure 5Dii) et pour lesquelles peu de connaissances existent aussi bien sur le plan anatomique que fonctionnel (Van der Want et al., 1989; Sugihara et al., 1999).

Dans les cas d'atteintes de l'olive inférieure ou des fibres grimpantes, les troubles qui en résultent sont très similaires à ceux observés pour les atteintes cérébelleuses. L'activité de l'olive inférieure est dépendante de paramètres variés comme par exemple le contexte sensoriel (Porrill et al., 2004), les situations de nouveautés et d'apprentissages moteurs (Llinás et al., 1975; Gilbert and Thach, 1977) ou encore lors d'occurrences d'erreurs dans le mouvement (Andersson and Armstrong,

1987; Kitazawa et al., 1998). Une description plus fine de l'anatomie et des fonctions olivaires sera faite plus loin dans ce manuscrit.

2. LE CORTEX CEREBELLEUX

Le cortex cérébelleux est caractérisé par la très grande répétition d'un même circuit élémentaire commun à tous les mammifères et dont on connaît l'anatomie en détail depuis plus d'un siècle (figure 6A). Il est divisé en trois couches - couche granulaire, couche des cellules de Purkinje et couche moléculaire - ayant une homogénéité cytoarchitecturale entre les différents lobules. Il y a sept types de neurones bien définis morphologiquement et répartis au travers des trois couches du cortex (figure 6B).

La couche granulaire, la plus interne du cortex cérébelleux, est composée des cellules en grains, des cellules de Golgi et des cellules de Lugaro. Il existe également une sous-population de neurones, les cellules unipolaires en brosse, présents uniquement dans les lobules postérieurs. Chez le rat, l'épaisseur moyenne de la couche granulaire a été évaluée à 149 μm (Harvey and Napper, 1991).

Les corps cellulaires des cellules de Purkinje forment la couche intermédiaire du cortex cérébelleux. Les cellules de Purkinje envoient leurs axones à travers la couche granulaire et projettent leurs dendrites suivant l'axe parasagittal dans la couche moléculaire.

La couche moléculaire contient les cellules en étoile et les cellules en panier. Elle constitue la couche la plus externe du cortex et mesure, chez le rat, environ 225 μm (Harvey and Napper, 1991). On y trouve également les fibres parallèles – axones des cellules en grains – ainsi que les dendrites des cellules de Purkinje et de Golgi (figure 6B).

2.1. Projections des fibres moussues et grimpantes dans le cortex cérébelleux

Le traitement de l'information dans le cortex cérébelleux commence par la mise en jeu d'une double entrée excitatrice. Ces informations entrantes sont acheminées, via des voies directes et indirectes, jusqu'aux cellules de Purkinje qui constituent l'unité de traitement principal du cortex cérébelleux. La voie directe est constituée par les fibres grimpantes qui contactent les cellules de Purkinje et la voie indirecte par les fibres moussues qui leur transmettent l'information via un réseau neuronal dont les premiers relais sont les cellules en grain.

Une fibre grimpante va former des synapses glutamatergiques sur une cellule de Purkinje et va, par transmission volumique du neurotransmetteur, induire une excitation des interneurons de la couche moléculaire (Szapiro and Barbour, 2007). Les fibres grimpantes évoquent un potentiel d'action spécifique aux cellules de Purkinje dénommé *complex spike* (CS).

Les fibres moussues, malgré leurs origines variées, partagent des caractéristiques morphologiques communes. Elles projettent dans la couche granulaire en formant des structures larges appelées glomérules. Ces synapses constituent une entrée excitatrice massive sur les neurones

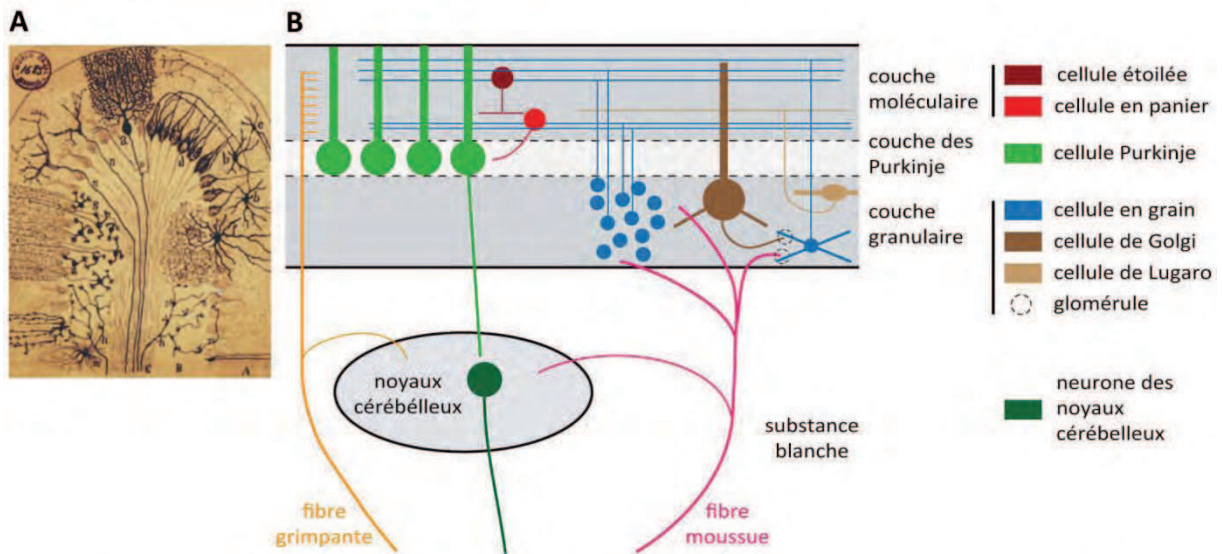


Figure 6 : Organisation des neurones cérébelleux. **A :** Schéma du cortex cérébelleux, de ses afférences et de ses éfférences, proposé par Santiago Ramon y Cajal (1899). **B :** Représentation schématisée des types cellulaires présents dans le cervelet. *Note :* les dendrites des interneurons de la couche moléculaire et des neurones des noyaux cérébelleux ne sont pas représentés. Les cellules unipolaires en brosse, les cellules globulaires et les cellules en chandelier ne figurent pas sur ce schéma.

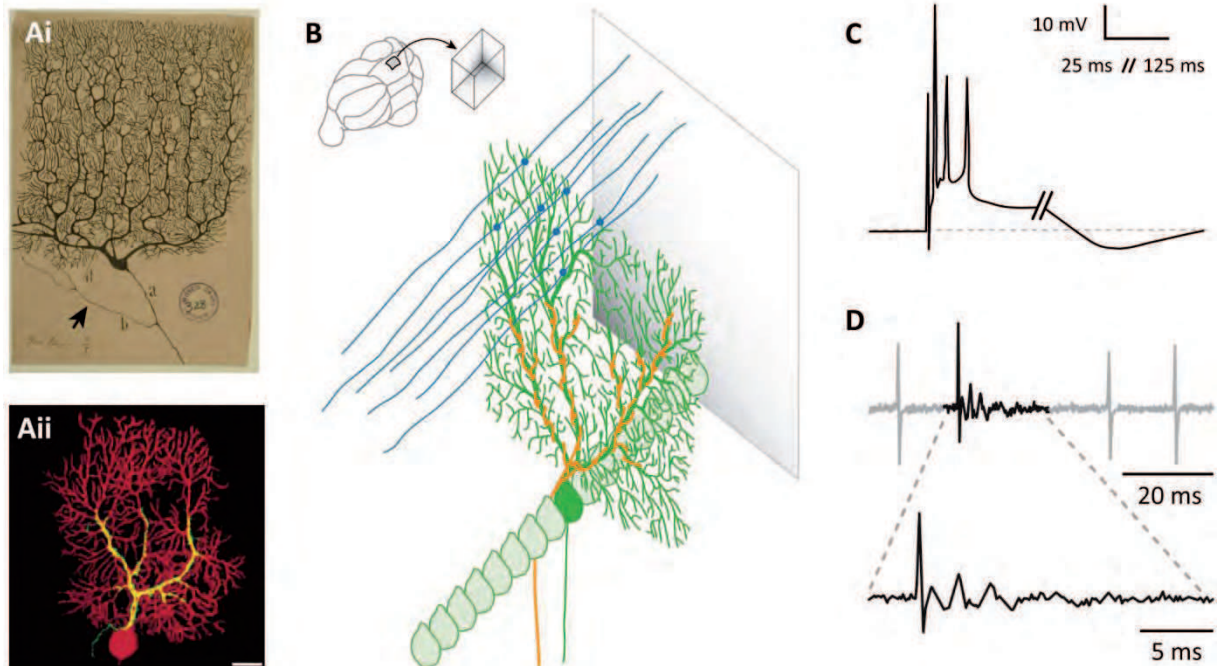


Figure 7 : La cellule de Purkinje. **Ai :** Cellule de Purkinje issue des travaux de Santiago Ramon y Cajal (1899) - la flèche indique la collatérale de l'axone qui reste dans le cortex cérébelleux. **Aii :** Remplissage d'une cellule de Purkinje (en rouge) et de la fibre grimpante qui lui est associée (en vert) - jaune = colocalisation. **B :** Représentation tridimensionnelle d'une cellule de Purkinje et de ses deux entrées excitatrices - la fibre grimpante (orange) et les fibres parallèles (bleu). **C :** Enregistrement électrophysiologique *in vitro* en configuration *current clamp* d'un CS - Notez le plateau de dépolarisation ainsi que l'hyperpolarisation très longue qui le suit (attention au changement d'échelle). Adapté de De Zeeuw, 2011. **D :** Enregistrement juxta-cellulaire *in vivo* de l'activité SS (en gris) et CS (en noir).

en grain, mais également sur les cellules de Golgi. Les cellules en grain activent, via les fibres parallèles situées dans la couche moléculaire, les cellules de Purkinje, les interneurons de la couche moléculaire et les cellules de Golgi (figure 6B).

2.2. Cellules de Purkinje

Etant la seule voie de sortie du cortex cérébelleux, la cellule de Purkinje joue un rôle fondamental dans l'intégration et l'acheminement des informations cérébelleuses. Elle est le lieu de convergence de toute l'information qui arrive dans le cervelet. La compréhension des processus qui régulent l'activité des cellules de Purkinje est donc centrale pour le décryptage du traitement de l'information cérébelleuse.

2.2.1. Morphologie

La cellule de Purkinje est le premier neurone du cervelet à se développer. Son apparition se situe entre E10 et E13 chez la souris (Miale and Sidman, 1961). Elles sont au nombre de 220 000 dans le cortex cérébelleux d'une souris (Harvey and Napper, 1991) et de 338 000 chez le rat. Les cellules de Purkinje sont de grands neurones GABAergiques – le corps cellulaire fait environ 15 µm chez la souris – dont les axones myélinisés forment l'unique voie de sortie du cortex dirigée sur les noyaux cérébelleux et vestibulaires (Chan-Palay et al., 1979). L'arborisation dendritique de la cellule de Purkinje s'étend en deux dimensions suivant l'axe parasagittal (figure 7A & B), sur toute la hauteur de la couche moléculaire et sur 250 µm de large chez le rat (Palay and Chan-Palay, 1974). Son épaisseur selon l'axe transversal est de 15 à 20 µm. Un tronc dendritique principal, parfois deux, s'élève du pôle apical de la cellule, donnant quelques dendrites primaires qui se ramifient en dendrites secondaires. De ces troncs secondaires naît une arborisation tertiaire fine et multiple, couverte de milliers d'épines dendritiques recevant les entrées des fibres parallèles (Palay and Chan-Palay, 1974).

Cette disposition particulière de l'arbre dendritique s'oriente perpendiculairement au faisceau transverse des fibres parallèles formées par les axones des cellules en grain (figure 7B). Chaque cellule de Purkinje est ainsi traversée par plusieurs centaines de milliers de fibres parallèles (Harvey and Napper, 1991) produisant 170 000 potentielles entrées synaptiques de cellules en grain (Napper and Harvey, 1988a). Chaque cellule de Purkinje est contactée par une unique fibre grimpante qui s'enveloppe autour des troncs dendritiques primaires et secondaires (figure 5Diii, 7Aii & 7B) formant des centaines de sites de libérations (Palay and Chan-Palay, 1974; Crepel et al., 1981). Sur le plan développemental, il y a initialement une innervation multiple des cellules de Purkinje par les fibres grimpantes qui régresse durant les 3 premières semaines post-natales pour devenir une mono-innervation (Crepel and Mariani, 1976; Watanabe and Kano, 2011). Les interneurons de la couche moléculaire font des contacts inhibiteurs sur l'arbre dendritique et le corps cellulaire des cellules de Purkinje.

L'axone des cellules de Purkinje émet également des collatérales (figure 7Ai) dans le cortex cérébelleux qui contacteraient les autres cellules de Purkinje (Ramon y Cajal, 1911; Palay and Chan-Palay, 1974; Orduz and Llano, 2007; Bornschein et al., 2013), les cellules de Lugaro et de Golgi (Palay

and Chan-Palay, 1974; Hawkes and Leclerc, 1989) mais aussi potentiellement les interneurons de la couche moléculaire (Palay and Chan-Palay, 1974; King and Bishop, 1982; O'Donoghue et al., 1989). Ces connexions se répartissent majoritairement selon l'axe parasagittal. Il semble également que, dans certaines conditions, les collatérales peuvent s'étendre dans l'axe médio-latéral sur de courtes distances (Hawkes and Leclerc, 1989; Sugihara et al., 2009).

2.2.2. Physiologie

Les cellules de Purkinje produisent deux types de potentiels d'actions, nommés respectivement simple (SS : *simple spike*) et complexe (CS), représentant une forme d'activité neuronale unique dans le système nerveux central (figure 7C & D). La fréquence de décharge de ces deux types de potentiels d'action varie en fonction de la zone d'enregistrement, du type d'anesthésie ou de l'activité comportementale en cours chez l'animal éveillé. Chez le rat et la souris anesthésiés, les CS ont une fréquence variant entre 0,2 et 1,5 Hz alors que la décharge spontanée des SS est comprise entre 20 et 60 Hz (Shin et al., 2007a, 2007b).

Un CS est généré suite à l'activation d'une fibre grimpante sur une cellule de Purkinje. Une telle libération recrute les récepteur AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozazol-4-propionate) qui induisent l'activation des canaux calciques et des canaux sodiques voltage-dépendants aboutissant à un plateau de dépolarisation dans les dendrites (figure 7C). Cette forte excitation conduit à la génération systématique d'un potentiel d'action suivi d'oscillation, ou *spikelet*, facilement identifiable. La propagation axonale d'un CS se ferait par la génération d'une "bouffée" de plusieurs potentiels d'actions sodique - 1,7 en moyenne - dans l'axone de la cellule de Purkinje (Monsivais et al., 2005). Un évènement transmis par une fibre grimpante est donc systématiquement relayé vers les noyaux cérébelleux représentant ainsi une transmission ultra-fiable de cette information. Bien que l'activité spontanée soit généralement lente, chez l'animal vigile, les CS peuvent être émis de façon rythmique à 80-120 ms d'intervalle en fonction de la tâche en cours (Sasaki et al., 1989). Cette entrée, provenant de l'olive inférieure, jouerait un rôle dans l'induction d'apprentissages moteurs (Marr, 1969; Albus, 1971; Welsh and Harvey, 1998), dans l'établissement de plasticités hétérosynaptiques, dans la transmission des signaux d'erreurs ou encore dans la régulation temporelle des activités cérébelleuses (Kitazawa et al., 1998).

Les SS des cellules de Purkinje suivent une activité spontanée et régulière à une fréquence avoisinant les 40 Hz en l'absence d'entrée synaptique (Häusser and Clark, 1997). Chez l'animal éveillé ou lors d'expériences *in vitro*, cette activité régulière est fortement modulée par les entrées excitatrices, inhibitrices (Llinás and Sugimori, 1980; Raman and Bean, 1999) et l'occurrence de CS.

Schématiquement, la voie des fibres grimpantes génère donc les CS alors que la voie des fibres moussues est impliquée dans la régulation des SS via l'activation des réseaux neuronaux du cortex cérébelleux. Cependant, il existe également une influence réciproque de ces deux types de potentiels d'actions. L'activité SS est fortement influencée par l'occurrence de CS qui induisent une pause dans la décharge des SS (figure 7D). Cette pause pourrait être induite par l'hyperpolarisation prolongée tributaire des canaux potassiques dépendant du calcium - de type BK et/ou SK - (figure 7C) (Granit and Phillips, 1956; Ebner and Bloedel, 1981; Sato et al., 1992) ou à l'activation

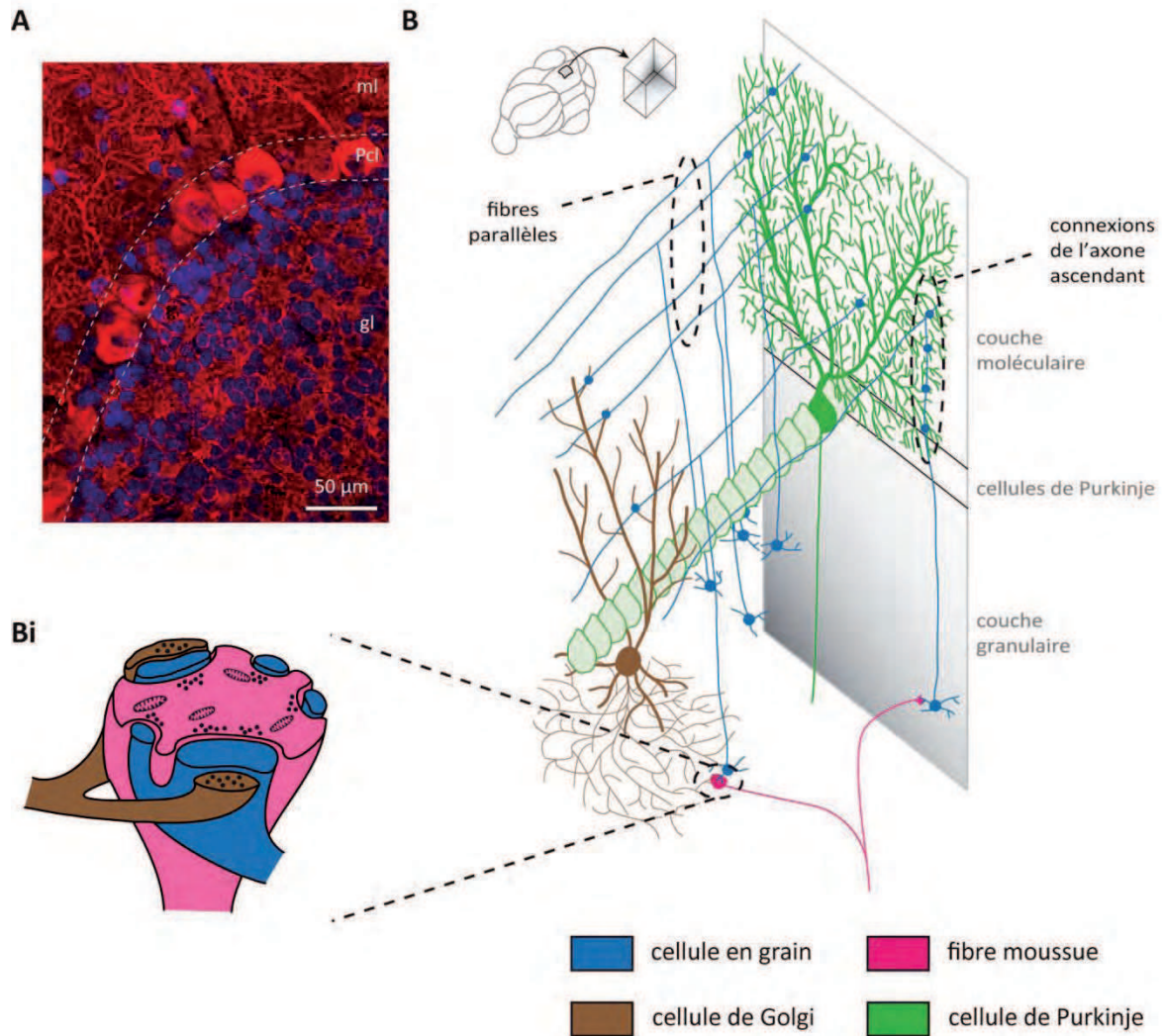


Figure 8 : Les cellules en grain. **A** : Immunohistochimie pour Draq5 (bleu) et Caveoline 1 (rouge) permettant la visualisation des cellules en grain et des cellules de Purkinje. **B** : Représentation tridimensionnelle du cortex cérébelleux. Les cellules en grain sont contactées par les fibres moussues et les cellules de Golgi au sein du glomérule (**Bi**) et projettent leur axone dans la couche moléculaire dans laquelle ils se divisent pour former les fibres parallèles. Les fibres parallèles contactent les cellules de Purkinje, les cellules de Golgi et les interneurons de la couche moléculaire (non représentés).

Abréviations : gl = granular layer ; ml = molecular layer ; Pcl = Purkinje cell layer

d'interneurones inhibiteurs locaux par conduction volumique du glutamate (Szapiro and Barbour, 2007).

2.3. Cellules en grain

Il y aurait un total de 92 millions de cellules en grain dans le cervelet d'un rat, ce qui nous amène à un ratio de 274 grains par cellule de Purkinje (Harvey and Napper, 1988). Les cellules en grain représentent le relai principal de l'information provenant des fibres moussues. Elles sont les neurones excitateurs majoritaires du cortex cérébelleux (figure 8A).

2.3.1. Morphologie

Les cellules en grain représentent environ 60% des neurones du cerveau chez la souris. La taille de leur corps cellulaire - environ 5 μm chez le rat - en fait également le plus petit neurone (Harvey and Napper, 1991). Elles reçoivent l'information par 4 à 5 dendrites courtes qui se terminent dans les glomérules formés par les rosettes des fibres moussues et les axones des cellules de Golgi (figure 8Bi). Il existe donc des entrées excitatrices provenant des fibres moussues, et inhibitrices originaires des cellules de Golgi. Le signal ainsi intégré est alors transmis par un axone qui se projette verticalement dans la couche moléculaire avant de se scinder en deux branches courant le long du folium selon l'axe médio-latéral (figure 8B). Ces axones forment un faisceau de fibres appelées "fibres parallèles" pouvant mesurer entre 4,2 et 4,7 mm chez le rat (Pichitpornchai et al., 1994). Notons que la longueur d'une fibre parallèle ne lui permet pas de passer d'un hémisphère cérébelleux à l'autre, même s'il est possible qu'elle croise la ligne médiane pour atteindre le paravermis controlatéral. L'orientation perpendiculaire de ce faisceau par rapport à l'arbre dendritique plan des cellules de Purkinje permet à une seule fibre parallèle de faire jusqu'à 800 synapses dites "en passant" sur autant de ces cellules. Des études au microscope électronique révèlent qu'il n'y aurait qu'un ou deux contacts physiques entre une fibre parallèle et les dendrites d'une cellule de Purkinje (Pichitpornchai et al., 1994). Elles font également des contacts excitateurs sur les interneurones de la couche moléculaire et les dendrites apicales des cellules de Golgi (figure 8B & 9). Cette connexion des fibres parallèles sur les cellules de Golgi entraîne donc une inhibition de type *feedback* sur les cellules en grain via les synapses formées dans le glomérule. L'axone ascendant non myélinisé des cellules en grain fait également des contacts synaptiques (figure 8B) avant de se diviser pour former les fibres parallèles (Napper and Harvey, 1988b).

2.3.2. Transmission de l'information

Les fibres parallèles sont des axones non myélinisés impliqués dans la transmission de l'information provenant des fibres moussues suivant l'axe médio-latéral. L'anatomie particulière de ces fibres qui forment des faisceaux – ou *beam* – sur plusieurs millimètres suggère une propagation de l'information sur de grandes distances (figure 8B). L'ensemble des cellules de Purkinje situées dans un même faisceau pourrait ainsi, si les connexions sont homogènes en termes de répartition et

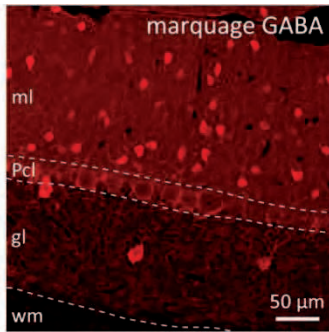


Figure 9 : Interneurones de la couche moléculaire. Immunohistochimie révélant les interneurones de la couche moléculaire et les cellules de Golgi (dans la couche granulaire). Sur le schéma, les cellules étoilées (rouge foncé) et les cellules en panier (rouge clair) reçoivent des afférences principalement des cellules en grain et font des contacts inhibiteurs sur les cellules de Purkinje. Le point d'interrogation symbolise la possible existence d'un continuum morphologique qui rend la classification de ces interneurones complexe.

Abréviations : gl = granular layer ; ml = molecular layer ; Pcl = Purkinje cell layer ; wm = white matter

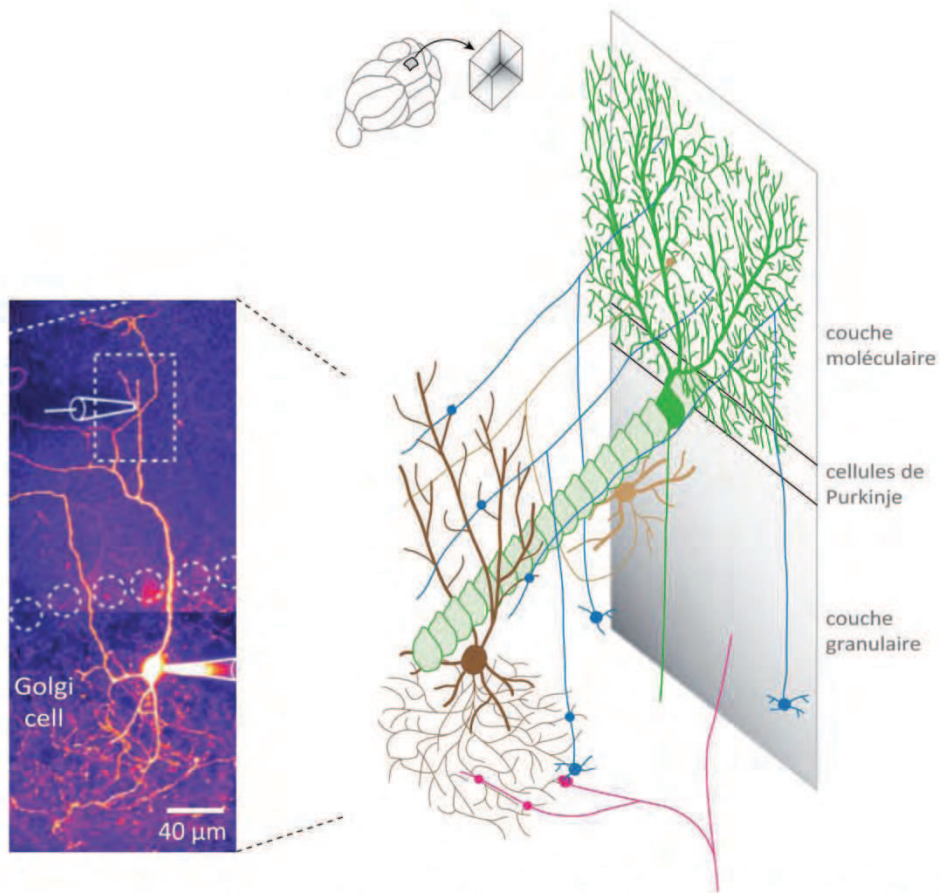
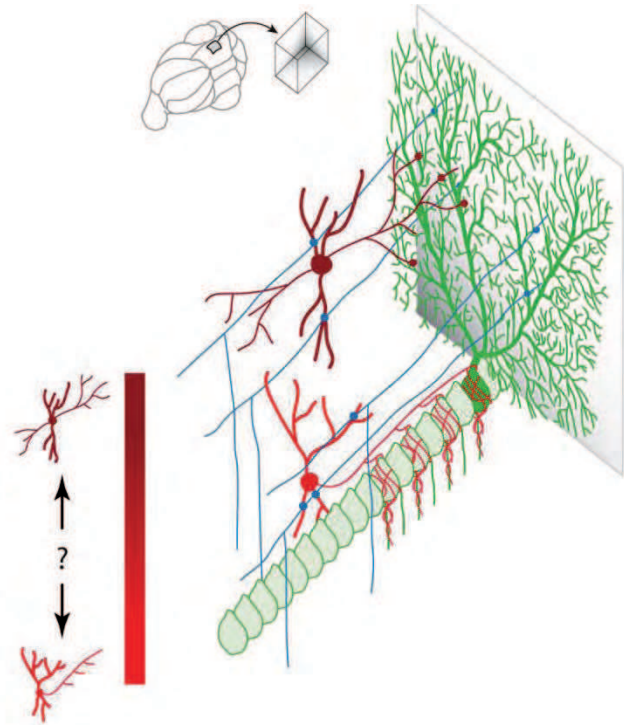


Figure 10 : Interneurones de la couche granulaire. Les cellules de Golgi (en brun foncé) reçoivent des afférences des fibres moussues et des cellules en grain soit directement par leur axone ascendant, soit via les fibres parallèles. Image issue de Vervaede et al., 2012. Les cellules de Lugaro (brun clair) projettent leur axone dans la couche granulaire puis moléculaire en contactant principalement les cellules de Purkinje. Les cellules en brosse unipolaire ne sont pas représentées.

de poids synaptique, être activé par les mêmes entrées provenant des fibres moussues. Braitenberg et Atwood, puis plus tard Eccles, proposent que cette excitation provenant des fibres parallèles active l'ensemble des cellules de Purkinje d'un même *beam* sous la forme d'une vague de dépolarisation. Cette information est ensuite propagée aux noyaux cérébelleux par la modulation des cellules de Purkinje (Braitenberg and Atwood, 1958; Eccles et al., 1967). Cette vision initiale a progressivement évolué car de telles activations n'ont pas pu être observées lors d'expérimentations *in vivo*. Subséquemment, différents travaux ont pu montrer l'existence d'activations de "patches" locaux de cellules de Purkinje lors de stimulations tactiles (Shambes et al., 1978a, 1978b). L'absence d'une activation sous forme de *beam* pourrait être expliquée par l'action des interneurones inhibiteurs de la couche moléculaire, ou encore par la présence de synapses silencieuses entre les fibres parallèles et les cellules de Purkinje (Isope and Barbour, 2002).

L'axone ascendant participe lui aussi à la transmission de l'information en faisant des synapses sur les cellules de Purkinje (Napper and Harvey, 1988b), mais aussi sur les interneurones de la couche moléculaire (Sultan and Bower, 1998) et les cellules de Golgi (Hámori, 1981). Il a été estimé que l'axone ascendant d'une cellule en grain peut faire 31 synapses sur l'arbre dendritique d'une cellule de Purkinje (Gundappa-Sulur et al., 1999). Selon la même étude, il a été proposé que 7 à 24% des synapses entre les cellules en grain et les cellules de Purkinje proviennent des contacts produits par l'axone ascendant. Même si ce chiffre est sujet à débat, cette connexion participe à la transmission de l'information des fibres moussues sur un plan local. Ce fonctionnement se place en opposition avec celui des fibres parallèles qui transforment une information locale en un long faisceau de transmission médio-latérale.

2.4. Interneurones de la couche moléculaire

Les interneurones de la couche moléculaire (figure 9), décrits initialement par Ramón y Cajal en 1911, sont les seuls neurones ayant leurs corps cellulaires situés dans cette couche. Ils sont GABAergiques et reçoivent plusieurs centaines d'entrées excitatrices des fibres parallèles (Palay and Chan-Palay, 1974). Un interneurone reçoit également entre une et vingt entrées provenant d'autres interneurones inhibiteurs de la couche moléculaire (Lemkey-Johnston and Larramendi, 1968; Llano and Gerschenfeld, 1993). En plus de ces connexions chimiques, des synapses électriques couplent également les interneurones entre eux et participent à la synchronisation de leurs activités (Mann-Metzer and Yarom, 2000; Alcami and Marty, 2013). Enfin, il existe également une activation des interneurones de la couche moléculaire via les entrées grimpantes par diffusion - ou *spillover* - du glutamate (Szapiro and Barbour, 2007).

L'orientation dendritique et axonale des interneurones suit un axe parasagittal et leur extension peut atteindre plus de 400 µm. Leurs axones contactent majoritairement les cellules de Purkinje en délivrant une inhibition de type *feedforward*. Cette organisation axo-dendritique provoque un phénomène d'inhibition des cellules de Purkinje situées de part et d'autre du *beam* de fibres parallèles actif (Eccles et al., 1967; Cohen and Yarom, 2000).

Il existe deux populations d'interneurones que l'on distingue en fonction de leur morphologie et de la position qu'ils occupent dans la couche moléculaire (figure 9). Les cellules en panier se situent dans les deux tiers inférieurs de la couche moléculaire. Leur axone s'étend

parallèlement au plan de la couche des cellules de Purkinje en formant des synapses dites "en panier" sur les corps cellulaires des Purkinje. De ce prolongement se dissocie une structure plus spécialisée, nommée pinceau, qui va s'enrouler autour du cône d'émergence de l'axone de ces mêmes neurones (Somogyi and Hámori, 1976). Du fait du petit nombre de contacts chimiques à son niveau, certains auteurs proposent que cette connexion en pinceau agirait par l'action de son potentiel de champ - phénomène de couplage éphaptique - afin d'empêcher le déclenchement de potentiels d'actions dans la cellule de Purkinje (Korn and Axelrad, 1980).

Les cellules en étoile se situent dans les deux tiers supérieurs de la couche moléculaire. Elles contactent l'arbre dendritique des cellules de Purkinje, mais ne possèdent pas de synapses en panier. Cette vision de deux sous-populations neuronales est souvent mise en opposition avec la possibilité d'un continuum morphologique entre les cellules étoilées et les cellules en panier (figure 9) (Ramon y Cajal, 1911; Sultan and Bower, 1998). En plus des collatérales de Purkinje et des connexions des cellules de Lugaro, les interneurones de la couche moléculaire sont les entrées inhibitrices les plus nombreuses sur les cellules de Purkinje. Des enregistrements *in vitro* ont montré qu'une cellule de Purkinje recevrait en moyenne des entrées de 9 interneurones (Häusser et al., 2004).

2.5. Les interneurones de la couche granulaire

2.5.1. Cellules de Golgi

Les cellules de Golgi, décrites par Camillo Golgi en 1874 grâce aux révélations au nitrate d'argent, sont les interneurones inhibiteurs majoritaires de la couche granulaire (figure 10). Des études en microscopie électronique faites par Palay et Chan-Palay ont permis d'établir que les cibles majoritaires des cellules de Golgi sont les cellules en grain. L'arbre somato-dendritique des cellules de Golgi est divisé en deux classes identifiables : les dendrites baso-latérales, qui restent dans la couche granulaire et sont connectées par les fibres moussues via des synapses "en passant", et les dendrites apicales, qui remontent dans la couche moléculaire et sont contactées par les fibres parallèles (figure 10) (Dieudonne, 1998; Kanichay and Silver, 2008). Des études montrent également que des connexions récurrentes entre les cellules de Golgi peuvent s'établir (Hull and Regehr, 2012). Enfin, les cellules de Golgi sont également couplées entre elles par des synapses électriques – ou *gap junction* – au niveau de la base des dendrites apicales (Dugué et al., 2009).

Les caractérisations moléculaires et morphologiques montrent l'existence de plusieurs sous-type de cellule de Golgi (Simat et al., 2007). Ces cellules peuvent exprimer alternativement le GABA (acide γ -aminobutyrique) (Ottersen et al., 1987), la glycine (Wilkin et al., 1981) ou les deux dans 70 % des cas. Une différenciation peut également être faite selon leur morphologie ou encore le type de récepteurs métabotropique du Glutamate qu'elles expriment (Simat et al., 2007). Le plexus axonal de la cellule de Golgi est extrêmement dense et s'étend sur un grand volume de la couche granulaire. L'arbre dendritique et l'axone présentent une orientation préférentielle suivant le plan parasagittal (Barmack and Yakhnitsa, 2008; Sillitoe et al., 2008). Au niveau des glomérules, les fibres moussues produisent une activation axo-axonique sur les Golgi entraînant une modulation de l'activité synaptique des cellules en grain (figure 8Bi & 10). Les cellules de Golgi jouent ainsi un rôle limitant

dans la propagation de l'information entrante au niveau spatial et temporel. Selon une étude récente, les cellules de Golgi ne seraient pas contactées par les interneurons de la couche moléculaire, permettant ainsi de procéder à un traitement de l'information séparé des cellules de Purkinje pour une même entrée granulaire (Hull and Regehr, 2012).

2.5.2. Cellules de Lugaro

Les cellules de Lugaro se situent dans la partie externe de la couche granulaire à proximité des cellules de Purkinje (figure 10). Leurs dendrites se projettent parallèlement à la couche des cellules de Purkinje en suivant le plan horizontal. Elles possèdent deux plexus axonaux, le premier s'étendant sur de longues distances passant d'abord dans la couche granulaire puis dans la couche moléculaire selon l'axe médio-latéral, comme le font les fibres parallèles (Lainé and Axelrad, 1996), et le second, plus local, suivant l'axe parasagittal (figure 10). Une cellule de Lugaro contacte ainsi plus de 100 cellules de Purkinje (Dieudonné and Dumoulin, 2000). Ce plexus transverse s'étendrait sur plusieurs millimètres chez le rat et contacterait également les interneurons de la couche moléculaire et les cellules de Golgi (Fox, 1959; Dieudonné and Dumoulin, 2000). Cependant, bien que sa première description anatomique remonte à plus d'un siècle, ce neurone a fait l'objet de peu d'études fonctionnelles et est ainsi trop peu souvent intégré aux schémas et modèles cérébelleux.

2.5.3. Cellules unipolaires en brosse

Ces cellules unipolaires en brosse, qui ne sont présentes qu'au niveau du vestibulo-cervelet - lobe flocculo-nodulaire, uvula et paraflocculus ventral - , sont des interneurons excitateurs contactés par les fibres moussues (Altman and Bayer, 1977; Nunzi et al., 2002). Leur axone est connu pour faire des synapses sur les cellules en grain situées à proximité (Nunzi et al., 2001). Mugnaini et collaborateurs leur prêtent une fonction d'amplification du signal des fibres moussues (Mugnaini et al., 2011).

2.5.4. Populations d'interneurones minoritaires

Il existe également des populations neuronales minoritaires situées dans la partie la plus externe de la couche granulaire et dans la couche des cellules de Purkinje. Les cellules globulaires sont de petits interneurons inhibiteurs (Lainé and Axelrad, 2002) recevant des afférences excitatrices des fibres moussues et inhibitrices des collatérales de Purkinje (Hirono et al., 2012). Les cellules en chandelier - ou *candelabrum* - (Lainé and Axelrad, 1994), majoritairement situées dans la couche des cellules de Purkinje, envoient leur axone dans les couches moléculaires et synthétisent à la fois des neurotransmetteur GABA et glycine (Schilling et al., 2008). Ces deux neurones, encore mal caractérisés sur le plan morphologique et physiologique, ne sont pratiquement jamais intégrés aux schémas et modèles cérébelleux.

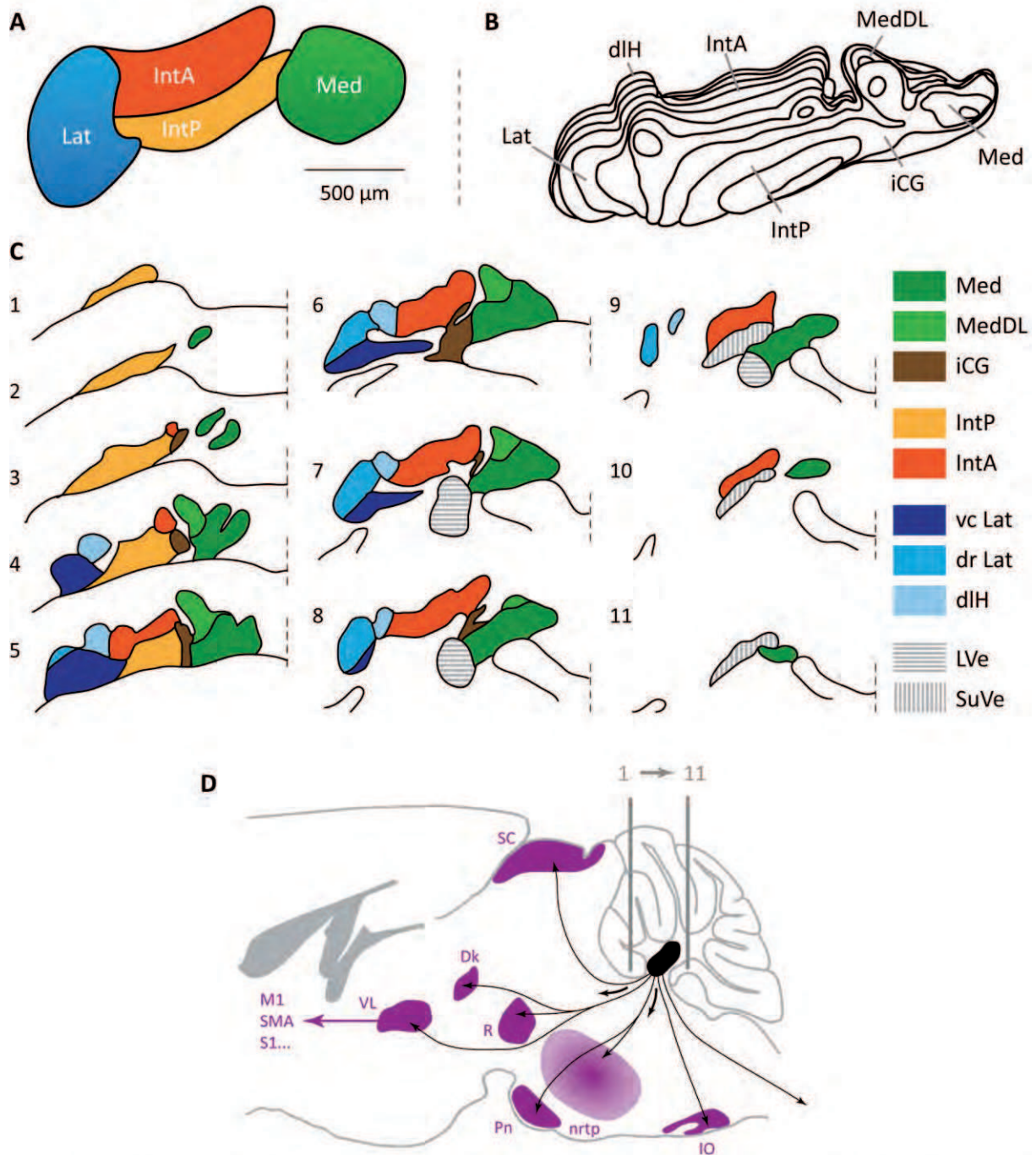


Figure 11 : Organisation des noyaux cérébelleux. **A** : Présentation simplifiée des noyaux cérébelleux en coupe coronale. **B** : Représentation tridimensionnelle des noyaux cérébelleux - utilisation de courbes isoformes. Adapté de Sugihara et Shinoda, 2007. **C** : Détail des subdivisions nucléaires lors de sections coronales sériées dans le sens caudal (1) vers rostral (11) avec 160 μm d'intervalle. Les pointillés symbolisent la ligne médiane. Adapté de Ruigrok, 1997. **D** : Représentation des efférences olivaires.

Abréviations : Pannel A-C : dIH = dorsolateral hump ; dr Lat = dorsolateral part of the lateral cerebellar nucleus ; iCG = interstitial cell groups ; IntA = anterior interposed nucleus ; IntP = posterior interposed nucleus ; Lat = lateral cerebellar nucleus ; LVe = lateral vestibular nucleus ; Med = medial cerebellar nucleus ; MedDL = dorsolateral protuberance ; SuVe = superior vestibular nucleus ; vc Lat = ventrocaudal part of the lateral cerebellar nucleus.

Abréviations : Pannel D : Dk = nucleus of Darkschewitsch ; IO = inferior olivary nucleus ; M1 = primary motor cortex ; nrtp = nucleus reticularis pontis ; Pn = Pontine nuclei ; R = red nucleus ; S1 = primary sensori-motor cortex ; SC = superior colliculus ; SMA = supplementary motor area ; VL = ventrolateral thalamic nucleus.

3. EFFERENCES CEREBELLEUSES : NOYAUX CEREBELLEUX ET VESTIBULAIRES

Les noyaux cérébelleux et vestibulaires constituent l'unité finale d'intégration des circuits cérébelleux et représentent l'unique voie de sortie du cervelet. De par leur position et les afférences qu'ils reçoivent, ils jouent un rôle central dans l'intégralité des fonctions cérébelleuses.

3.1. Organisation et afférences

3.1.1. Noyaux cérébelleux

Les noyaux cérébelleux ont été identifiés dans toutes les classes de vertébrés (Nieuwenhuys et al., 1998). Chez la souris, ils sont constitués des noyaux médiaux, interposés (antérieur et postérieur) et latéraux (figure 11A, B & C). Chez l'homme, les mêmes noyaux portent le nom de fastigial, interposés (emboliforme et globuleux) et dentelé.

Les noyaux cérébelleux sont majoritairement contactés par les cellules de Purkinje qui, par leur activité spontanée, produisent un barrage inhibiteur constant sur cette structure. Ces entrées corticales sont organisées et convergent sur les différents noyaux. Une partie des fibres moussues et grimpantes émet des collatérales qui projettent dans ces structures en produisant des entrées excitatrices. Elles suivent également une organisation topographique qui sera détaillée dans les parties III et IV de cette introduction.

Le ratio entre les cellules de Purkinje et les neurones des noyaux cérébelleux est d'environ 11:1 (Caddy and Biscoe, 1979; Harvey and Napper, 1991; Heckroth, 1994). Au niveau synaptique, une cellule de Purkinje va contacter environ 35 cellules des noyaux cérébelleux (Palkovits et al., 1977). Cependant, la répartition du nombre de synapses est très hétérogène et une cellule de Purkinje ciblerait majoritairement entre 3 et 6 neurones des noyaux cérébelleux (Sugihara et al., 2009). A l'inverse, un neurone des noyaux cérébelleux serait contacté par un nombre de cellules de Purkinje variant d'une dizaine à plusieurs centaines de connexions selon les estimations (Palkovits et al., 1977; Sugihara et al., 2009). Il y a donc à la fois convergence et divergence de l'information des cellules de Purkinje dans les noyaux cérébelleux (Person and Raman, 2012a).

3.1.2. Noyaux vestibulaires

Les cellules de Purkinje du flocculus, du nodulus et du lobe antérieur projettent dans les noyaux vestibulaires latéraux et médiaux situés dans le tronc cérébral (Tan et al., 1995; Voogd et al., 1996). Ces structures reçoivent également des collatérales des fibres moussues et des fibres grimpantes (figure 11C).

3.2. Efferences

Trois populations neuronales ont été identifiées au sein des noyaux profonds cérébelleux. La première est excitatrice (Glutamatergique) et est constituée de neurones de projection. La seconde, moins étudiée, est une voie de projection glycinergique. La troisième, composée de neurones GABAergiques, effectue un *feedback* inhibiteur dirigé sur l'olive inférieure (Uusisaari et al., 2007; Uusisaari and Knöpfel, 2008). Les neurones Glutamatergiques et GABAergiques, même s'ils présentent des propriétés électrophysiologiques différentes, sont spontanément actifs à la fois *in vivo* et *in vitro* (Uusisaari et al., 2007).

3.2.1. Neurones de projections

Les cellules excitatrices de projection des noyaux cérébelleux ciblent principalement les noyaux du pont (Cicirata et al., 1982), le cortex moteur – à travers un relai dans le thalamus ventrolatéral (Haroian et al., 1981) –, les noyaux rouges (Daniel et al., 1987) et le complexe vestibulaire (figure 11D).

- Les noyaux interposés antérieurs projettent vers les noyaux rouges et le cortex moteur primaire via le thalamus (Wiesendanger and Wiesendanger, 1985; Hoover and Strick, 1999). Ils sont impliqués dans les processus de contrôle des mouvements squelettiques ipsilatéraux à travers les tractus rubro-spinaux et cortico-spinaux.
- Les noyaux interposés postérieurs et la partie caudale des noyaux latéraux représentent les voies de sorties cérébelleuses impliquées dans les processus visuo-moteurs (Lynch et al., 1994). Ils projettent massivement vers les zones du traitement visuel via les colliculi supérieurs (May et al., 1990) ainsi que vers les noyaux rouges et les noyaux de Darkschewitsch. Ces noyaux cérébelleux contactent également, via le thalamus, les aires motrices, pré-motrices et sensorielles primaires (Clower et al., 2001; Middleton and Strick, 2001).
- La partie caudale du noyau médial va majoritairement contacter les centres oculomoteurs (Kyuhou and Kawaguchi, 1987) après un relai dans le thalamus ainsi que les colliculi supérieurs. Le noyau médial va également contacter les noyaux du pont.
- Les neurones de la partie rostrale des noyaux latéraux sont somatotopiquement organisés (van Kan et al., 1993) et projettent suivant cette même structuration vers les aires motrices primaires (Orioli and Strick, 1989; Hoover and Strick, 1999), mais aussi vers les aires pré-motrices (Akkal et al., 2007). Ils contactent également les noyaux rouges, mais pas le colliculus supérieur. L'implication de la partie rostrale des noyaux latéraux se fait donc essentiellement sur le système de contrôle des muscles squelettiques (figure 11D).

La majorité de ces observations fonctionnelles provient d'études menées chez les primates et leur validité chez les rongeurs reste à prouver. Cependant, les projections anatomiques des noyaux cérébelleux observées chez la souris et le rat semblent correspondre aux descriptions faites ci-dessus (Haroian et al., 1981; Cicirata et al., 1982; Daniel et al., 1987). Ces neurones de projection ciblent donc des structures fortement impliquées dans l'initiation et la régulation des mouvements, donnant ainsi un rôle central à cette voie de projection au sein des processus moteurs.

Bien que l'immense majorité de ces neurones soit excitatrice - glutamatergique - , une étude récente a permis de déceler l'existence de neurones de projections nucléaires inhibiteurs. Bagnall et collaborateurs ont, à l'aide de souris transgéniques exprimant la GFP (*green fluorescence protein*) dans les neurones glycinergiques, démontré l'existence de projections inhibitrices partant du noyau cérébelleux médial en direction des noyaux vestibulaires et réticulaires ipsilatéraux (Chen and Hillman, 1993; Bagnall et al., 2009). A l'inverse des autres neurones des noyaux cérébelleux, les cellules glycinergiques ne sont pas spontanément actives (Uusisaari and Knöpfel, 2011).

3.2.2. Connexions inhibitrices sur l'olive inférieure

Il existe également une projection contralatérale des noyaux cérébelleux qui cible l'olive inférieure (figure 11D) par un sous-ensemble de neurones GABAergiques (Ruigrok and Voogd, 1990). Ces neurones de projections nucléaires constituent l'entrée inhibitrice majeure de l'olive inférieure et jouent un rôle important dans le contrôle des activités de cette structure (Hesslow, 1986; Ruigrok and Voogd, 1995). Sur le plan anatomique, il existe donc une boucle nucléo-olivaire constituée de ces projections et du retour par les collatérales des fibres grimpances (Sugihara and Shinoda, 2007). Les projections nucléo-olivaires ont été observées chez de nombreuses espèces comme l'opossum (Dom et al., 1973), le chat (Beitz, 1976), le singe (Chan-Palay et al., 1977) et le rat (Angaut and Cicirata, 1982). La voie nucléo-olivaire constitue l'un de nos centres d'intérêt et sera abordée plus en détails dans la partie IV de l'introduction.

3.2.3. Régulation et décharge des noyaux cérébelleux

Les enregistrements *in vivo* et *in vitro* des neurones des noyaux cérébelleux ont montré que les cellules Glutamatergiques et GABAergiques présentent une activité spontanée d'environ 35 à 55 Hz sous contrôle de courants cationiques toniques (Thach, 1968; LeDoux et al., 1998; Raman et al., 2000; Rowland and Jaeger, 2005). L'activité spontanée des neurones Glutamatergiques semble supérieure à celle des cellules GABAergiques (Uusisaari and Knöpfel, 2011). Cependant, l'existence de différentes sous-populations GABAergiques et Glutamatergiques, rarement différenciées dans les études, demande d'interpréter ces résultats avec prudence.

Les synapses des cellules de Purkinje sur les noyaux cérébelleux sont rapidement déprimées (Telgkamp and Raman, 2002; Pedroarena and Schwarz, 2003). Cette caractéristique implique que l'inhibition, ou la modulation des neurones de cette structure nécessite la synchronisation de l'activité des cellules de Purkinje convergentes. De nombreux auteurs ont pu observer un rebond de dépolarisation dans les noyaux cérébelleux faisant suite à une forte inhibition de l'activité induite par une stimulation des cellules de Purkinje (Gruart et al., 1994; Sánchez-Campusano et al., 2009; Hoebeek et al., 2010; De Zeeuw et al., 2011). Cependant, cette vision fait l'objet d'un débat et certains auteurs postulent que l'activité des noyaux cérébelleux est finement contrôlée par la synchronisation de décharges des cellules de Purkinje (Person and Raman, 2012b).

Lors de stimulations de la substance blanche ou du cortex, l'enregistrement des noyaux cérébelleux montre une séquence "excitation-inhibition" attribuée à l'activation des collatérales des

fibres grimpantes et moussues pour l'EPSP (*excitatory postsynaptic potential*) suivi de l'activation des cellules de Purkinje pour l'IPSP (*inhibitory postsynaptic potential*) (Llinás and Mühlethaler, 1988). Les connexions provenant des collatérales des fibres grimpantes et des fibres moussues sont donc à même de réguler l'activité des neurones des noyaux cérébelleux (Blenkinsop and Lang, 2011).

Il existe donc deux voies d'entrées du cervelet qui agissent séparément sur l'activité corticale et sur les noyaux cérébelleux. Les fibres grimpantes induisent les CS dans les cellules de Purkinje et modulent l'activité des interneurons de la couche moléculaire situés à proximité de leurs sites de libérations. Les fibres moussues agissent principalement sur les réseaux corticaux qui filtrent et traitent l'information avant de la transmettre aux cellules de Purkinje en aboutissant ainsi à la modulation de leur activité SS. Les axones des cellules de Purkinje convergent alors vers les neurones des noyaux cérébelleux qui sont également contactés par les collatérales des fibres moussues et grimpantes.

PARTIE III : ORGANISATION MODULAIRE DU CORTEX CEREBELLEUX

Brodman a pu montrer l'existence de limites anatomiques et fonctionnelles en étudiant les variations d'épaisseurs des 6 couches du cortex cérébral aboutissant à une classification en 52 aires corticales. Les mêmes études appliquées aux couches granulaires et moléculaires dans le cervelet ont permis d'observer une variation d'épaisseur entre les *gyri* et les *sulci*. Cependant, ces changements n'ont pas permis l'établissement d'une cartographie fonctionnelle comme celle de Brodman (Braitenberg and Atwood, 1958; Nishiyama and Linden, 2004). Nous avons également vu que, hormis la présence des cellules unipolaires en brosse dans les lobules postérieurs (Altman and Bayer, 1977), le cortex cérébelleux ne présente pas de segmentation cytoarchitecturale évidente.

L'organisation anatomo-fonctionnelle du cervelet se basant sur la division en vermis, paravermis et hémisphères - selon l'axe médio-latéral - ou en vestibulo-, spino- et cérébro-cervelet ne permet pas une explication fine de son implication dans le contrôle du mouvement et de la coordination motrice. Cependant, malgré l'homogénéité structurelle du cortex cérébelleux que nous venons de décrire, il existe de nombreux arguments mettant à jour une organisation compartimentée en modules fonctionnels qui participeraient au traitement de l'information.

Les notions de compartimentations fonctionnelles remontent à Luciani qui est le premier à décrire 3 symptômes cérébelleux. En 1897, Sherrington précise que des stimulations électriques du cervelet du singe provoquent une inhibition musculaire controlatérale au stimulus. Vers la fin du XIXe siècle le cervelet est caractérisé comme étant une structure nécessaire à la coordination et à la précision du mouvement. Cependant, son influence sur ces activités est toujours considérée comme globale et diffuse.

1. DECOUVERTE D'UNE SOMATOTOPIE CEREBELLEUSE

Les premières études ayant montré une organisation modulaire du cervelet se sont intéressées à la présence d'une somatotopie cérébelleuse. Dès 1906, Lodewijk Bolk suggère l'existence d'une unique carte à la surface du cortex cérébelleux. Son travail se base sur la comparaison des différentes régions cérébelleuses en fonction du stade phylogénétique des mammifères observés. Suite aux hypothèses de Bolk, les travaux de Comolli et Edinger ont permis de faire la distinction entre paléo-cervelet et néo-cervelet en s'appuyant, pour la première fois, sur la topographie des afférences cérébelleuses chez le primate (Comolli, 1910; Edinger, 1910).

L'utilisation des approches électrophysiologiques va permettre aux scientifiques de procéder à un examen plus complet de la somatotopie cérébelleuse. Edgar Adrian démontre, par l'étude des potentiels évoqués, que les informations proprioceptives et extéroceptives sont arrangées de façon somatotopique dans le lobe antérieur du cervelet (Adrian, 1943). Très rapidement après, Ray Snider et Averill Stowell mettent à jour deux nouvelles cartes somatotopiques inversées dans les lobes antérieurs et paramédians (Snider and Stowell, 1944). Ces découvertes ont largement participé à l'établissement de la théorie sur les localisations fonctionnelles cérébelleuses, rejetant le schéma proposé par Bolk 40 ans plus tôt (figure 12).

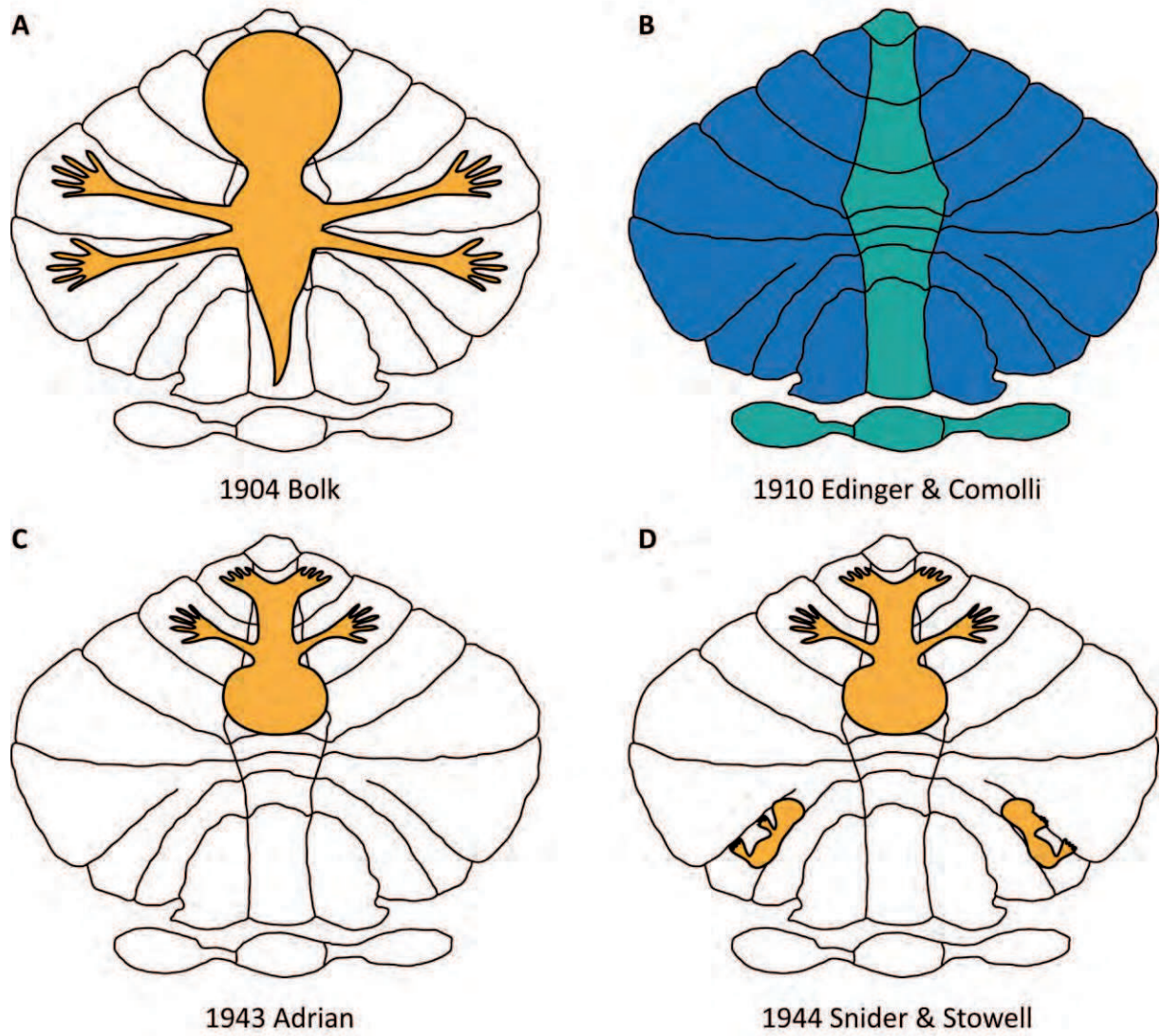


Figure 12 : Evolution de la somatotopie cérébelleuse. **A, C, D** : Propositions différentes de somatotopie cérébelleuse. **B** : Subdivision en paléocervelet (en vert) et en néocervelet (en bleu). D'après Manni et Petrosini (2004)

Les études d'imagerie fonctionnelle ont, plus récemment, permis d'étudier la somatotopie cérébelleuse chez l'homme. Grodd et collaborateurs ont ainsi pu montrer l'existence de deux *homonculi* distincts présents respectivement dans les lobes antérieurs et postérieurs (Grodd et al., 2001). Cette double représentation est très proche de la description faite chez le chat par Snider et Eldred 50 ans plus tôt (Snider and Eldred, 1951). Ces nouvelles technologies ont également permis de révéler une cartographie fonctionnelle chez l'humain qui serait dépendante de la tâche effectuée (Schlerf et al., 2010).

Cette somatotopie mise à jour dès le début du XXe siècle est un argument central de l'organisation modulaire du cervelet. Cependant, l'étendue, la forme et la répartition exactes de ces champs récepteurs sont encore controversées. L'utilisation de nouvelles méthodes d'investigation a permis de révéler une organisation modulaire bien plus précise du cortex cérébelleux sous différentes formes. On trouve ainsi dans la littérature les qualificatifs de zones, microzones, bandes, patches ou encore *blebs*. Ces classifications modulaires du cervelet sont principalement issues de l'étude anatomique et physiologique des afférences des fibres grimpantes, des fibres moussues et de l'expression restreinte de marqueurs moléculaires. Toutes ces cartographies décrivent un aspect spécifique de l'organisation et de la physiologie cérébelleuse, même si elles ne permettent pas encore d'avoir une vue détaillée de l'ensemble. Apps et Hawkes ont cherché à intégrer ces différentes classifications au sein d'une unique cartographie (Apps and Hawkes, 2009). Dans leur revue, ils proposent l'existence de petites unités fonctionnelles permettant d'intégrer individuellement chaque modalité entrante dans le cervelet. Je vais maintenant m'attacher à la présentation de ces différentes organisations, puis nous tenterons d'expliquer les possibles processus d'intégration de l'information en détaillant plus spécifiquement la voie olivo-cortico-nucléaire.

2. ORGANISATION DES AFFERENCES OLIVAIRES DANS LE CORTEX CEREBELLEUX

Les fibres grimpantes constituent l'une des principales entrées du cervelet et jouent un rôle central dans l'organisation modulaire de ce dernier. Un axone projetant depuis l'olive inférieure va, en plus d'une collatérale dirigée sur les noyaux cérébelleux, se scinder en 7 fibres grimpantes – chez le rat – innervant toutes une unique cellule de Purkinje (Sugihara et al., 2001). L'ensemble de ces projections suivent une répartition parasagittale laissant à supposer une organisation fine du cortex cérébelleux selon cette orientation (Ekerot and Larson, 1979; Garwicz et al., 1992; Sugihara et al., 2001). La structuration topographique des afférences de l'olive inférieure vers le cortex cérébelleux fait l'objet de beaucoup d'études.

Dès 1940, Brodal propose, sur la base d'étude de dégénérescence chez le rat, que les projections olivaires sont organisées de manière topographique dans les différents lobules (Brodal, 1940). En 1946, il précise avec Jansen que le lobe antérieur du cortex cérébelleux peut être divisé en 3 parties fonctionnelles. Ils isolent ainsi les parties médianes et intermédiaires, contactées par l'olive accessoire, et les parties latérales, contactées par l'olive principale. L'utilisation de traceurs radioactifs injectés dans l'olive permet à Courville de confirmer les résultats de Brodal (Courville et al., 1974). De plus, ils observent également que les terminaisons axonales dans la couche moléculaire décrivent des bandes orientées selon l'axe antéropostérieur. Cependant, ces études ne permettent

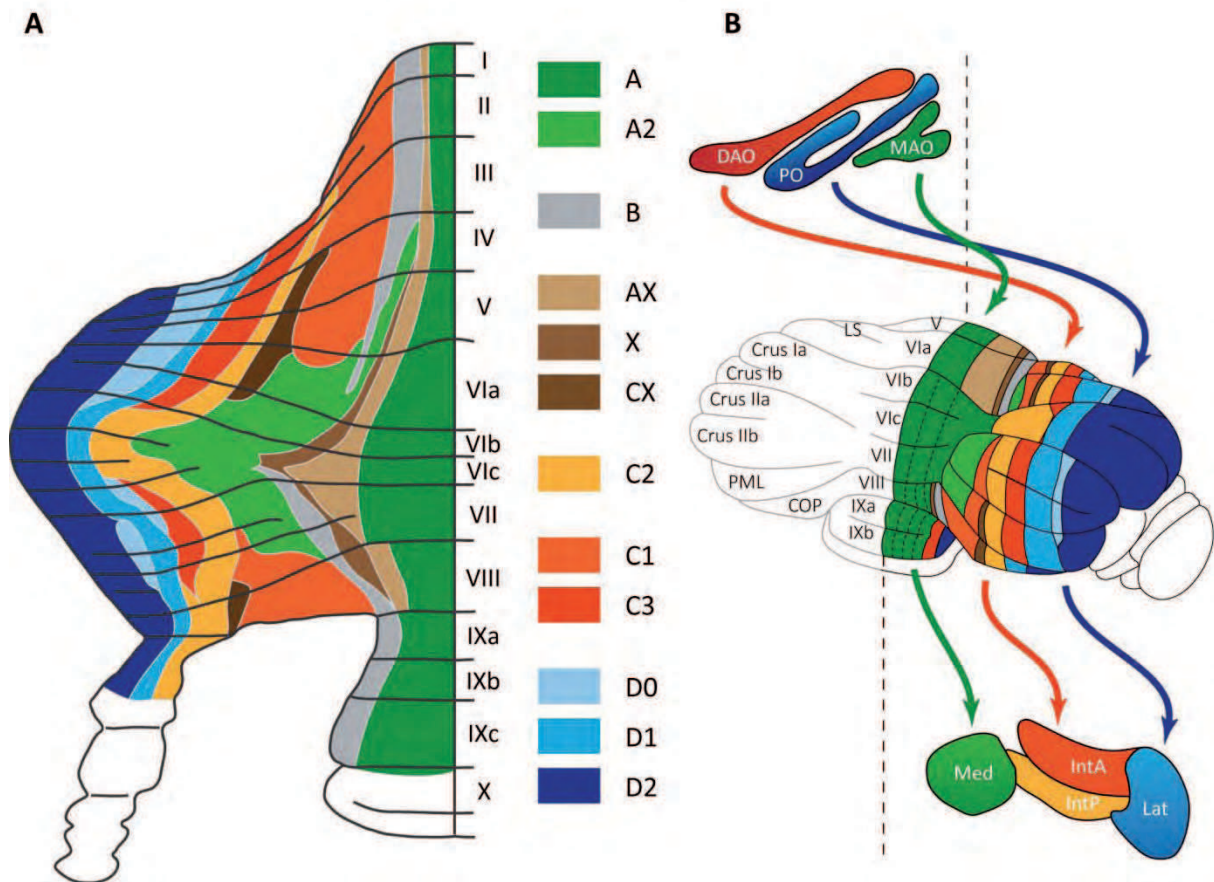


Figure 13 : Organisation zonale du cortex cérébelleux. **A** : Représentation des zones longitudinales - A, A2, B, AX, X, CX, C1, C2, C3, D0, D1, D2 - sur un cortex cérébelleux "déroulé". **B** : Organisation des connexions olivo-cortico-nucléaires simplifiée. Adapté de Apps et Hawkes, 2009.

Abréviations : COP = copula pyramidis ; DAO = dorsal accessory olive ; IntA = anterior interposed nucleus ; IntP = posterior interposed nucleus ; Lat = lateral cerebellar nucleus ; LS = lobulus simplex ; MAO = medial accessory olive ; Med = medial cerebellar nucleus ; PML = paramedian lobule ; PO = principal olive.

pas d'aboutir à une cartographie précise de l'organisation des entrées des fibres grimpantes dans le cortex cérébelleux.

2.1. Classification en zones longitudinales

Le premier découpage en zones longitudinales du cortex cérébelleux est fait par Voogd qui s'appuie sur l'organisation de l'architecture de la myéline chez le furet, puis sur l'étude des zones dégénérées suite à des lésions ciblées de l'olive inférieure chez le chat (Voogd, 1964, 1967). Il propose une subdivision des 3 compartiments initialement décrits par Brodal et Jansen en 7 zones – A, B, C1, C2, C3, D1 et D2 – qui reflètent selon lui la connectivité olivo-cortico-nucléaire (Groenewegen and Voogd, 1977). En mettant en exergue l'importance de l'organisation des connexions entre l'olive, le cortex et les noyaux cérébelleux, Voogd ouvre la voie de la compartimentation anatomo-fonctionnelle du cervelet. Ces données sont ensuite reproduites chez le rat (Azizi and Woodward, 1987; Jörntell et al., 2000), la souris (Schonewille et al., 2006), puis chez de nombreuses autres espèces (Voogd and Glickstein, 1998). De nouvelles subdivisions ont depuis été ajoutées portant à 12 le nombre de bandes parasagittales (figure 13A) recevant des entrées d'une région spécifique de l'olive inférieure et projetant sur une zone définie des noyaux cérébelleux (Sugihara and Shinoda, 2004; Voogd and Ruigrok, 2004). Une subdivision en zones a également pu être observée au niveau du flocculus et du nodulus (Ruigrok et al., 1992; Tan et al., 1995).

Une zone longitudinale peut ainsi être définie comme un réseau de cellules de Purkinje étendu à travers plusieurs lobules cérébelleux et ayant des connexions olivo-corticales et cortico-nucléaires topographiquement organisées (figure 13B), dont le détail est présenté dans la partie IV de ce manuscrit (Oscarsson, 1979; Buisseret-Delmas and Angaut, 1993). Les études électrophysiologiques des entrées olivaires lors de stimulations tactiles ou électriques ont permis de confirmer l'existence des zones établies de manière anatomique (Oscarsson, 1968; Larson et al., 1969; Armstrong et al., 1974; Trott and Armstrong, 1987). Dans de rares cas, les auteurs ont toutefois remarqué une divergence entre les caractérisations anatomiques et physiologiques comme pour les zones d2 (défini physiologiquement) et D2 (défini anatomiquement) qui diffèrent par leurs entrées olivaires provenant respectivement de l'olive accessoire dorsale et de l'olive principale (Ekerot and Larson, 1982).

Les travaux de Sugihara et Shinoda ont permis, par des traçages systématiques de toutes les subdivisions olivaires, de définir de manière très précise, chez le rat, l'organisation des connexions olivo-corticales (Sugihara et al., 1999, 2001). Ces observations indiquent qu'une sous division de l'olive inférieure projette au sein d'une même bande parasagittale, confirmant donc les travaux antérieurs (Groenewegen and Voogd, 1977; Azizi and Woodward, 1987). Cependant, ils remarquent en faisant varier les volumes d'injection de leur traceur - 0,1 ; 0,3 ; 0,8 mm de diamètre - dans la partie caudale de l'olive accessoire médiale, que plus la zone marquée est petite, moins l'extension antéro-postérieure et médio-latérale au niveau cortical est importante (figure 14A). Cette constatation amène à penser qu'il existe une organisation parasagittale encore plus fine du cortex cérébelleux.

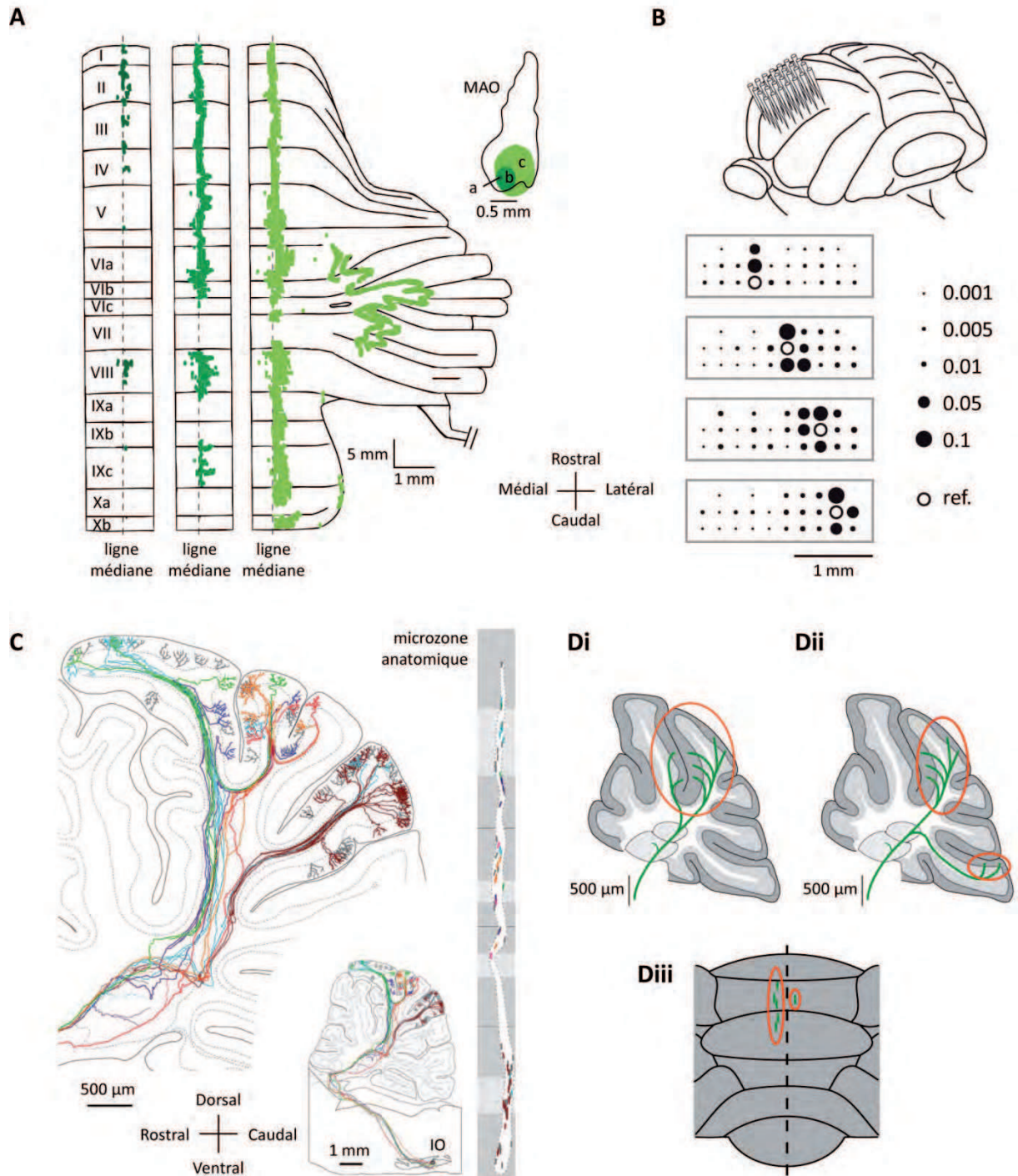


Figure 14 : Organisation microzonale du cortex cérébelleux. **A** : Injection de différents volumes de BDA dans l'olive inférieure au niveau de la MAO (insertion supérieure droite) et observation des projections des fibres grimpantes au niveau du cortex cérébelleux. Vert foncé = 0,1 mm de diamètre ; vert clair = 0,3 mm ; vert anis = 0,8 mm. Adapté de Sugihara et Shinoda, 2001. **B** : Synchronisation de l'activité CS de 26 cellules de Purkinje enregistrée dans CrusII. Le rond blanc symbolise la cellule de référence à laquelle est comparée la synchronisation des CS des 25 autres cellules (ronds noirs) - plus le diamètre augmente, plus la synchronisation est importante. Les 4 insertions représentent la même séquence d'enregistrement avec 4 électrodes de références différentes. Adapté de Sugihara et al. 2007. **C** : Reconstruction de 6 neurones provenant de l'olive inférieure et projetant dans le cortex cérébelleux. La bande de droite symbolise la vue horizontale de ces projections sur un cortex "déplié" et fait apparaître une microzone anatomique. D'après Fujita et Sugihara, 2013. **Di** : Projections locales. **Dii** : Projections longitudinales. **Diii** : Projections médo-latérales.

2.2. Classification en microzones

2.2.1. Observations physiologiques

Dans les années 60, Oscarsson étudie la cartographie sensorielle des afférences cérébelleuses dans le lobe antérieur du chat en basant ses observations sur l'occurrence des CS qui reflètent directement l'activité des fibres grimpantes. Il définit dans un premier temps une zonation en 3 bandes à orientation parasagittale (Oscarsson, 1965), puis il confirme la convergence des connexions olivo-corticales en bandes longitudinales correspondant à la classification de Voogd (Oscarsson, 1968; Larson et al., 1969).

L'évolution des techniques d'électrophysiologie vers une meilleure résolution spatiale va permettre l'établissement d'une cartographie fine de ces entrées corticales. Oscarsson et Anderson, en 1978, parviennent à séparer différents groupes de cellules de Purkinje en fonction de leur champ récepteur et proposent l'existence de microzones situées au sein des zones longitudinales (Andersson and Oscarsson, 1978). Ils présentent alors les microzones comme étant l'unité opérationnelle du traitement de l'information cérébelleuse en comparant cette organisation avec les colonnes corticales du cortex cérébral.

La microzone peut dès lors être définie comme un groupement de cellules de Purkinje partageant un même champ récepteur somatotopique (Courville et al., 1974; Garwicz et al., 1998a; Ozden et al., 2008; Mukamel et al., 2009). Chaque groupement microzonal, contenant approximativement 1000 cellules de Purkinje, représente une bande étroite - 100 à 300 μm de large - pouvant couvrir plusieurs lobules cérébelleux dans le sens rostrocaudal (Oscarsson, 1979; Sugihara and Shinoda, 2004). Les microzones sont toujours indiquées comme appartenant à une même bande longitudinale.

L'étude de l'activité des cellules de Purkinje au sein d'une microzone a permis de montrer l'existence d'une forte synchronisation dans la décharge de leurs CS (De Zeeuw et al., 1997a; Lang et al., 1999; Sugihara et al., 2007). L'utilisation de microscopie multi-photon combinée à des marqueurs de l'activité calcique fluorescents (*Oregon Green*), a également permis la visualisation très précise de ces microzones *in vivo* via la détection du calcium généré par les CS (Ozden et al., 2008, 2009). Les phénomènes de synchronisation, observés par l'utilisation d'un quadrillage d'électrodes, s'atténuent rapidement dans le sens médio-latéral et semblent bien préservés selon l'orientation rostro-caudale (figure 14B) (Sugihara et al., 1993, 2007). Ces constatations confirment un autre aspect de la fonctionnalité des microzones. La résolution spatiale de ces enregistrements, correspondant à l'espace entre deux électrodes, est généralement supérieure à 250 μm ce qui permet difficilement l'enregistrement de plusieurs cellules de Purkinje dans le sens médio-latéral au sein d'une même microzone (Lang et al., 1999). Plus récemment, des expériences menées chez le chat décérébré lors d'enregistrements en *loose patch* ont permis de montrer l'existence d'une synchronisation des CS de deux cellules de Purkinje adjacentes (Bengtsson and Jörntell, 2009).

Sur le plan anatomo-fonctionnel, cette co-activation des CS au sein d'une même microzone peut être attribuée aux projections parasagittales des fibres grimpantes provenant d'un même neurone, mais également à la synchronisation de l'activité des neurones olivaires voisins qui s'opère par le biais des *gap junctions* (Llinas et al., 1974).

2.2.2. Correspondance anatomique

Ces observations électrophysiologiques répondent à une organisation anatomique particulière des projections olivaires. Les travaux de Sugihara et Shinoda ont permis, au cours des 15 dernières années, d'avoir une vue détaillée de cette voie. Pour cela, ils ont procédé à la reconstruction de fibres grimpances marquées au BDA (*biotinylated dextran amine*) à partir de tranches sériées, lors de remplissages unitaires ou multiples de neurones de l'olive inférieure (Sugihara et al., 1999, 2001).

Les remplissages unitaires ont permis de révéler que les projections d'une fibre grimpance s'étendent sur une largeur d'environ 0,1 à 0,4 mm ([figure 14C](#)) (Sugihara et al., 1999, 2001). Les collatérales de fibres grimpances, selon l'axe antéro-postérieur, peuvent présenter deux patrons différents. Le premier est constitué de projections locales restreintes à un ou plusieurs lobules contigus ([figure 14Di](#)) et constitue 30 à 40 % des projections olivaires. Le second présente des projections longitudinales - environ 50 à 60 % des cas - dans deux zones séparées par plusieurs lobules corticaux ([figure 14Dii](#)). Quelle que soit la configuration antéro-postérieure, l'organisation groupée des fibres grimpances semble être cohérente avec l'existence des microzones. Toutefois, l'existence de plusieurs groupements dans le sens longitudinal amène la question de la co-activation de microzones situées respectivement dans les parties antérieures et postérieures du cervelet. Enfin, dans 10 % des cas, les projections grimpances peuvent présenter une branche transverse et avoir une ou plusieurs fibres grimpances situées en symétrie de la ligne médiane ([figure 14Diii](#)) ou médio-latéralement (Fujita and Sugihara, 2013).

Les remplissages d'un petit nombre de cellules voisines de l'olive inférieure montrent que leurs fibres grimpances projettent dans les mêmes regroupements corticaux en définissant ce qui pourrait correspondre à une ou plusieurs microzones ([figure 14A & C](#)) (Sugihara and Shinoda, 2004). Pour les expériences de marquage, la différence entre zones et microzones longitudinales semble donc être dépendante de la résolution de ces derniers ([figure 14A](#)).

Finalement, l'orientation parasagittale des fibres grimpances provenant des axones olivaires conforte l'idée d'une compartimentation du cortex cérébelleux en zones et en microzones longitudinales. A cette distribution particulière s'ajoute la forte anisotropie de l'arbre dendritique des cellules de Purkinje et des interneurons de la couche moléculaire qui sous-tend probablement des interactions topographiquement organisées entre ces types neuronaux et les entrées grimpances.

3. ORGANISATION DES AFFERENCES MOUSSUES DANS LE CORTEX CEREBELLEUX

Comme nous l'avons déjà décrit, les afférences moussues proviennent des noyaux précérébelleux ou directement de la moelle épinière. Elles renseignent le cervelet sur l'état actuel du corps en l'informant sur la position des membres, la tension musculaire, la vitesse de déplacement ou encore la pression cutanée via le tractus spino-cérébelleux. Les informations peuvent également provenir du cortex cérébral et représenter un niveau d'intégration plus important. Tout comme les projections olivaires, les fibres moussues suivent une organisation topographique qui joue un rôle important dans le traitement des informations cérébelleuses.

3.1. Observations électrophysiologiques

Des micro-cartographies ont été pratiquées par l'enregistrement de potentiels évoqués dans la couche granulaire chez divers animaux lors de stimulations cutanées mécaniques ou électriques. Cette technique a permis d'identifier au niveau du cortex cérébelleux des champs récepteurs tactiles associés aux fibres moussues (figure 15A) (Joseph et al., 1978; Shambes et al., 1978a, 1978b). Un stimulus cutané donne ainsi naissance à l'activation d'une ou de plusieurs surfaces appelées "patches" dont la surface, variable, peut aller jusqu'à 1 mm² (Stein and Glickstein, 1992). L'activation de plusieurs patches pour une même stimulation est interprétée comme l'effet des collatérales d'une même fibre moussue qui peuvent se faire aussi bien dans le sens parasagittal que médiolatéral (Woolston et al., 1982).

En procédant de la sorte, la stimulation des différentes parties du corps permet d'obtenir une carte représentant une multitude de patches rattachés à un champ récepteur spécifique. La représentation de ces patches n'aboutit pas à une somatotopie classique car il est possible de retrouver côte à côte deux champs récepteurs affiliés à des zones distantes du corps (figure 15A). Cette organisation sous forme de mosaïque est alors désignée par le terme de somatotopie fracturée des entrées des fibres moussues. Il n'existe pour l'instant aucune carte couvrant l'ensemble du cervelet, mais les lobules Crus I et II, dans lesquels nous avons fait nos enregistrements, ont très largement été décrits. Ces études, initialement faites chez le rat, ont également pu être confirmées chez d'autres espèces, comme le chat, l'écureuil (Kassel et al., 1984) ou encore l'opossum (Welker and Shambes, 1985).

La stimulation du cortex cérébral sensoriel primaire couplée à l'enregistrement des potentiels de champs dans le cortex cérébelleux a permis d'observer un phénomène identique de somatotopie fracturée (Bower et al., 1981). Lors d'études ultérieures, ils constatent que les patches obtenus par la stimulation tactile des vibrisses coïncident avec l'activation des tonneaux correspondant dans le cortex cérébral sensoriel primaire (Morissette and Bower, 1996). Il semble donc que les informations moussues corticales et somato-sensorielles convergent au niveau du cortex cérébelleux.

L'étude systématique des champs récepteurs entre différents animaux d'une même espèce a permis de montrer une variabilité de la taille et de la position des patches (Bower and Kassel, 1990; Bower, 2011). Ce travail, mené chez le rat, met principalement en avant des différences de relations entre les patches situés dans un même voisinage (figure 15B). Cependant, l'organisation

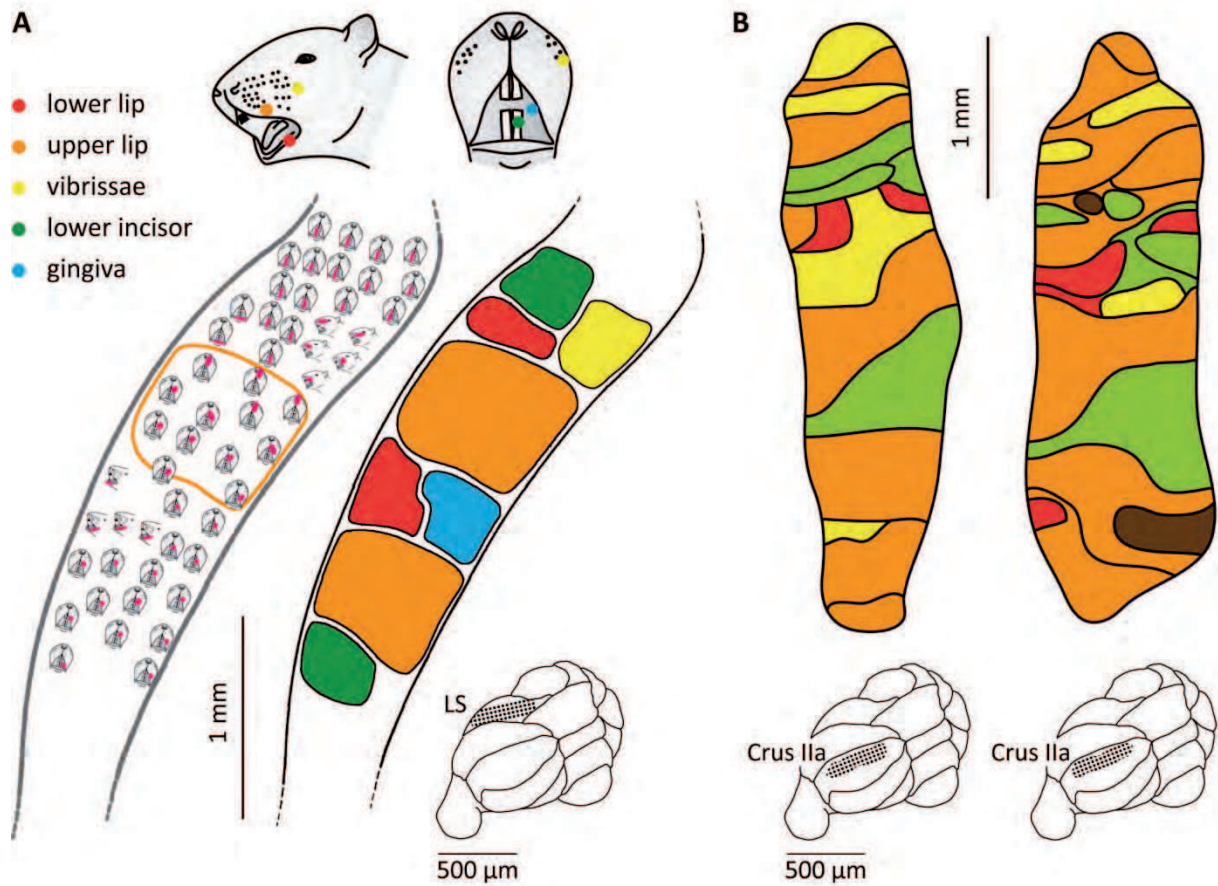


Figure 15 : Organisation fonctionnelle des afférences moussues dans le cortex cérébelleux. **A** : Somatotopie fracturée dans le lobulus simplex (LS). Les points de couleurs symbolisent les zones de stimulations tactiles. Les points roses dans la bande de gauche montrent la localisation du champ récepteur périphérique qui active une réponse dans la couche granulaire lorsqu'il est activé. La bande de droite représente les patches constitués sur la base de la carte présentée à gauche. Adapté de Shambes et al., 1978. **B** : Représentation des patches enregistrés sur deux rats différents dans une même zone et pour les mêmes stimulations. D'après Bower, 2011.

topographique globale semble conservée pour les individus d'une même espèce (Gonzalez et al., 1993).

3.2. Observations anatomiques

Les études par injection de traceurs antérogrades de l'organisation des projections moussues dans le cortex cérébelleux sont assez controversées. Les premières observations font état d'une organisation sous forme de bandes parasagittales lors d'injection dans le noyau cunéiforme externe (Jasmin and Courville, 1987). Ces expériences, répétées pour d'autres voies, mènent les auteurs aux mêmes observations (figure 16A) (Heckroth and Eisenman, 1988; Ji and Hawkes, 1994; Serapide et al., 2001; Gebre et al., 2012). Des résultats obtenus ultérieurement font cependant état de projections plus éparses, organisées le long de bandes parasagittales (Wu et al., 1999; Quy et al., 2011).

Les reconstructions unitaires de fibres moussues ont permis de décrire que les divisions axonales produisent des embranchements transversaux et longitudinaux étendus (figure 16B). L'étude de cellules adjacentes montre que leurs projections sont plutôt divergentes au niveau du cortex cérébelleux (figure 16C). Cependant, le marquage d'un petit nombre de neurones des noyaux de la colonne dorsale (DCN) a permis de révéler l'existence de groupements respectant une organisation antéropostérieure et médiolatérale (Quy et al., 2011). Ces projections, relayant essentiellement des informations provenant de la moelle, sont majoritairement restreintes au spino-cervelet. La diversité des sources moussues (noyaux de la colonne dorsale, tractus spinaux, noyaux vestibulaires, du pont, trigéminés et réticulaires latéraux) rend l'étude anatomique de cette voie complexe.

Il est probable que les dissemblances entre les études anatomiques et électrophysiologiques soient majoritairement dues à des résolutions différentes dans les processus d'exploration. Il y aurait ainsi une organisation fine sous forme de patches observable par l'étude des potentiels de champs qui, lorsque l'ensemble des projections des noyaux est considéré, pourrait être perçue sous forme de groupements de fibres moussues ou encore de bandes parasagittales.

3.3. "Blebs"

Des expériences d'histologie utilisant la fixation par l'éthanol ont fait apparaître des zones appelées "blebs" dans la couche granulaire très reproductible entre les individus (figure 17). Chez la souris, il existe des milliers d'unités "blebs" comprenant environ 100 cellules de Purkinje (Hawkes, 1997). Les relations entre "blebs" et patches ne sont pas encore établies, mais il est possible que chaque "bleb" représente le champ terminal d'un petit nombre d'afférences moussues.

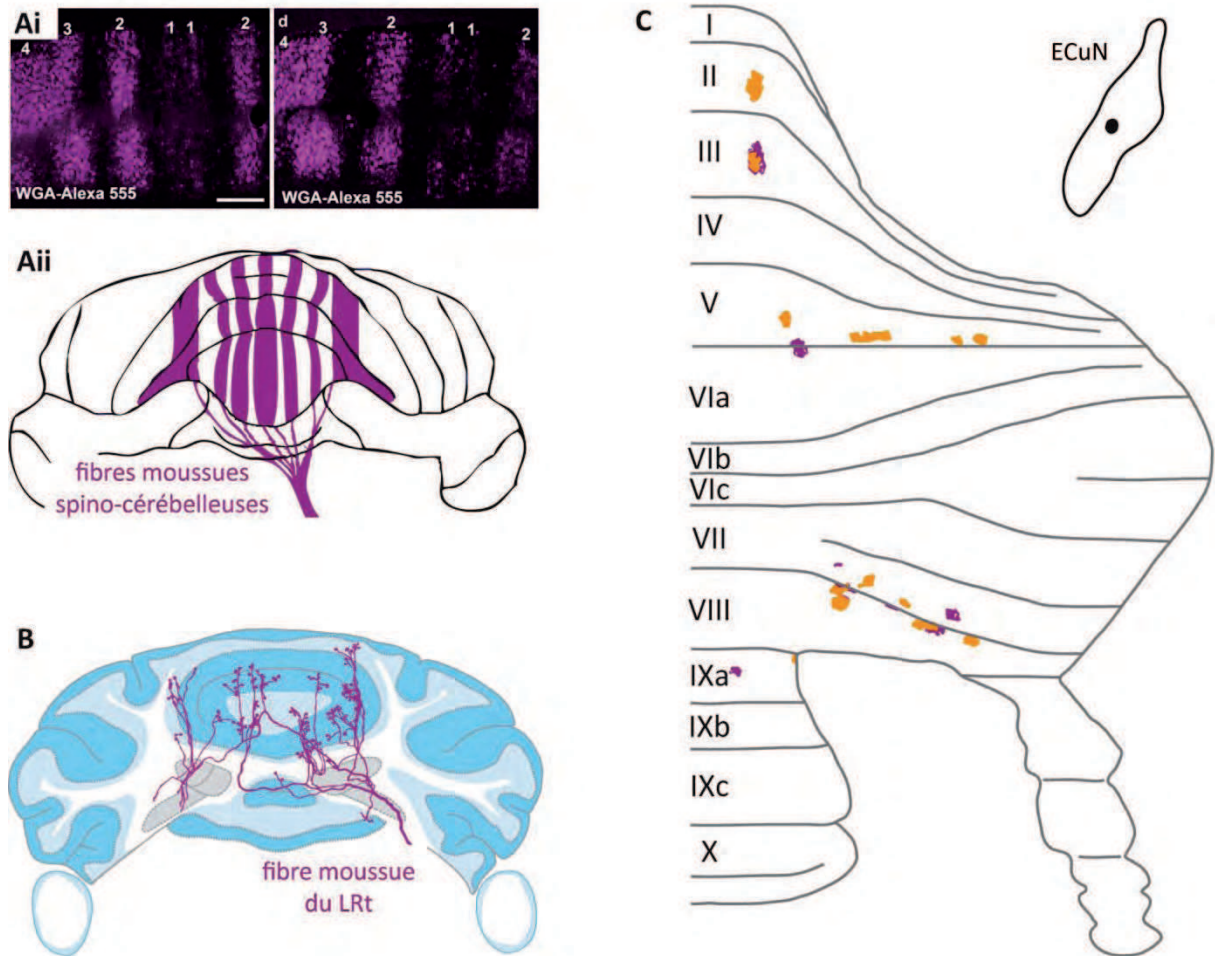


Figure 16 : Organisation anatomique des afférences moussues dans le cortex cérébelleux. **Ai, Aii** : Injection de WGA-Alexa 555 représentant les projections parasagittales des fibres moussues spinocérébelleuses dans les lobules I à V. Injections faites dans le tractus spino-cérébelleux. Adapté de Gebre et al., 2012. **B** : Reconstruction d'un axone de fibre mousse provenant du LRT (représentation en vue frontale/coronale). Adapté de Wu et al., 1999. **C** : Projection corticale de deux neurones des noyaux cunéiformes externes. Les corps cellulaires de ces neurones sont distants de 90µm. Adapté de Quay et al., 2011.

Abréviations : ECuN = external cuneate ; LRT = lateral reticular nucleus.

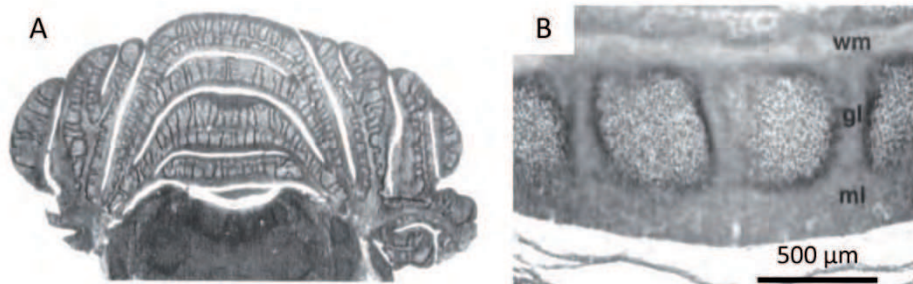


Figure 17 : Blebs de la couche granulaire. **A** : Marquage des "blebs" dans la couche moléculaire. **B** : Agrandissement. Issu de Hawkes et al., 1997.

4. COMPARTIMENTATION HISTOCHIMIQUE

La dernière forme de compartimentation cérébelleuse que nous allons décrire s'appuie sur des études immuno-histochimiques révélant une expression hétérogène de certains marquages dans le cortex cérébelleux. Ces divisions suivent le plus souvent une organisation en bandes parasagittales répartie symétriquement de part et d'autre de la ligne médiane et existent pour différents types cellulaires. Ces patrons d'expression sont composés alternativement de bandes positives et négatives pouvant couvrir plusieurs lobules. Historiquement, la compartimentation moléculaire en bandes parasagittales a pu être mise en évidence par l'expression hétérogène de la 5'-nucléotidase ([figure 18A](#)) dans la couche moléculaire (Scott, 1963). D'autres marqueurs, en outre, suivent une expression hétérogène variant d'un lobule à l'autre dans le sens rostro-caudal.

4.1. Bandes zébrines : Marqueurs hétérogènes des cellules de Purkinje

De nombreux marqueurs exprimés par les cellules de Purkinje forment des bandes parasagittales. Ces compartimentations donnent un aspect strié au cortex cérébelleux qui leur vaut le nom de bandes zébrines (Hawkes et al., 1985). Le marqueur le plus connu est la zébrine II (ZII) qui correspond à l'Aldolase C ([figure 18B & C](#)). Les cellules exprimant la ZII constituent les ZII positives et sont alternées avec les ZII négatives. Elles sont symétriques par rapport à la ligne médiane, très reproductibles entre les individus et conservées entre les espèces (Sillitoe et al., 2005). Le marquage de l'Aldolase C divise ainsi le cortex cérébelleux en 7 bandes positives allant de P1+ à P7+ en partant de la ligne médiane et se terminant dans les hémisphères ([figure 18](#)) (Hawkes and Herrup, 1995; Sugihara and Shinoda, 2004).

De nombreux marqueurs forment des bandes zébrines dessinant différents patrons à la surface du cortex cérébelleux. Si l'on s'intéresse à leurs caractéristiques, on constate que malgré leur homogénéité entre les individus d'une même espèce, ils présentent des différences en termes de structure, de localisation dans la cellule, de fonction ou encore du moment de leur expression au cours du développement.

Les marqueurs zébrines peuvent se superposer - par exemple ZII vs EAAT4 (*Excitatory Amino Acid Transporter 4*) - , se chevaucher - par exemple Hsp25 (*Heat shock protein 25*) vs HNK-1 (*Natural killer antigen-1*) - ou encore présenter des patrons en opposition comme entre la Hsp25 et la NfH (*Neurofilament heavy chain*).

Les zébrines se développent dès E14 (*embryonic day 14*) et jusqu'à l'âge adulte. Tout au long de cette période, certains marquages vont apparaître et d'autres vont disparaître (Herrup and Kuemerle, 1997; Oberdick et al., 1998). Cette répartition en bande est programmée dès la génération des Purkinje (Hashimoto and Mikoshiba, 2003). Dans le cas des souris transgéniques ayant un déficit au niveau de la sécrétion de *reelin* ou une déplétion du gène *scambler*, certaines cellules de Purkinje sont ectopiques résultant en des foliations anormales (généralement moins nombreuses) et en une diminution de leur nombre dans le cortex cérébelleux. Malgré cela, l'expression et le positionnement des bandes zébrines sont toujours conservés (Goldowitz et al., 1997).

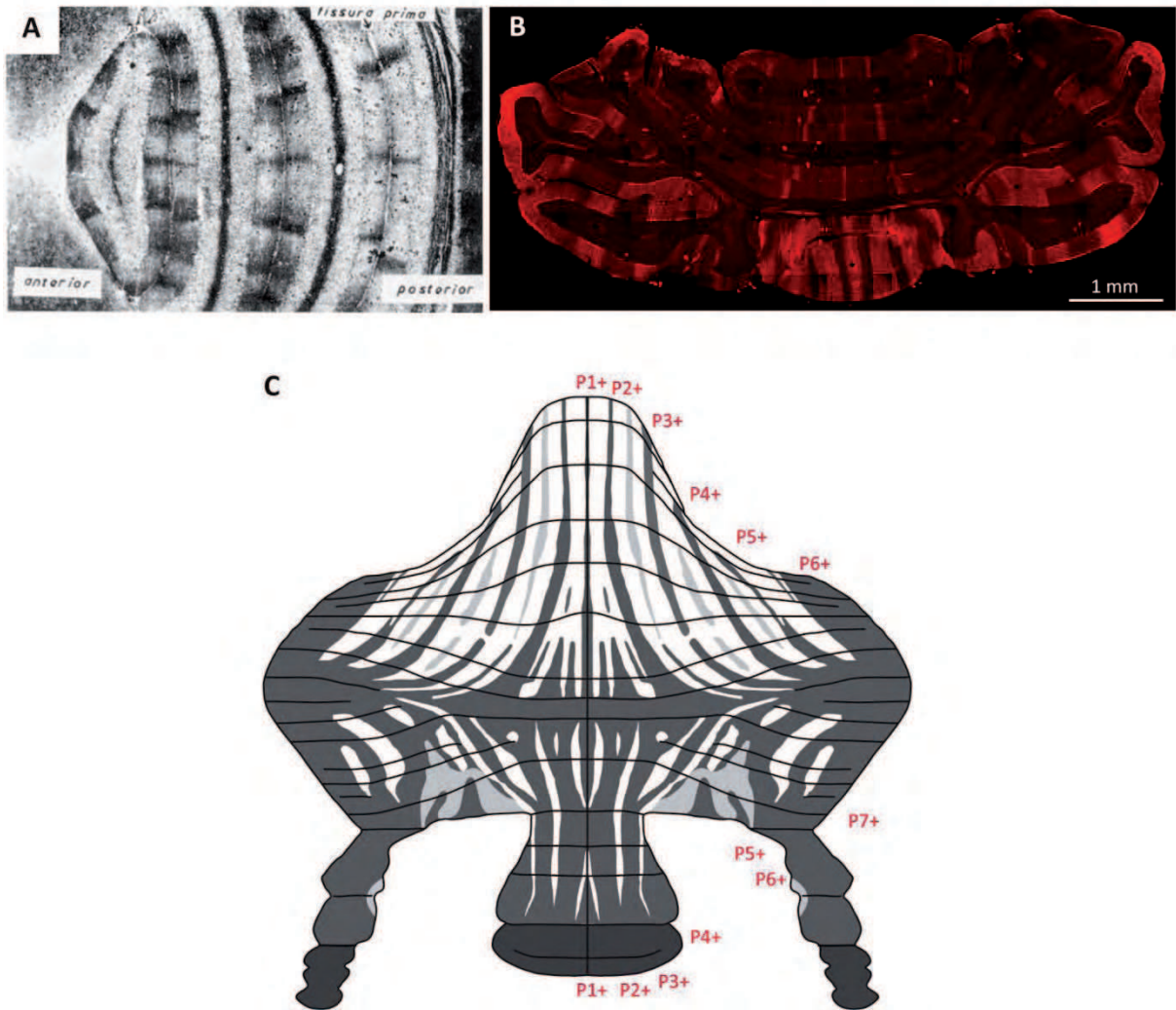


Figure 18 : Compartimentation histochimique du cortex cérébelleux. **A** : Compartimentation parasagittale du cervelet révélée par la 5'-nucleotidase. Issu de Voogd, 1967. **B** : Tranche coronale de cervelet de souris marquée pour la zébrine II (aldolase C). Image de Jean-Luc Dupont. **C** : Représentation des bandes zébrines II dans un cervelet "déroulé" numéroté de P1+ à P7+. D'après Sugihara et Shinoda, 2004.

4.2. Expression phénotypique alterné des autres types cellulaires

D'autres cellules révèlent également certains marqueurs de façon modulaire. L'expression de patrons a ainsi pu être mise en évidence pour les cellules en grain dans le cas de souris *knock in* pour la β -galactosidase sous contrôle du promoteur de NR2C (Karavanova et al., 2007). Les fibres moussues forment également des bandes parasagittales alternées positivement et négativement selon que l'on révèle l'expression de VGluT1 (*Vesicular glutamate transporter 1*) ou VGluT2 (*Vesicular glutamate transporter 2*) (Gebre et al., 2012). Enfin, les cellules unipolaires en brosses présentent plusieurs compartimentations définies par des expressions protéiques hétérogènes (Braak and Braak, 1993; Chung et al., 2009).

5. CO-ORGANISATION DES ENTREES MOUSSUES ET GRIMPANTES

5.1. Développement et organisation

L'organisation embryonnaire et post-natale des fibres moussues et grimpantes semble être corrélée positivement avec l'expression de marqueurs histologique (Sotelo and Wassef, 1991; Voogd and Ruigrok, 1997; Sotelo and Chédotal, 2005; Apps and Hawkes, 2009).

Voogd et collaborateurs ont observé que les fibres grimpantes arrivant d'une même région de l'olive inférieure font synapses à l'intérieur de compartiments qui suivent l'expression de la ZII (Voogd et al., 2003). Sur une base identique de traçages antérogrades effectués dans des zones précises de l'olive inférieure et comparés avec les compartimentations de la ZII, Sugihara et Shinoda ont récemment proposé une organisation des projections olivo-corticales en 4 groupes. Chacun de ces groupes est constitué d'afférences olivaires projetant dans des régions corticales ZII positives (groupe I et II) ou à l'inverse ZII négative (groupe III et IV) (Sugihara and Shinoda, 2004). D'après eux, les projections grimpantes et moussues seraient toutes deux dépendantes du développement des patrons zébrines.

Ces observations se retrouvent également dans l'étude des fibres moussues pour lesquelles les champs récepteurs tactiles identifiés fonctionnellement correspondent aux patrons zébrine II (Hallem et al., 1999; Ebner et al., 2005). De plus, ces patches formés par les fibres moussues sont également cohérents avec l'expression de patrons exprimés dans la couche granulaire du cortex cérébelleux. Des correspondances ont ainsi pu être trouvées avec l'expression de l'acétylcholinestérase (Boegman et al., 1988) ou encore de la cytochrome oxidase (Leclerc et al., 1990).

Les fibres grimpantes aussi bien que les fibres moussues semblent donc suivre l'organisation de certains marqueurs histologiques du cortex cérébelleux, laissant supposer une organisation commune de ces deux voies afférentes. Il a été montré, lors du marquage d'une zone corticale, que les collatérales des fibres grimpantes co-localisent avec celles des fibres moussues (Pijpers et al., 2006). De tels résultats sont cohérents avec les observations originellement faites à la fin des années 70 (Kitai et al., 1969), mais aussi par des études physiologiques plus récentes faisant état d'une activité convergente des fibres moussues et grimpantes (Garwicz et al., 1998b).

5.2. Interactions fonctionnelles

Odeh et collègues observent qu'il existe une topographie convergente des projections cortico-ponto-cérébelleuses - fibres moussues - correspondant aux entrées périphériques associées relayées par les fibres grimpantes (Odeh et al., 2005). Ces résultats suggèrent que les informations envoyées à une même partie du cortex cérébelleux par les voies directes (trigemio-cérébelleuses, spino-cérébelleuses et olivo-cérébelleuses) et indirectes (cerebro-ponto-cérébelleuses) sont fonctionnellement reliées (Morissette and Bower, 1996).

Des études tendent à montrer que l'organisation des patches suit également celle des bandes longitudinales. Ainsi, il a été montré dans Crus II, que les champs récepteurs primaires sont identiques pour les fibres grimpantes - via l'activité des CS - et les fibres moussues, via l'activité des cellules en grain sous-jacentes. Selon cette vision, les fibres moussues et grimpantes ne serviraient donc pas à apporter des informations différentes dans une même région du cervelet (Brown and Bower, 2001). Toujours par l'étude des potentiels de champs, il a été observé que ce recouvrement zonal - lors de stimulations cutanées - respecte une organisation parasagittale dans le vermis et les hémisphères (Eccles et al., 1968; Ekerot and Larson, 1973; Brown and Bower, 2001). Les études fonctionnelles faisant état de patches - pour les projection moussues - et de microzones - pour les projections grimpantes - sont toutefois peu compatibles avec ces résultats.

Les hétérogénéités moléculaires pourraient également avoir des implications fonctionnelles ajoutant un troisième facteur d'interaction potentiel en plus des deux entrées majeures du cervelet. Par exemple, mGluR1 (*Metabotropic glutamate receptor 1*), impliquée dans la transmission glutamatergique, ne s'exprime que dans les ZII négatives et pourrait être impliquée dans une forme de dépression à long terme (LTD) à la synapse grain-Purkinje (Ito, 2002b). Cette hypothèse suggère que les mécanismes sous-tendant les dépression à long terme, et les voies par lesquelles elles se manifestent, diffèrent entre les bandes des cellules de Purkinje.

Ainsi, au cours du développement, les fibres grimpantes et moussues nécessitent que les cellules de Purkinje soient bien structurées afin d'organiser leurs projections de manière topographique. Cette structuration pourrait être régie par un ensemble de marqueurs moléculaires, comme, par exemple, les bandes zébrines. L'organisation commune des entrées moussues et grimpantes semble toutefois complexe à décrire et les propositions existantes sont loin de faire consensus au sein de la "communauté cérébelleuse". De plus, il est important de noter que, dans la majorité des études, la potentielle activation médio-latérale produite par les fibres parallèles n'est pas prise en compte, ou bien est considérée comme inexistante. Il est donc possible de dégager certaines questions centrales qui permettront de mieux comprendre, si elles sont élucidées, le fonctionnement commun des fibres moussues et grimpantes :

- Les patches provenant des fibres moussues sont-ils compatibles avec zones/microzones des fibres grimpantes ?
- Quel est le rôle, s'il en est, des marqueurs moléculaires ?
- Quel est le rôle des fibres parallèles ?

Ces questions, ainsi que le manque de certaines informations, nous rappellent que le cervelet n'est pas uniquement composé de milliers d'unités indépendantes, mais plutôt qu'il est un système interconnecté complexe et formé de milliers d'unités travaillant ensemble.

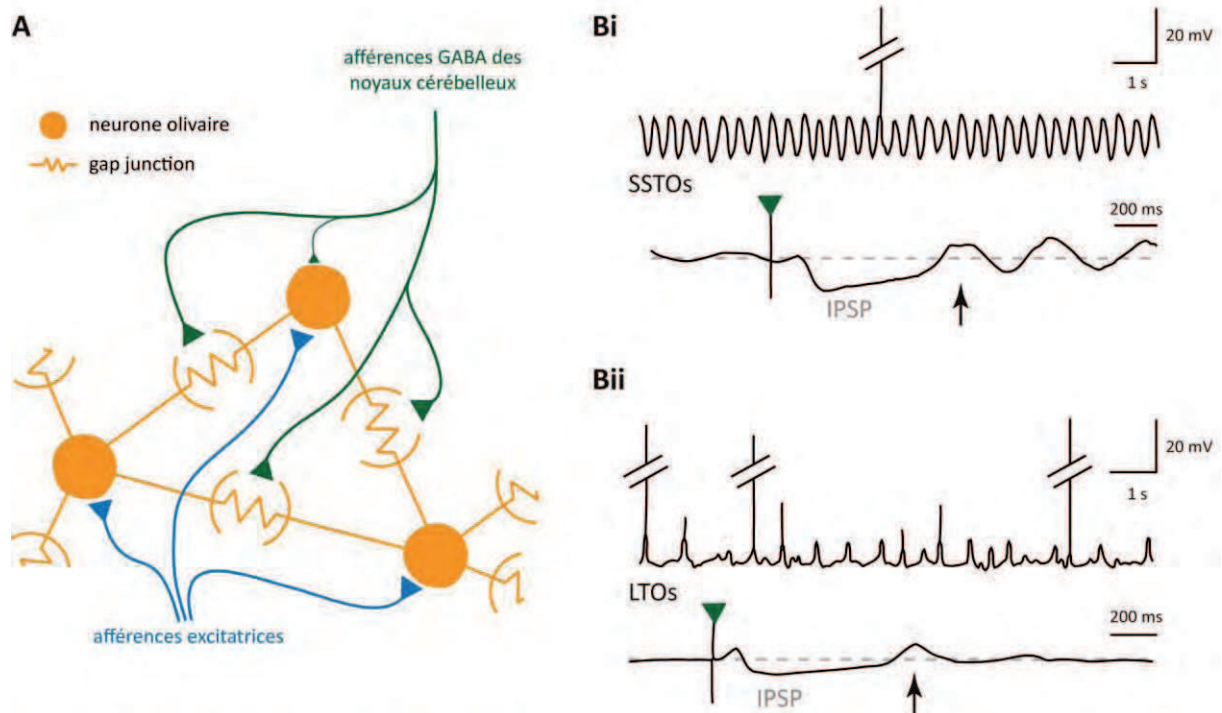


Figure 19 : Oscillations olivaires et afférences inhibitrices. **A** : Représentation schématique des *gap junctions* couplant les neurones de l'olive inférieure. Les afférences GABAergiques provenant des noyaux cérébelleux contactent majoritairement les glomérules dans lesquels se trouvent les *gap junctions*. **Bi** : Activité spontanée d'une cellule "SSTO" enregistrée en *current clamp* (trace du haut). Moyenne des réponses de cette même cellule (trace du bas) lors d'une stimulation des afférences GABAergiques (triangle vert). Chaque stimulation induit un EPSP suivi d'une IPSP aboutissant à la réinitialisation de l'activité oscillatoire (flèche noire). **Bii** : Même observation pour une cellule "LTO". *Note* : En Bi & Bii lors de la réinitialisation des oscillations (traces du bas), l'activité oscillatoire précédant la stimulation est lissée par l'effet du moyennage des traces. Adapté de Bazzigaluppi et al., 2012.

Abréviations : IPSP = inhibitory postsynaptic potential ; LTOs = low-threshold oscillations ; SSTOs = sinusoidal subthreshold oscillations

PARTIE IV : TRAITEMENT DE L'INFORMATION DANS LA BOUCLE OLIVO-CORTICO-NUCLEAIRE

Les types neuronaux du cervelet sont connus depuis plus de 100 ans (Ramon y Cajal, 1911) et la structuration des microcircuits est finement décrite (Palay and Chan-Palay, 1974). Nous venons de présenter une organisation modulaire détaillée du cortex cérébelleux suivant trois critères morphologiques et/ou physiologiques. Cependant, si les descriptions anatomiques et cytoarchitecturales de cette structure sont précises, les phénomènes qui régissent et traitent les processus moteurs sont encore mal décrits.

L'olive inférieure joue un rôle important dans le contrôle et la modulation des processus cérébelleux. Elle serait, via ses collatérales sur les noyaux cérébelleux et l'induction de CS dans les cellules de Purkinje, impliquée dans le contrôle de différentes plasticités cérébelleuses, dans la détection et la gestion des erreurs motrices ou encore dans l'organisation temporelle des mouvements (Rondi-Reig et al., 1997; Llinás, 2009; De Zeeuw et al., 2011). Dans ce contexte, il est important de comprendre à la fois comment cette structure agit sur ses cibles, mais également comment l'activité du réseau peut la moduler.

1. PROPRIETES PHYSIOLOGIQUES ET MODULATION DE L'ACTIVITE OLIVAIRE

L'étude des processus d'apprentissage et de régulation temporelle du cervelet passe nécessairement par la compréhension de la modulation des activités de l'olive inférieure. Je commencerai par décrire les phénomènes d'oscillations olivaires, puis je poserai la question de comment les entrées excitatrices et inhibitrices modulent les signaux au niveau somatique et dendritique. Enfin, nous verrons comment ces informations participent à la décharge des potentiels d'actions dans cette structure.

1.1. Oscillations olivaires

Llinas et collègues sont les premiers à observer que les neurones olivaires sont couplés par des *gap junctions* (Llinas et al., 1974). Ces connexions sont principalement présentes dans les dendrites des cellules olivaires (figure 19A) et peuvent être découplées électriquement par des entrées GABAergiques (Spira and Bennett, 1972; Hesslow, 1986; de Zeeuw et al., 1989; Ruigrok and Voogd, 1995; Devor and Yarom, 2000). Plus de 85% de ces cellules présentent également une oscillation membranaire (Long et al., 2002; De Zeeuw et al., 2003; Leznik and Llinás, 2005). Il est possible de distinguer les oscillations infraliminaires sinusoïdales (SSTOs : *sinusoidal subthreshold oscillations*) ayant une activité rythmique entre 4 et 8 Hz et les oscillations bas-seuil (LTOs : *low-threshold oscillations*) dépendantes du calcium comprises entre 1 et 3 Hz (figure 19B) (Llinás and Yarom, 1986; Bal and McCormick, 1997; Bazzigaluppi et al., 2012).

La stimulation des afférences GABAergiques originaires des noyaux cérébelleux aboutit à la réinitialisation de l'activité oscillatoire des cellules SSTOs et des cellules LTOs (figure 19B), avec un effet moins prononcé pour ces dernières (Bazzigaluppi et al., 2012). Ce réamorçage joue un rôle

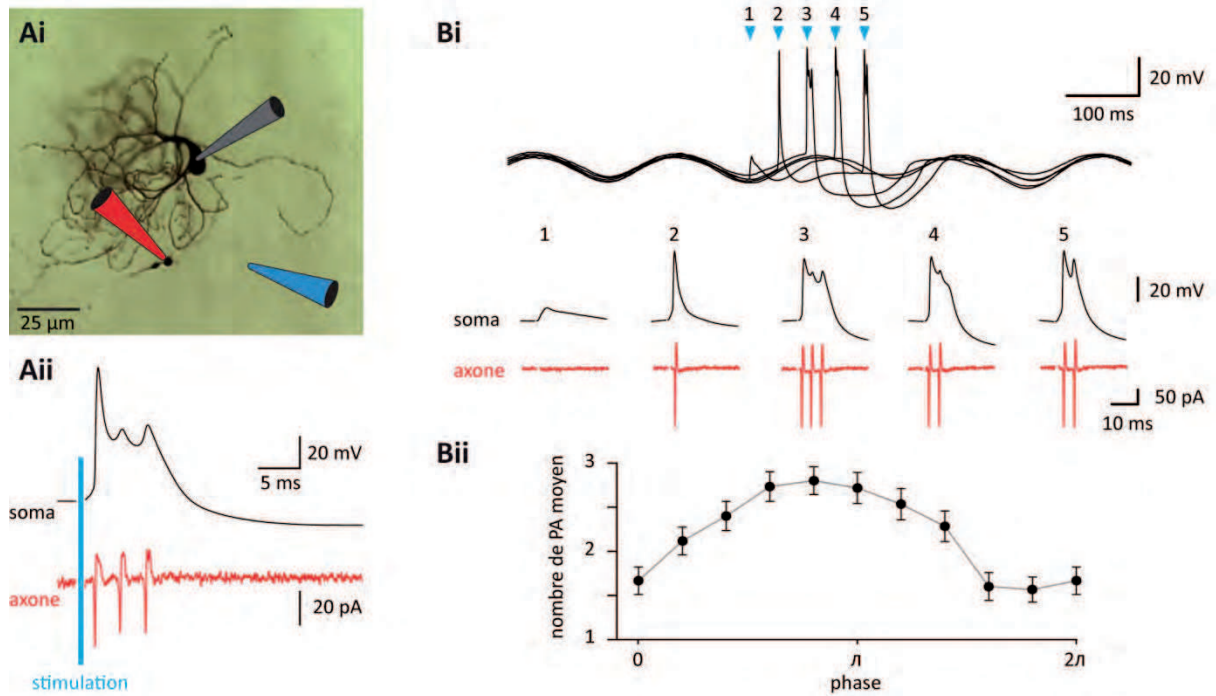


Figure 20 : Oscillations olivaires et afférences excitatrices. **Ai** : Enregistrement en configuration "cellule entière" d'un neurone olivaire (pipette grise) et en "cellule attachée" de son axone (pipette rouge). La pipette bleue symbolise l'électrode de stimulation des afférences excitatrices. **Aii** : Réponse enregistrée au soma (en noir) et dans l'axone (en rouge) sous forme de potentiels d'action. **Bi** : Réponse d'un neurone olivaire pour une stimulation produite à différents moments de la phase oscillatoire. **Bii** : Expression du nombre de potentiels d'action induits au niveau axonal en fonction de la phase oscillatoire durant laquelle la stimulation a été effectuée. *Note* : Les entrées excitatrices ne semblent pas réinitialiser l'oscillation du neurone. Adapté de Mathy et al., 2009.

critique dans le fonctionnement de cette structure, car il existe une corrélation positive entre l'activité de décharge d'une cellule olivaire et son mode oscillatoire, que celui-ci soit SSTO, LTO ou un mélange des deux (figure 20). Lors d'une stimulation tactile, une entrée excitatrice est produite dans l'olive inférieure qui peut également avoir pour conséquence une réinitialisation de l'oscillation (Khosrovani et al., 2007). Cependant, cet effet des entrées excitatrices est moins fréquemment observé qu'avec les connexions GABAergiques.

Bien que le couplage électrique ne soit pas nécessaire aux oscillations olivaires (Long et al., 2002), ces dernières semblent tout de même fortement potentialisées par cette organisation en réseau (Lampl and Yarom, 1997; Manor et al., 2000). Les *gap junctions* sont donc impliquées dans la décharge synchrone des neurones voisins (Llinás and Yarom, 1986; Khosrovani et al., 2007). Cette organisation signifie que le cervelet peut théoriquement moduler les oscillations olivaires via l'action GABAergique inhibitrice de la voie nucléo-olivaire sur le couplage des synapses électriques (Yarom and Cohen, 2002).

1.2. Régulation de l'olive inférieure par les entrées excitatrices

Lorsqu'une entrée synaptique ou une stimulation électrique active l'olive inférieure, ces neurones génèrent une réponse caractéristique manifestée par un potentiel d'action immédiatement suivi par une dépolarisation prolongée pouvant durer jusqu'à 10 ms et qui se termine par une AHP (*afterhyperpolarization*) prononcée (figure 20A) (Llinás and Yarom, 1981). L'intégration d'une telle séquence dans un neurone olivaire semble être dépendante de la phase de l'oscillation membranaire de la cellule (Mathy et al., 2009). Il a été proposé qu'une entrée excitatrice dans les neurones de l'olive peut aboutir à une décharge sous forme de bouffée (*burst*) de potentiels d'actions (figure 20Aii) (Eccles et al., 1966; Armstrong and Rawson, 1979; Maruta et al., 2007). Ces hypothèses ont récemment été validées dans le contexte des oscillations olivaires par des expériences de double *patch* enregistrant simultanément l'activité cellulaire et axonale d'un même neurone olivaire (Mathy et al., 2009). Ainsi, une entrée excitatrice se faisant durant la phase ascendante ou à l'apex de l'oscillation entrainera plus facilement une bouffée de potentiels d'actions (figure 20B).

1.3. Régulation de l'olive inférieure par les noyaux cérébelleux

Une population de neurones GABAergiques des noyaux cérébelleux projette de façon controlatérale vers l'olive inférieure (Hesslow, 1986; Andersson et al., 1988; Angaut and Sotelo, 1989; Ruigrok and Voogd, 1990; Fredette and Mugnaini, 1991; De Zeeuw et al., 1997b; Svensson et al., 2006). Cette voie est dirigée sur les glomérules olivaires (de Zeeuw et al., 1989) dans lesquels sont situés les *gap junctions* permettant le couplage électrique entre les neurones de cette structure (figure 19A) (Sotelo et al., 1974; King et al., 1976; de Zeeuw et al., 1990b). Ces connexions intra-glomérulaires des terminaisons GABAergiques jouent un rôle dans le contrôle de l'efficacité du couplage entre les neurones de l'olive inférieure et régulent ainsi les oscillations membranaires (figure 19B). La majeure partie des afférences GABAergiques de l'olive inférieure est supprimée lors d'une lésion des noyaux cérébelleux, montrant ainsi le rôle essentiel de cette voie dans l'inhibition

olivaire (Fredette and Mugnaini, 1991). Lorsque cette inhibition est diminuée, l'oscillation intrinsèque des cellules de l'olive augmente et conduit à une plus forte probabilité d'occurrence d'un potentiel d'action (Van Der Giessen et al., 2008). La voie nucléo-olivaire serait ainsi importante pour son implication dans le contrôle de la synchronisation des CS au niveau du cortex cérébelleux (Llinas et al., 1974; Sotelo et al., 1974; Lang et al., 1996).

L'existence de récepteurs GABA_A (récepteur GABA de type A) à la membrane des neurones de l'olive inférieure a été révélée lors d'expériences *in vitro* (Devor et al., 2001; Best and Regehr, 2009). Devor et collègues ont prouvé que ces récepteurs sont majoritairement représentés au niveau des dendrites (Devor et al., 2001). Best et Regehr ont montré que la transmission synaptique n'est efficace que pour des fréquences suffisamment élevées - supérieures à 10 Hz -, en accord avec la gamme d'activités spontanées des neurones des noyaux cérébelleux (Best and Regehr, 2009). Récemment, Bazzigaluppi et collaborateurs ont pu mettre à jour le rôle des entrées GABAergiques sur l'activité des cellules de l'olive inférieure lors d'expériences de *patch clamp* effectuées *in vivo* parallèlement à des stimulations des noyaux cérébelleux (Bazzigaluppi et al., 2012). Ces expériences, effectuées dans un contexte physiologique, ont permis d'observer un IPSP suivi d'un re-phasage de la synchronisation des oscillations olivaires (figure 19B). L'utilisation de DNDS (4,4-dinitrostilbene-2,2'-disulfonate - bloqueur des récepteurs GABA_A) a permis de montrer que les IPSP sont majoritairement dépendants de l'activation des récepteurs GABA_A.

Il existe également des voies indirectes de connexions excitatrices entre les noyaux cérébelleux et l'olive inférieure. En effet, les neurones de projections excitateurs des noyaux cérébelleux ciblent les structures du tronc cérébral ayant pour certaines - au niveau de la jonction méso-diencephalique (de Zeeuw et al., 1990a; Ruigrok and Voogd, 1995) - des projections excitatrices en direction de l'olive inférieure. Cette excitation indirecte pourrait induire une modulation de l'olive inférieure complémentaire à celle produite par la voie inhibitrice directe.

Les projections GABAergiques sur l'olive inférieure pourraient avoir un rôle dans les apprentissages moteurs du cortex cérébelleux (Andersson et al., 1988; Bengtsson et al., 2004) ou encore dans l'exécution de tâches motrices dépendantes de l'activité olivaire (Llinás and Yarom, 1986; Sotelo et al., 1986; Lang et al., 1996). Cependant, le rôle de cette voie nucléo-olivaire dans le contrôle et les apprentissages moteurs est toujours matière à débat (Medina et al., 2002; Llinás, 2011). Nous allons, par conséquent, focaliser notre attention sur les rôles potentiels de l'olive inférieure.

2. ACTIVITE OLIVAIRE ET FONCTIONNEMENTS CEREBELLEUX

2.1. Rôles des fibres grimpantes

L'activation des fibres grimpantes semble liée à l'initiation ou à la conclusion d'un mouvement (Keating and Thach, 1995). De plus, comme nous l'avons évoqué lors de la description des zones parasagittales, une fibre grimpante peut également être activée par une stimulation sensorielle. Il existe deux théories majeures relatives aux rôles des fibres grimpantes.

Selon une première hypothèse, l'oscillation infraliminaire du potentiel intrinsèque de membrane des cellules olivaires couplées par des *gap junctions* (Llinas et al., 1974; Llinás and Yarom, 1986; Lampl and Yarom, 1997) joue le rôle de régulateur temporel de l'activité des cellules de Purkinje situées en aval (Welsh et al., 1995; Yarom and Cohen, 2002). Les enregistrements multicellulaires des CS ont permis, par l'utilisation de cross-corrélogrammes, de mettre en évidence une activité de la décharge olivaire basée sur un rythme variant de 5 à 10 Hz (Llinás and Sasaki, 1989). Ce rythme est encore plus facilement identifiable lors d'injections d'harmaline et s'accompagne généralement de tremblements musculaires oscillants autour de 10 Hz (Llinás and Volkind, 1973; Welsh, 1998). Ces observations indiquent que le système des fibres grimpantes opère comme une horloge motrice - ou *pacemaker* - pouvant moduler l'initiation des mouvements (Jacobson et al., 2009). Les regroupements des afférences olivaires en zones et microzones dans le cortex cérébelleux auraient pour fonction d'imprimer localement une activité CS autour de 10 Hz. Cette hypothèse est cohérente avec les expériences montrant que la synchronisation des CS est plus forte au sein d'une zone antéropostérieure que dans le sens médio-latéral (Sugihara et al., 1993). Ainsi, les oscillations olivaires seraient à l'origine de la genèse des rythmes moteurs cérébelleux (Lampl and Yarom, 1993) et l'activité CS jouerait le rôle de synchronisateur ou de "chef d'orchestre" des activités corticales (Yarom and Cohen, 2002).

La vision alternative à cette première hypothèse propose que les fibres grimpantes ont une fonction d'instruction du mouvement et de correction des erreurs motrices (Marr, 1969; Albus, 1971). Ainsi, les fibres grimpantes signaleraient les écarts entre les prévisions des retours sensoriels de mouvements et les informations arrivant réellement au cervelet (Miall et al., 1993). Cette fonction comparatrice conduirait aux apprentissages moteurs du cortex cérébelleux en permettant l'initiation/le déclenchement de plasticités associatives au niveau des synapses des fibres parallèles (Ito, 2001), mais également dans les noyaux cérébelleux (Pugh and Raman, 2008, 2009). La fibre grimpante jouerait ainsi un rôle d'instructeur jusqu'à l'acquisition de l'apprentissage moteur (Ke et al., 2009). Un des paradigmes le plus étudié dans le cadre des apprentissages cérébelleux est celui du conditionnement de fermeture de la paupière (Gellman and Miles, 1985; Mauk and Donegan, 1997). Ce conditionnement consiste en la présentation d'un stimulus neutre - un son par exemple - associé à une stimulation - généralement un souffle d'air en périphérie de l'œil - entraînant une fermeture de la paupière. Le souffle d'air est appelé *stimulus* inconditionnel (SI) et le son *stimulus* conditionnel (SC). L'entraînement va consister en la présentation répétée de ces deux *stimuli* ; le son précédant toujours le souffle d'un délai maintenu constant (figure 21A). L'apprentissage est établi lorsque le *stimulus* conditionnel entraîne une fermeture anticipée de la paupière. L'observation de l'activité des neurones de l'olive inférieure et des noyaux cérébelleux montre qu'au début de l'acquisition, les fibres grimpantes sont très fortement recrutées, mais pas les neurones des noyaux du cervelet

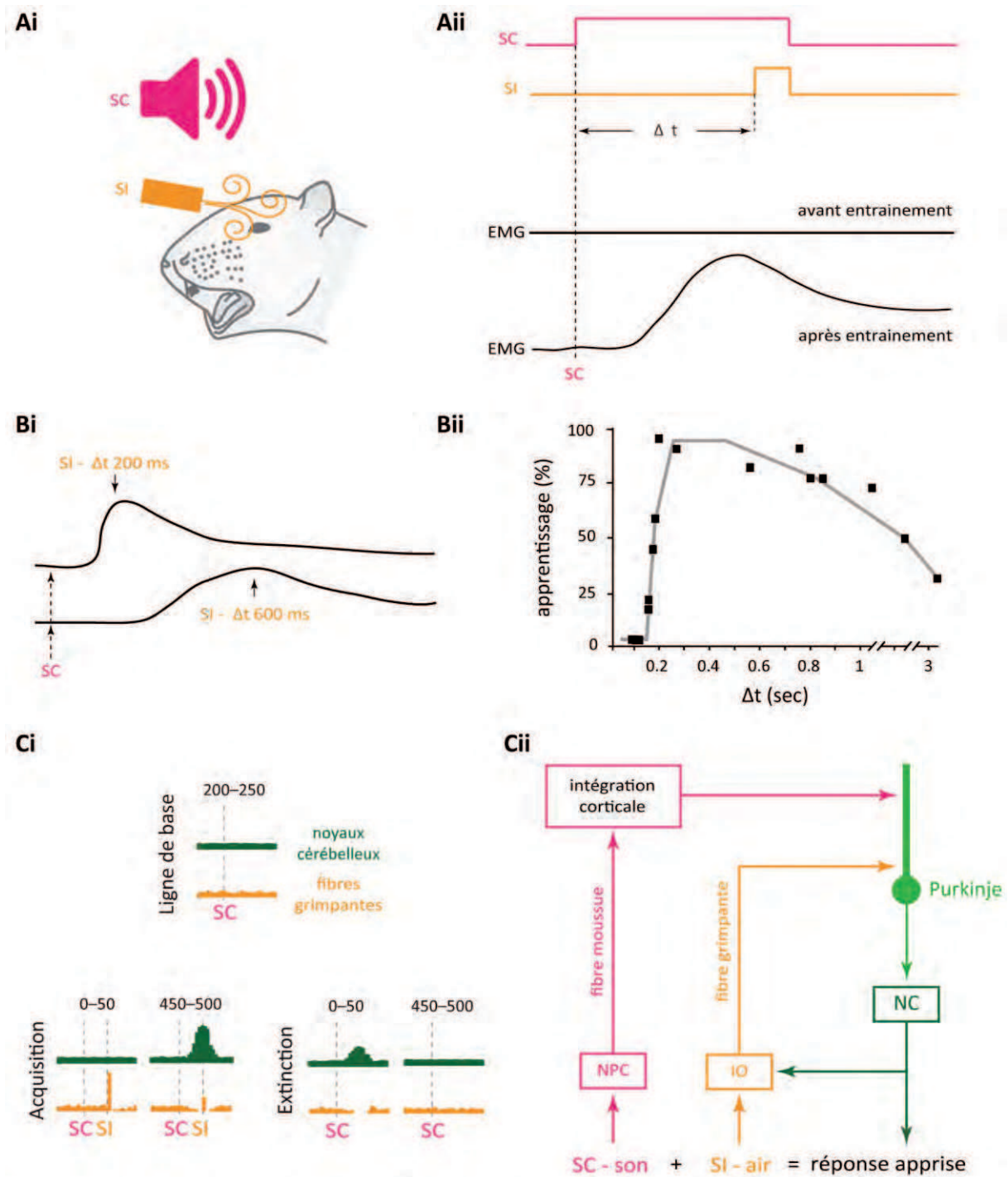


Figure 21 : Propriétés du conditionnement Pavlovien de fermeture de la paupière. **Ai** : Représentation schématique du paradigme expérimental. **Aii** : Pendant l'apprentissage, le son est présenté avant l'application du souffle d'air selon un délai (Δt) maintenu constant. Les lignes noires montrent l'enregistrement de la réponse de clignement au SC avant l'apprentissage (SC seul) et après l'apprentissage. **Bi** : La précision de l'apprentissage est dépendante du Δt . **Bii** : L'apprentissage est impossible pour des $\Delta t < 100$ ms puis devient de moins en moins précis pour des $\Delta t > 500$ ms. **Ci** : Activité des fibres grimpantes (orange) et des noyaux cérébelleux (vert). Les numéros des essais sont représentés au dessus des histogrammes. Adapté de Medina et al., 2002. **Cii** : Selon Mauk et Donegan, l'information relative au SC - le son dans notre cas - est traitée par la voie des fibres moussues et le SI - la bouffée d'air - par la voie des fibres grimpantes. L'apprentissage s'effectue alors par des changements de poids des entrées excitatrices sur les cellules de Purkinje et celles de noyaux cérébelleux. Adapté de Mauk et Donegan, 1997.

Abréviations : Δt = délai ; EMG = électromiogramme ; NC = noyaux cérébelleux ; NPC = noyaux précérébelleux ; IO = olive inférieure ; SC = stimulus conditionnel ; SI = stimulus inconditionnel.

(figure 21Ci). Une fois l'apprentissage en place, les noyaux cérébelleux présentent une augmentation d'activité correspondant à l'anticipation du SI et les fibres grimpantes ont une activité presque nulle (Medina et al., 2002). Le processus d'extinction - consistant à émettre le SC sans présenter le SI - montre que l'arrêt total de l'activité olivaire et l'activation des noyaux cérébelleux retrouve progressivement leur ligne de base. Dans ce paradigme, une lésion de l'olive inférieure par administration de 3-acétylpyridine (3-AP) empêche l'apprentissage (McCormick et al., 1985). Une lésion de cette même structure chez le rat adulte diminue les capacités de mémoires spatiales (Dahhaoui et al., 1992) et affecte également l'organisation temporelle du mouvement (Rondi-Reig et al., 1997). De nombreuses études ont ainsi pu démontrer le rôle important de l'olive inférieure dans différents apprentissages moteurs (Llinás et al., 1975; Mauk et al., 1986; Medina et al., 2002).

Ces deux visions du rôle des fibres grimpantes ne sont cependant pas incompatibles, même si leur intégration au sein d'un même modèle semble complexe (Mauk et al., 2000). Mauk propose que le cervelet contribue à l'exécution de mouvements par des apprentissages moteurs ayant été encodés pour un contexte temporel spécifique. Comme nous venons de le voir, le cervelet est capable d'apprentissages moteurs tels que le conditionnement de fermeture de la paupière (Raymond et al., 1996; Mauk and Donegan, 1997) ou encore les réflexes vestibulo-oculaires (Kettner et al., 1997). Cependant, il semble évident qu'un comportement moteur effectué dans un cadre temporel peu spécifique et peu précis soit de faible utilité. De cette idée émerge le concept de spécificité temporelle des apprentissages moteurs cérébelleux. Dans le conditionnement de fermeture de la paupière par exemple, le délai entre le SC - le son - et la présentation du SI - le souffle d'air - semble être un facteur-clé de cet apprentissage. Les études montrent que le conditionnement est efficace pour des délais variant de 150 à 500 ms et qu'il n'y a pas d'apprentissage possible si le délai est inférieur à 100 ms (figure 21B). De plus, lorsqu'il y a apprentissage, la réponse est émise juste avant l'occurrence du stimulus inconditionnel selon une chronologie temporelle très précise (figure 21B). Les fibres grimpantes ont donc un rôle "d'instructeur" qui va permettre l'augmentation d'activité des noyaux cérébelleux et le déclenchement anticipé de fermeture de la paupière. Selon Mauk, l'information du SC est relayée par les fibres moussues jusqu'au cortex cérébelleux. L'activité décalée dans le temps des fibres moussues et des fibres grimpantes aboutit probablement à la mise en place de plasticités au niveau du cortex cérébelleux, permettant l'acquisition du conditionnement (figure 21Cii). Il est probable que la diminution de la réponse des fibres grimpantes se fasse sous contrôle de la voie nucléo-olivaire qui, par l'augmentation de son activité lors de l'apprentissage, va inhiber l'olive inférieure (figure 21C). Une telle spécificité temporelle a également été trouvée pour l'adaptation du réflexe vestibulo-oculaire (Raymond et al., 1996). Ces expériences permettent donc de conclure que le cervelet apprend et induit des réponses adaptées dans un cadre temporel bien défini.

2.2. Régulation du cortex cérébelleux par l'activité olivaires

2.2.1. Influence du CS sur l'activité de la cellule de Purkinje

Nous avons déjà évoqué la mono-innervation d'une cellule de Purkinje par une fibre grimpante, ainsi que son rôle dans le déclenchement d'un CS. Ce dernier perturbe l'autorhythmicité des SS par l'induction d'une pause dans l'activité de la cellule de Purkinje. La longueur de cette pause

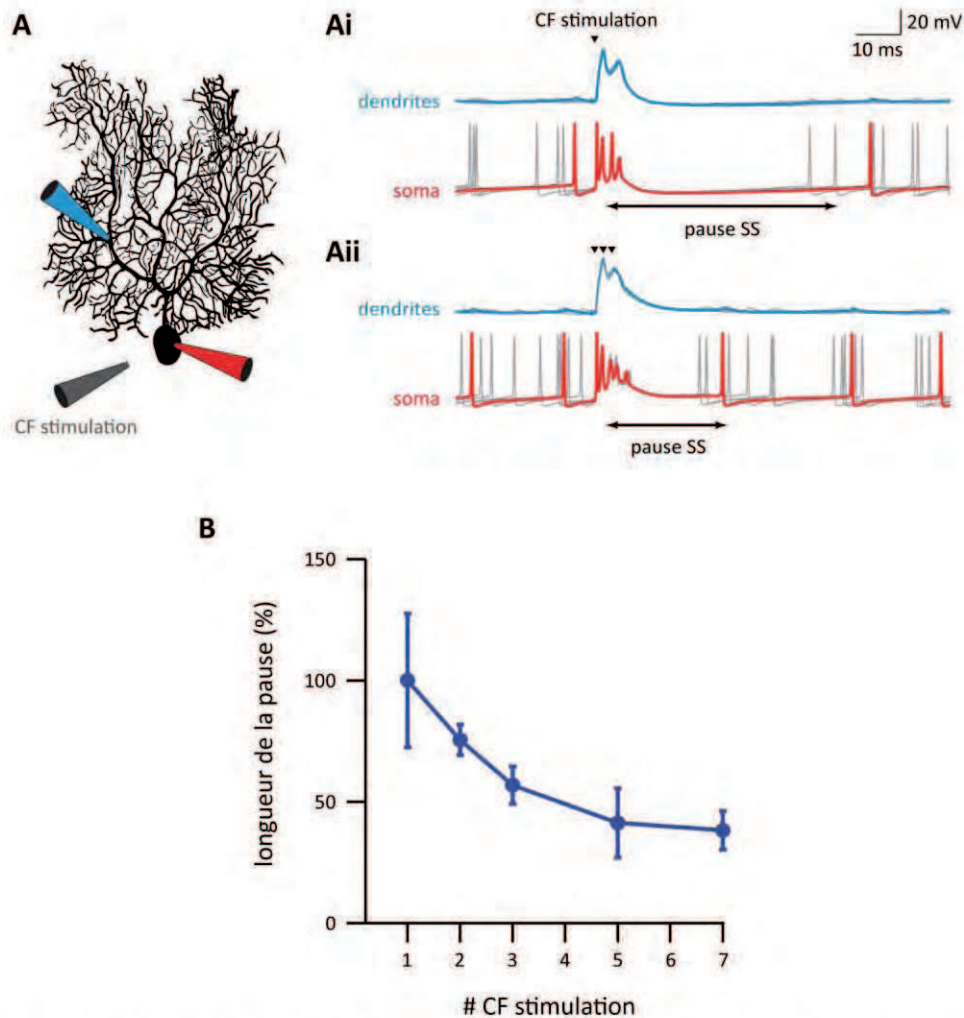


Figure 22 : Influence des CS sur la décharge des SS. **A** : Représentation du paradigme expérimental. Les pipettes rouge et bleue représentent l'enregistrement en *patch clamp* respectivement du corp cellulaire et des dendrites de la cellule de Purkinje. La stimulation de la fibre grimpanche se fait via la pipette noire. **Ai** : Réponses dendritiques (bleu) et somatiques (rouge) pour une stimulation de fibre grimpanche (triangle plein). **Aii** : Même représentation pour trois stimulations successives (intervalle de 2 ms). **B** : Longueur de la pause des SS (voir pannels Ai & Aii) induite en fonction du nombre de stimulations (intervalle inter-stimulation = 2 ms). Veuillez noter que les SS ne sont pas rétropropagés dans l'arbre dendritique (figure Ai & Aii tracé bleu). Adapté de Mathy et al., 2009.

Abréviation : CF = climbing fibre.

est dépendante du nombre de potentiels d'actions olivaires impliqués dans le déclenchement du CS (figure 22A). La variation de ce nombre proviendrait des propriétés des neurones olivaires à décharger en *burst* en fonction de la phase oscillatoire dans laquelle ils se trouvent (Mathy et al., 2009). La dépolarisation et l'AHP induites lors de la production d'un CS vont ainsi être fonction de la quantité de potentiels d'actions arrivant à la synapse fibre grimpante-cellule de Purkinje (figure 22B).

De nombreuses études montrent que l'activité tonique des SS est inversement corrélée à la fréquence de décharge des CS (Graf et al., 1988; Yakhnitsa and Barmack, 2006). Suivant ce constat, une lésion de l'olive inférieure augmente l'activité SS et à l'inverse, une stimulation de l'olive inférieure la diminue (Colin et al., 1980; Rawson and Tilokskulchai, 1981; Montarolo et al., 1982; Demer et al., 1985; Savio and Tempia, 1985). Cette co-dépendance pourrait être expliquée par un rôle régulateur différent des fibres parallèles et des fibres grimpantes. Selon certains auteurs, l'activité spontanée des fibres parallèles conduit à une augmentation de plus en plus élevée de la décharge des cellules de Purkinje. L'activité spontanée de CS aurait ainsi pour fonction de corriger cette tendance à la potentialisation excessive par l'induction de plasticités synaptiques (Mauk and Donegan, 1997; Miall et al., 1998).

2.2.2. Plasticités du cortex cérébelleux

De nombreuses plasticités ont pu être montrées à la synapse entre les cellules en grain et les cellules de Purkinje. Les phénomènes de dépression à long terme (LTD) ont été proposés pour être impliqués dans les apprentissages moteurs cérébelleux (Marr, 1969; Albus, 1971). Comme nous venons de le décrire, les fibres grimpantes jouent un rôle central dans certains apprentissages simples comme le conditionnement de clignement de la paupière ou le réflexe vestibulo-oculaire (Gilbert and Thach, 1977; McCormick and Thompson, 1984). L'occurrence d'une LTD post-synaptique à la synapse entre les cellules en grain et les cellules de Purkinje est dépendante de la co-occurrence d'un CS et des entrées de fibres parallèles (figure 23). La précision temporelle à laquelle ces deux événements arrivent joue un rôle central dans l'établissement et la longévité de la plasticité. Ainsi, pour induire une LTD, il faut que le CS arrive entre 100 et 150 ms après la bouffée de potentiels d'action des fibres parallèles (figure 23Bii). Sur le plan moléculaire, la combinaison successive de ces deux informations active les récepteurs AMPA et mGluR1 (Metabotropic glutamate receptor 1). Il s'en suit une production d'IP₃ (inositol-1,4,5-triphosphate) - sous contrôle de la PLC (phospholipase C) - qui entraîne une forte libération des stocks de Ca²⁺ du réticulum endoplasmique, aboutissant à l'activation de la PKCα (proteine kinase Cα) et de la αCaMKII (α-Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II). La PKCα agit par phosphorylation de la S880 (Serine-880) de la sous-unité de GluR2 conduisant à l'internalisation du récepteur AMPA associé (pour revue voir (Ito, 2001; Gao et al., 2012)).

L'implication des CS dans les plasticités hétéro-synaptiques du cortex cérébelleux a également pu être montrée au niveau de la synapse entre les grains et les interneurons de la couche moléculaire (Rancillac and Crépel, 2004). Ainsi, un phénomène de potentialisation à long terme (LTP) post-synaptique peut être observé lors de l'activation synchrone des fibres parallèles et d'un CS d'une cellule de Purkinje située à proximité. La résolution temporelle nécessaire à

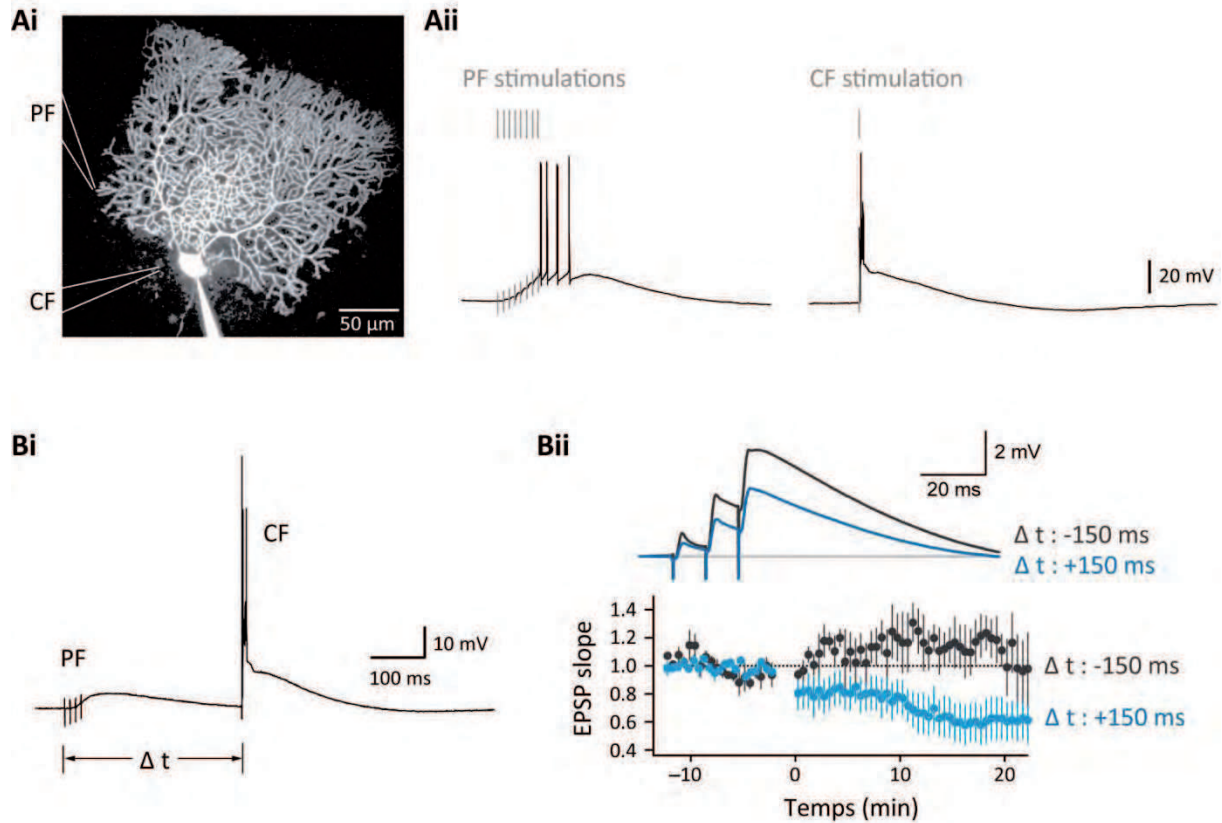


Figure 23 : Dépression à long terme à la synapse grain-Purkinje. **Ai** : Enregistrement en *patch clamp* d'une cellule de Purkinje couplée à la stimulation des fibres parallèles et de sa fibre grimpanche. **Aii** : Exemple de réponse enregistrée lors de la stimulation séparée des deux afférences. **Bi** : Paradigme d'induction de plasticité consistant en 50 paires de stimulations toutes les 2s. Chaque paire est composée de 5 stimulations des fibres parallèles à 100 Hz et d'une stimulation de la fibre grimpanche. Pour le protocole de LTP la fibre grimpanche est stimulée 150 ms après les fibres parallèles (pour le protocole contrôle, les deux stimuli sont inversés). **Bii** : Représentation des réponses observées après induction d'un protocole de LTP (en bleu) ou d'un protocole contrôle (en noir). Adapté de Wang et al., 2000.

Abbréviations : Δt = délai ; CF = climbing fibre ; PF = parallel fibre.

l'établissement de cette plasticité n'est pas encore clairement définie. Cette forme de potentialisation serait dépendante du NO (nitric oxide) et/ou de l'AMP cyclique.

Il est possible d'induire une LTD au niveau pré-synaptique de la synapse grain-Purkinje (Qiu and Knöpfel, 2009). Des LTP au niveau post-synaptique (Lev-Ram et al., 2002; Coesmans et al., 2004) et pré-synaptique (Salin et al., 1996) ont également été trouvées à cette synapse. Ces phénomènes de LTP et LTD n'impliquent toutefois pas nécessairement une action de la fibre grimpante.

2.3. Régulation des noyaux cérébelleux par l'activité olivaire

Les axones des cellules olivaires produisent des collatérales en direction des noyaux cérébelleux dont les effets excitateurs sont encore mal décrits. Des expériences d'injection d'harmaline dans l'olive inférieure et de stimulations électriques massives de la substance blanche ont permis de révéler une séquence excitation-inhibition dans les noyaux profonds. Selon Llinas et Muhlethaler, la composante excitatrice de cette séquence serait sous contrôle des collatérales des fibres grimpantes (Llinás and Mühlethaler, 1988). Cependant, ces expériences de stimulations massives ne permettent pas de quantifier le poids réel des connexions olivo-nucléaires.

Un potentiel d'action olivaire va être transmis aux noyaux cérébelleux directement via la collatérale des fibres grimpantes - entrée excitatrice - ou indirectement par le déclenchement d'un CS au niveau cortical. Si les cellules de Purkinje et la collatérale de la fibre grimpante qui les innervent contactent le même neurone des noyaux cérébelleux, alors l'enregistrement de ce dernier devrait être caractérisé par une séquence excitation - inhibition lors de l'émission d'un potentiel d'action olivaire. Blenkinsop & Lang ont enregistré parallèlement l'activité CS de plusieurs cellules de Purkinje ainsi que la décharge de neurones des noyaux cérébelleux. L'utilisation de *cross-correlogram* a permis d'extraire des paires de neurones fonctionnellement connectés, constituées d'une cellule de Purkinje et d'un neurone des noyaux cérébelleux. Ces paires extraites ont permis de révéler que, dans 24% des cas, il existe une boucle olivo-cortico-nucléaire dans laquelle le contact excitateur de la collatérale est suffisant pour induire une augmentation de décharges des neurones des noyaux cérébelleux (Blenkinsop and Lang, 2011).

En conclusion, les collatérales olivaires sont capables d'induire une excitation aboutissant à l'augmentation de l'activité des noyaux cérébelleux, mais la description de ces entrées ainsi que les types cellulaires contactés au sein de cette structure demandent à être affinés.

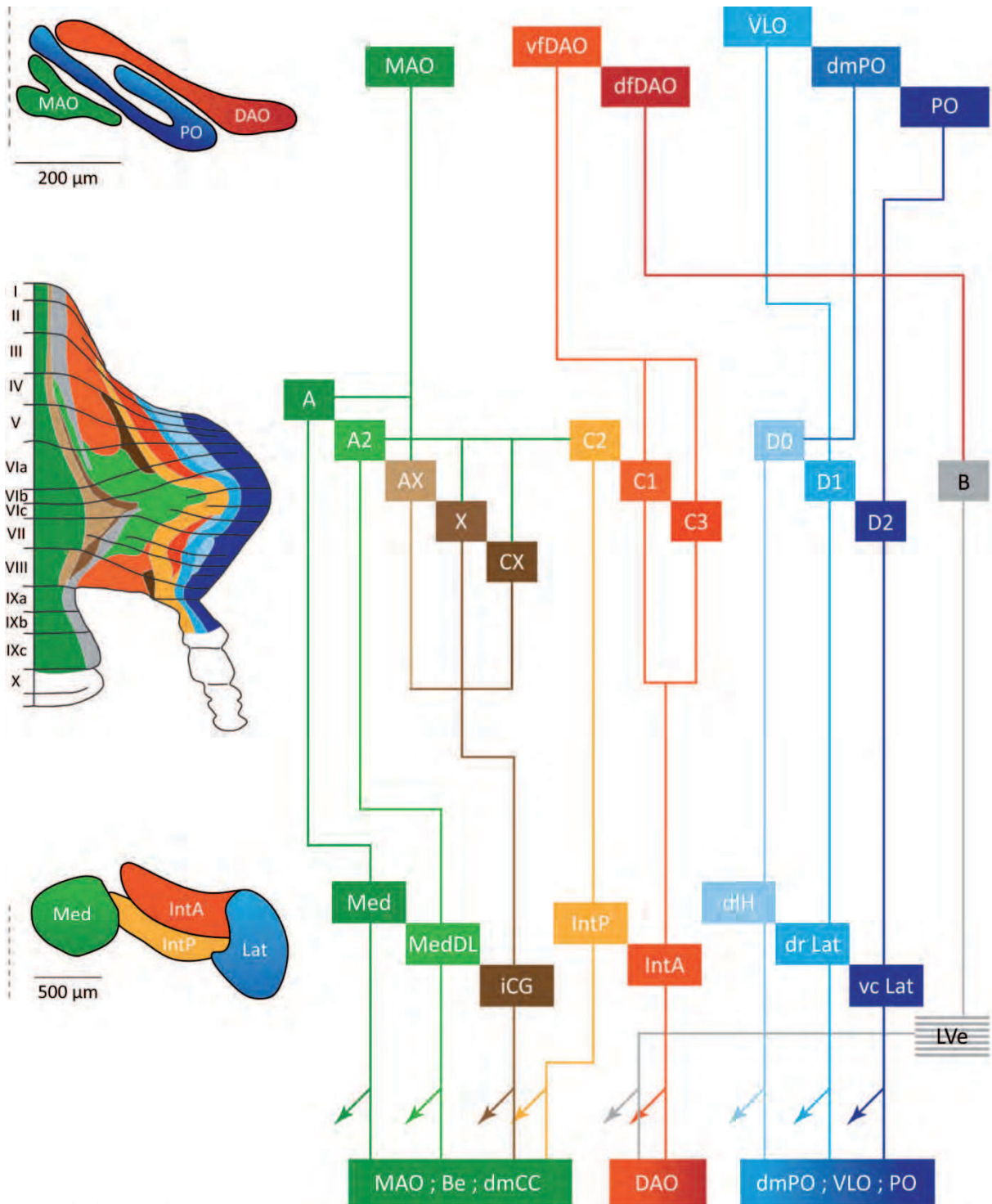


Figure 24 : Boucle olivo-cortico-nucléo-olivaire. Reconstruction des connexions organisées entre l'olive, le cortex et les noyaux cérébelleux (synthèse de la littérature). Les flèches de couleurs représentent les neurones de projections nucléaires qui ne sont pas dirigés sur l'olive inférieure. *Note :* les connexions olivo-nucléaires constituées par les collatérales des fibres grimpantes ne sont pas représentées sur ce schéma.

Abréviations olive inférieure : Be = Beta subnucleus ; DAO = dorsal accessory olive ; dfDAO = ventral fold of the DAO ; dmCC = dorsomedial cell column ; dmPO = dorsomedial groupe of the PO ; MAO = medial accessory olive ; PO = principal olive ; vfDAO = dorsal fold of the DAO ; VLO = ventrolateral outgrowth.

Abréviations noyaux cérébelleux : diH = dorsolateral hump ; dr Lat = dorsolateral part of the lateral cerebellar nucleus ; iCG = interstitial cell groups ; IntA = anterior interposed nucleus ; IntP = posterior interposed nucleus ; Lat = lateral cerebellar nucleus ; LVe = lateral vestibular nucleus ; Med = medial cerebellar nucleus ; MedDL = dorsolateral protuberance ; vc Lat = ventrocaudal part of the lateral cerebellar nucleus.

3. ORGANISATION FONCTIONNELLE ET SOMATOTOPIE CEREBELLEUSE

Une zone longitudinale telle que nous l'avons présentée précédemment se définit selon les afférences olivo-corticales qu'elle reçoit, ainsi que par ses projections cortico-nucléaires. Les fibres grimpantes provenant d'une même subdivision olivaire vont faire synapse sur une même bande longitudinale de cellules de Purkinje (Groenewegen et al., 1979; Voogd et al., 2003; Sugihara and Shinoda, 2004). En retour, les projections des cellules de Purkinje ainsi contactées vont converger vers une région spécifique des noyaux cérébelleux et vestibulaires (Buisseret-Delmas and Angaut, 1993; Pijpers et al., 2005; Sugihara et al., 2009). Ces connexions forment des complexes discrets olivo-cortico-nucléaires retrouvés à la fois lors d'études fonctionnelles et anatomiques, et dont l'organisation détaillée est présentée [figure 24](#). Les connexions olivo-nucléaires et nucléo-olivaires directes sont régulièrement associées à cette organisation. Cependant, les difficultés techniques relatives à l'étude simultanée de ces deux structures font que nous disposons de peu d'informations sur l'organisation fonctionnelle de ces interconnexions.

De nombreux auteurs font l'hypothèse de l'existence d'une boucle olivo-cortico-nucléo-olivaire qui suit l'organisation topographique des zones parasagittales (Ruigrok and Voogd, 1990; Ruigrok, 1997; Apps and Hawkes, 2009). Leur conclusion se base essentiellement sur des traçages précis des connexions nucléo-olivaires qui semblent correspondre à l'organisation olivo-cortico-nucléaire définie dans le cadre des bandes longitudinales ([figure 24](#)). Sur le plan physiologique, Marshall et Lang observent, lors de l'application de picrotoxine sur le cortex cérébelleux, une augmentation de la décharge des SS corrélée positivement avec une augmentation de la synchronisation et de la décharge des CS. A l'inverse, l'application de muscimol induit une diminution de la décharge des SS et des CS parallèlement à une réduction de la synchronisation de ces derniers. Ils concluent à l'existence d'un circuit partant des cellules de Purkinje et induisant une désinhibition des cellules olivaires permettant à l'activité SS de réguler la synchronisation des CS (Marshall and Lang, 2009). Cependant, ce type d'approche pharmacologique ne présente pas de bonne résolution spatiale et temporelle. De plus, l'effet au niveau des noyaux cérébelleux n'est pas mesuré, rendant toute interprétation sur l'état fonctionnel du réseau plus complexe. Enfin, la corrélation négative entre la fréquence de décharge des SS et celle des CS historiquement observée se transforme en corrélation positive sans pour autant qu'une explication soit réellement proposée.

La connexion olivo-nucléaire - produite par les collatérales des fibres grimpantes - semble être organisée topographiquement au sein du même réseau olivo-cortico-nucléaire. Sugihara et Shinoda ont effectué des remplissages de différentes subdivisions olivaires et ont observé les projections axonales au sein du cortex et des noyaux cérébelleux (Sugihara and Shinoda, 2004). Ils ont pu conclure que les collatérales des fibres grimpantes sont topographiquement organisées au sein d'une boucle olivo-cortico-nucléaire et ceci pour toutes les sous-divisions de l'olive inférieure (Sugihara and Shinoda, 2007; Blenkinsop and Lang, 2011). Ces branchements topographiquement organisés ont également été retrouvés lors d'études fonctionnelles mesurant simultanément l'activité olivaire dans le cortex cérébelleux et dans la région des noyaux profonds associés (Blenkinsop and Lang, 2011).

4. QUESTIONS ET INTERET SCIENTIFIQUE

Les données physiologiques et anatomiques s'accordent donc à dire que la connexion entre l'olive, le cortex et les noyaux cérébelleux est organisée sous la forme de modules fonctionnels. Les collatérales des axones olivaires en direction des noyaux cérébelleux suivent, au moins partiellement, cette même structuration. Cependant, même si cette organisation est avérée, le retour fonctionnel des noyaux cérébelleux vers l'olive inférieure au sein de cette boucle est toujours incertain.

Par conséquent, les questions faisant l'objet de notre attention dans ce manuscrit sont :

- Existe-t-il une boucle fermée olivo-cortico-nucléo-olivaire ?
- Si oui, est-il possible de l'activer spécifiquement et d'en observer la fonctionnalité ?

Savoir identifier les événements qui initient les CS est crucial pour la compréhension des processus cérébelleux. Sur la base de ce constat, Miall et collaborateur proposent qu'une augmentation de l'activité SS induit une désinhibition olivaire menant à l'induction d'un CS dont le rôle serait de réduire la fréquence de décharges des cellules de Purkinje, afin de maintenir le cortex cérébelleux dans une "gamme opérationnelle" (Miall et al., 1998). Cependant, cette proposition théorique n'est pas appuyée par des éléments expérimentaux forts et n'inclut également pas que cette relation entre les SS et les CS se fasse au sein d'une boucle fermée.

MATERIELS ET METHODES

L'OPTOGENETIQUE & L'ETUDE DES RESEAUX

La question que nous projetons d'étudier nécessite l'enregistrement de l'activité des neurones des noyaux cérébelleux, des cellules de Purkinje et des neurones de l'olive inférieure. Il est possible de s'affranchir des enregistrements de l'olive inférieure par la mesure de l'activité CS des cellules de Purkinje qui est le reflet direct des potentiels d'action olivaires. La seconde étape est de pouvoir stimuler spécifiquement et précisément, aussi bien au niveau spatial que temporel, l'une des trois voies constituée par cette boucle. Pour ce faire, nous avons opté pour l'utilisation des techniques d'optogénétiques dont nous allons maintenant décrire les principes, les avantages et les inconvénients.

1. PRINCIPES ET FONCTIONNEMENT

L'optogénétique est issue de la combinaison de méthodes du génie génétique et de l'optique. L'objectif de ces techniques est d'induire un gain ou une perte de fonction, sous contrôle d'une stimulation lumineuse, au niveau d'un type cellulaire spécifique situé dans un tissu vivant. L'utilisation des techniques d'optogénétiques nécessite donc de pouvoir :

- Induire une stimulation lumineuse dans le tissu cible.
- Diriger l'outil de contrôle - généralement une protéine - dans les cellules d'intérêt.
- Pouvoir enregistrer et analyser l'activité évoquée via l'utilisation de techniques d'imagerie ou d'électrophysiologie.

En 1971, la première protéine contrôlée par la lumière est observée à la membrane de microorganismes. Cette protéine est caractérisée comme étant une pompe impliquée dans la régulation des flux ioniques à travers la membrane plasmique (Oesterheld and Stoeckenius, 1971). Cette étude a été suivie par la découverte de nouveaux membres de cette famille comme l'*halorhodopsin* en 1977 (Matsuno-Yagi and Mukohata, 1977) et la *channelrhodopsin-1* en 2002 (Nagel et al., 2002).

La première utilisation d'un outil optogénétique dans des neurones de mammifères (chez le rat) appartient au groupe de Miesenböck qui, à la suite de nombreuses manipulations génétiques, est parvenu à induire une dépolarisation entraînant une décharge de potentiels d'action faisant suite à une stimulation lumineuse (Zemelman et al., 2002). Cependant, la triple transfection utilisée par ces derniers rend l'utilisation de cette technique complexe et peu reproductible. L'utilisation des opsines microbiennes par le groupe de Karl Deisseroth a permis la démocratisation et l'envol de cette technique (Boyden et al., 2005; Deisseroth et al., 2006). Ainsi, l'utilisation de la *channelrhodopsin-2* (ChR2) et de l'*halorhodopsin* au cours de la dernière décennie a permis de prouver la possibilité d'exciter ou d'inhiber un neurone rapidement en réponse à des stimulations lumineuses de différentes longueurs d'ondes (figure 25A). Les outils optogénétiques ont depuis été largement développés et affinés permettant l'induction de courants excitateurs et inhibiteurs par d'autres protéines, ou encore l'activation d'effecteurs intracellulaires activables par la lumière entraînant une cascade biochimique (figure 25B) (Wu et al., 2009).

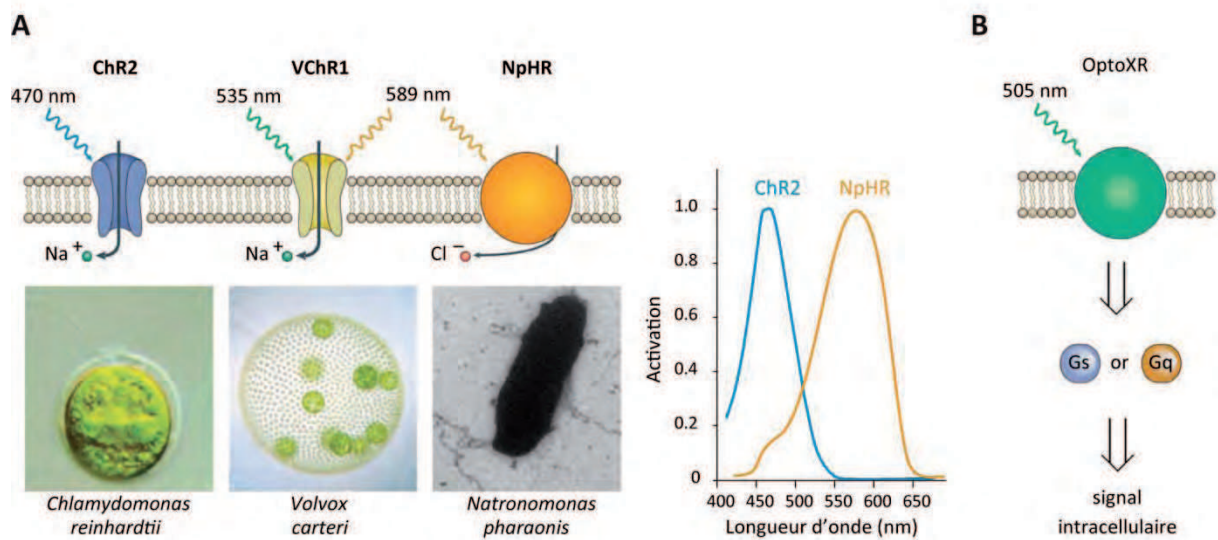


Figure 25 : Optogénétique. **A** : Protéines transmembranaires sensibles à la lumière et leurs organismes d'origine : *Chlamydomonas reinhardtii* pour la ChR2 ; *Volvox carteri* pour la VChR1 ; *Natronomonas pharaonis* pour la NpHR. La ChR2 et la VChR1 sont des canaux cationiques et la NpHR est une pompe chlorure. Notez que les longueurs d'ondes permettant l'activation de la ChR2 et de la NpHR se recouvrent peu permettant une stimulation séparée de ces deux protéines. **B** : Exemple de rhodopsin synthétique permettant un contrôle optique d'une signalisation biochimique intracellulaire spécifique. D'après Zhang et al., 2010.

L'utilisation des techniques d'optogénétiques permet donc un contrôle temporel fin et spécifique d'un type cellulaire, qu'il est impossible d'obtenir avec des stimulations électriques et/ou pharmacologiques. De plus, l'effet réversible et non invasif de cet outil facilite son utilisation aussi bien pour les recherches *in vitro* que pour des tests comportementaux chez l'animal éveillé (Huber et al., 2008).

2. LES APPROCHES TRANSGENIQUES ET VIRALES

L'expression de protéines photo-activables au sein d'un type neuronal ciblé peut se faire selon deux voies. La première stratégie consiste à générer une souris transgénique en utilisant par exemple un BAC (*bacterial artificial chromosome*) qui permettra l'insertion de la construction photo-activable dans le génome de l'animal sous le contrôle d'un promoteur spécifique du type cellulaire ciblé. La seconde stratégie consiste à utiliser un vecteur viral - de type *adeno-associated virus* ou *lentivirus* - dans lequel la protéine photo-activable est encodée sous contrôle d'un promoteur fort et ubiquitaire. L'intégration de ces vecteurs dans le génome de neurones permet une forte expression de la construction. L'utilisation des systèmes *Cre-Lox* permet de réduire l'expression de la molécule photo-activable à un type cellulaire spécifique (Zhang et al., 2010).

Les approches virales sont rapidement mise en place - environ un mois - et permettent une plus grande liberté d'adaptation que les approches transgéniques. Cependant, l'expression des protéines d'intérêt va dépendre de la quantité du virus administré, du positionnement du site d'injection stéréotaxique et des variations des paramètres expérimentaux dépendant de l'environnement et du sujet injecté. Dans ces conditions, la reproductibilité des expériences utilisant des injections de virus est techniquement difficile.

La construction d'une lignée de souris transgénique est complexe et lente (environ un an). De plus, le niveau d'expression des protéines d'intérêts sous contrôle d'un promoteur spécifique est souvent trop faible pour permettre une stimulation lumineuse des neurones cibles. Néanmoins, une fois la lignée de souris stabilisée et caractérisée, la distribution spatiale des cellules exprimant la protéine photo-activable est constante entre les différents individus, permettant ainsi la reproduction des conditions expérimentales. De plus, l'effort à fournir en amont pour la construction et le développement de la lignée peut être compensé par le temps gagné à ne pas faire les injections virales.

Une étude récente a mis à jour une morphologie anormale et un mauvais adressage des axones de cellules pyramidales du cortex exprimant la ChR2(H134R) (Miyashita et al., 2013). Ces résultats sont importants, car ils montrent pour la première fois un aspect potentiellement néfaste de l'utilisation des outils optogénétiques.

3. LA CHANNELRHODOPSINE2 (H134R) EXPRIMEE DANS LES CELLULES DE PURKINJE

La production d'une lignée transgénique de souris exprimant la ChR2(H134R) spécifiquement dans les cellules de Purkinje a été lancée en 2009 dans le cadre d'une collaboration avec Clément LENA (ENS, Paris) et Stéphane DIEUDONNE (ENS, Paris) ayant, entre autres, pour objectif de répondre aux questions que nous venons d'évoquer.

Deux constructions exprimant respectivement les protéines de fusion "ChR2-mCherry" et "ChR2-YFP" sous contrôle de l'élément régulateur du gène *Pcp2* (*Purkinje cell protein-2*) ont été produites par l'utilisation d'un BAC. La construction "ChR2-mCherry" permet théoriquement d'obtenir une expression de la ChR2(H134R) à la membrane des cellules de Purkinje visualisable lors de l'excitation de la *mCherry*. Cette stratégie permet d'examiner l'expression de la construction sans provoquer une activation des ChR2, les longueurs d'ondes révélant la *mCherry* étant différentes de celles provoquant l'ouverture de la ChR2. En revanche, la visualisation par la lumière bleue de la seconde construction active à la fois la ChR2 et l'*YFP* (*yellow fluorescent protein*). La construction d'une lignée "ChR2-YFP", moins intéressante d'un point de vue théorique, s'explique car l'expression de la "ChR2-mCherry" peut présenter une oligomérisation ayant pour conséquence des problèmes d'expression de la ChR2(H134R) à la membrane plasmique.

La ChR2(H134R) a été préférée à la ChR2 car, même si elle présente une cinétique d'ouverture et de fermeture un peu plus lente, elle est plus sensible à la lumière et montre une désensibilisation moins importante (Lin, 2011). Les fondateurs des deux lignées obtenues présentant un fond génétique C57BL/6 (*C57 black 6*) ont été reproduit au fil des générations avec des animaux CD1 n'étant pas consanguins et ayant un rythme de reproduction plus élevé. L'expression de la ChR2(H134R) dans ces deux lignées est détaillée dans la partie résultats de ce manuscrit.

La création de ces lignées de souris pourrait permettre de traiter les questions suivantes :

- Quel est l'effet de l'activation des cellules de Purkinje sur les noyaux cérébelleux ainsi que sur les structures de projections de ces derniers ?
- Quel est l'effet des collatérales des cellules de Purkinje sur les neurones du cortex cérébelleux ?
- Quel sont les effets de stimulations effectuées chez l'animal éveillé ? Est-il possible de créer des modèles de pathologie cérébelleuse sur des périodes de temps contrôlable ?
- Est-il possible, *in vitro*, de modifier l'activité d'un compartiment précis de l'arbre dendritique de la cellule de Purkinje ? Cela permettrait l'étude des plasticités synaptiques dans de petits volumes.

MATERIELS ET METHODES

La partie "matériel et méthode" est présentée dans les données supplémentaires de l'article. Certaines informations complémentaires figurent également dans les résultats. De plus, des fiches techniques détaillées se trouvent en annexe afin de faciliter la reproduction de mes conditions expérimentales :

- protocole de PCR
- protocole pour les expériences comportementales - Rotarod
- protocole d'anesthésie et de chirurgie
- protocole pour les enregistrements juxta-cellulaire *in vivo* (voir également Pinault, 1996).

RESULTATS

Ma première année de doctorat a été consacrée à la caractérisation des deux lignées de souris transgéniques Chr2(H134R)-YFP et Chr2(H134R)-mCherry - présentes lors de mon arrivée au laboratoire, ainsi qu'au développement d'un poste d'électrophysiologie *in vivo*. Les travaux réalisés par la suite ont abouti à la publication d'un article directement intégré aux résultats de ce manuscrit. Je commencerai par une présentation détaillée de la lignée de souris transgéniques qui sera suivie de la présentation de l'article, auquel s'ajouteront quelques résultats complémentaires. Je finirai par la présentation de données préliminaires concernant, entre autres, l'étude des connexions putatives entre les cellules de Purkinje et les autres types cellulaires du cortex cérébelleux via les collatérales.

CARACTERISATION DE LA LIGNEE

5 fondateurs - 3 pour la construction Chr2-YFP ; 2 pour la construction Chr2-mCherry - étaient présents lors de mon arrivée au laboratoire en septembre 2010 (figure 26A & B). Ma première tâche a alors été d'isoler la lignée répondant positivement aux trois questions suivantes :

- La Chr2 est-elle exprimée dans toutes les cellules cibles ?
- La Chr2 est-elle fonctionnelle ?
- Les souris transgéniques présentent-elles une absence de phénotype comportemental ?

1. EXPRESSION DE LA CHR2

La procédure de sélection d'une lignée que nous avons suivie consiste à la vérification de l'expression de la Chr2 dans les cellules de Purkinje de souris appartenant à la seconde génération. La fusion avec des marqueurs "YFP" ou "mCherry" dans les deux constructions permet de visualiser directement l'expression de la Chr2. Nous avons pu isoler 3 fondateurs - 2 pour la construction Chr2-YFP et 1 pour la Chr2-mCherry - pour lesquels les descendants semblaient exprimer la Chr2 dans les cellules de Purkinje.

1.1. Expression de la Chr2-mCherry : lignée U123

L'observation au microscope à épifluorescence de tranches de cervelets fixées au PFA (4%) issues de la lignée U123 a permis d'observer une expression faible et hétérogène de la Chr2 à la membrane plasmique (figure 26Ai). Il semble également que, pour les cellules positives, l'expression de la Chr2-mCherry soit cantonnée au niveau du corps cellulaire des cellules de Purkinje, probablement dans le réticulum endoplasmique (figure 26Aii). Ces résultats sont cohérents avec les phénomènes d'oligomérisation de la "mCherry" qui induisent des problèmes de trafic intracellulaire. De plus, lors d'expériences d'électrophysiologies réalisées en configuration *voltage clamp* (VC), l'application d'un stimulus lumineux a permis d'enregistrer des entrées faibles de courant confirmant la quantité réduite de Chr2 exprimée à la membrane des cellules enregistrées. Pour toutes ces raisons, nous avons choisi de ne pas utiliser cette lignée.

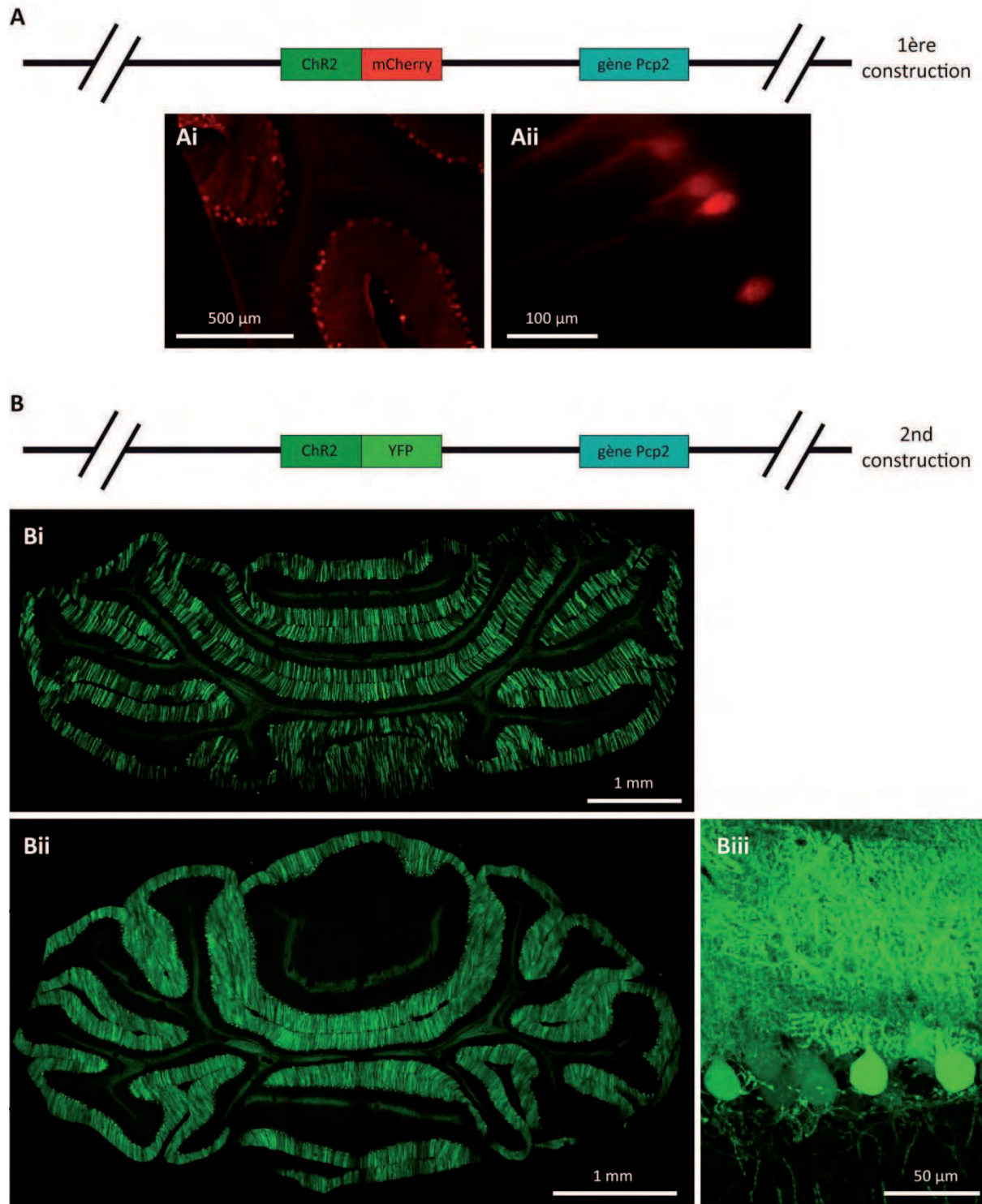


Figure 26 : Constructions de souris transgéniques exprimant la ChR2 dans les cellules de Purkinje. **A :** Construction dans laquelle la ChR2 est associée à un marqueur "mCherry" (rouge) sous contrôle du promoteur du gène Pcp2. **Ai :** Coupe horizontale d'un cervelet de souris exprimant la ChR2-mCherry de manière hétérogène. **Aii :** Amas protéiques des ChR2-mCherry au niveau des corps cellulaires des cellules de Purkinje. **B :** Construction dans laquelle la ChR2 est associée à un marqueur "YFP" (vert ; pour plus de détails se référer à l'article). **Bi :** Coupe horizontale d'un cervelet de souris exprimant la ChR2-YFP de manière hétérogène (épaisseur : 80 μ m). **Bii :** Coupe coronale d'un cervelet de souris exprimant la ChR2-YFP dans toutes les cellules de Purkinje (épaisseur : 80 μ m). **Biii :** Image de cellules de Purkinje exprimant toutes la ChR2-YFP sur une coupe sagittale. Image prise au microscope confocal par JL Dupont.

Abréviations : ChR2 = Channelrhodopsin-2 ; Pcp2 = Purinje cell protein 2 (L7) ; YFP = Yellow Fluorescent Protein.

1.2. Expression de la ChR2-YFP : lignée U126

Lors de l'observation au microscope à épifluorescence et au microscope confocal de tranches de cervelets fixées au PFA (4%), nous avons pu constater l'existence de deux types d'expressions de la ChR2 dans le cervelet de nos souris transgéniques. Le premier se manifeste par un marquage hétérogène "mosaïque" des cellules de Purkinje à travers tout le cervelet ([figure 26Bi](#)). Ce marquage hétérogène ne semble pas reproductible entre les individus d'une même fratrie et ne correspond pas à la zébrine II. L'image de l'expression hétérogène de la ChR2 ([figure 26Bi](#)) ainsi que l'immunohistochimie de la [figure 18B](#) de l'introduction proviennent de la même tranche coronale de cervelet.

Le second type d'expression montre un marquage de toutes les cellules de Purkinje du cervelet ([figure 26Bii](#)). La ChR2-YFP est présente à la membrane du corps cellulaire, des dendrites et de l'axone des cellules de Purkinje ([figure 26Biii](#)). Ce sont les descendants de cette lignée qui ont été utilisés pour l'ensemble de résultats qui suit.

2. FONCTIONNALITE DE LA CHR2

2.1. Contrôle des cellules de Purkinje par la lumière

L'effet de l'activation de la ChR2 par une stimulation lumineuse a été étudié *in vitro* lors d'enregistrements électrophysiologiques de cellules de Purkinje effectués sur des tranches sagittales aiguës de cervelet. Une stimulation lumineuse - LED bleue 460 nm - induit un courant dépolarisant en configuration *whole cell* VC (*voltage clamp*) ainsi qu'un ([figure 27Ai](#) ; stimulation : 1 ms ; 4 mW/mm²) ou plusieurs ([figure 27Aii](#) ; stimulation : 100 ms ; 10 mW/mm²) potentiels d'actions en *current clamp* (CC) en fonction de la durée de stimulation. Lors de stimulations prolongées, le courant enregistré désensibilise rapidement avant de se stabiliser à un plateau (voir article ; [figure 27Aii](#)). L'observation des potentiels d'actions pour une même stimulation montre une fréquence de décharge rapide au début de la stimulation qui diminue puis se stabilise rapidement ([figure 27Aii & B](#)). La cinétique du courant sous forme de pic suivi d'un plateau explique la fréquence de décharge plus élevée des potentiels d'action en début de stimulation, ainsi que la stabilisation de ces derniers. Le plateau de courant - enregistré en VC - ainsi que la stabilisation de fréquence des potentiels d'actions - enregistré en CC - sont maintenus constants pour des stimulations prolongées de 500 ms ([figure 27B](#)).

La puissance de stimulation contrôle l'amplitude des courants induits (voir article) ainsi que la fréquence de décharge de la cellule enregistrée ([figure 27C](#)). Les stimulations spécifiques de la substance blanche (> à 30mW/mm²) n'ont pas permis d'observer le déclenchement d'un potentiel d'action antidromique, signifiant probablement que la densité de ChR2 exprimée à la membrane des axones de Purkinje n'est pas suffisante pour déclencher l'ouverture des canaux sodiques dans l'axone au niveau des nœuds de Ranvier (n = 10).

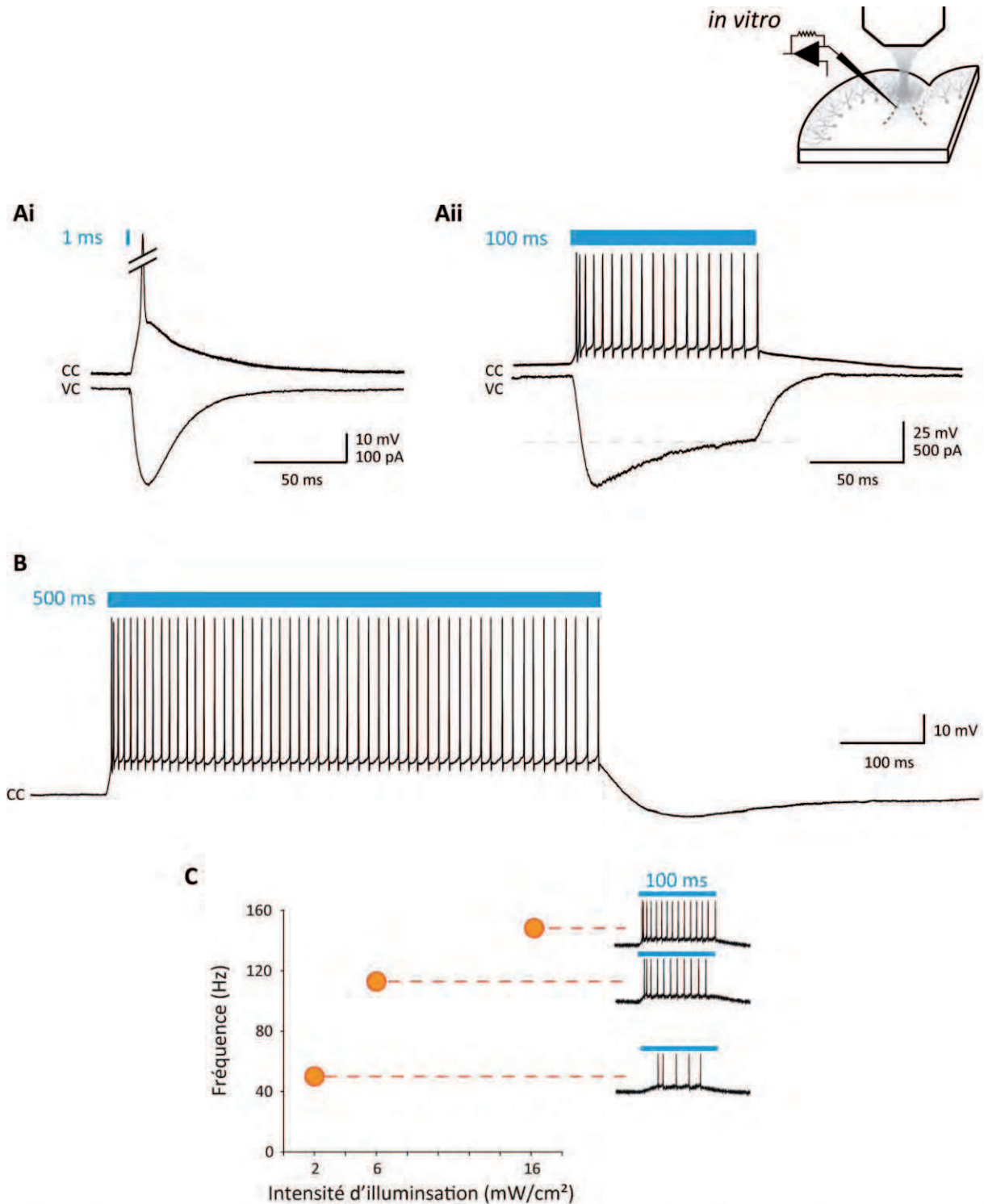


Figure 27 : Caractérisation électrophysiologique des cellules de Purkinje *in vitro*. **Ai** : Exemple de potentiel d'action enregistré en condition *current clamp* (haut) et courant correspondant enregistré en configuration *voltage clamp* (bas) lors d'une stimulation d'1 ms et de 4 mW/mm². **Aii** : Même observation pour 100 ms et 10 mW/mm². La ligne pointillée grise permet de visualiser la désensibilisation suivie d'un plateau de courant. **B** : Exemple de stimulation prolongée (500 ms) d'une cellule de Purkinje enregistrée en *current clamp*. Notez que la fréquence est plus élevée sur ~50 ms, puis devient constante jusqu'à la fin de la stimulation. **C** : Expression de la fréquence de décharge en fonction de l'intensité de stimulation (n = 3). Les stimulations sont symbolisées par les barres bleues. Les cellules utilisées pour Ai, Aii et B ne sont pas les mêmes.

Abbréviations : CC = *current clamp* ; VC = *voltage clamp*.

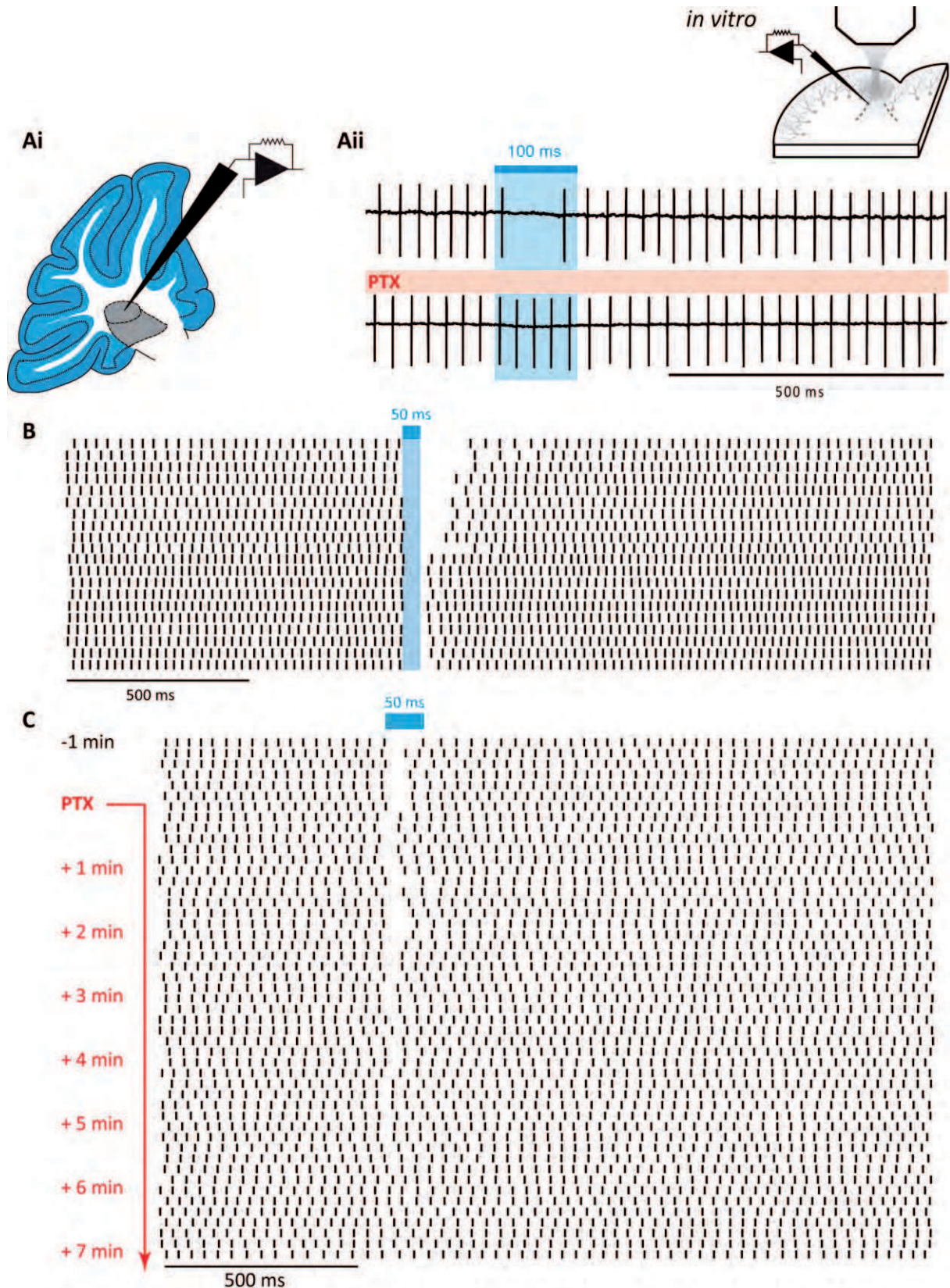


Figure 28 : Effet de la stimulation des cellules de Purkinje sur les neurones des noyaux cérébelleux *in vitro*. **Ai** : Représentation d'une tranche sagittale et d'une pipette de *patch*. **Aii** : Exemple d'un enregistrement typique en configuration *loose patch* d'un neurone des noyaux cérébelleux. Notez que l'inhibition provoquée par la stimulation de 100 ms (barre bleue) des cellules de Purkinje est supprimée par l'application de picrotoxine (PTX). **B** : *Raster Plot* représentant la répétition des stimulations. **C** : Même représentation qu'en B. Notez la disparition progressive de l'inhibition suite à l'application de picrotoxine (100 μ M).

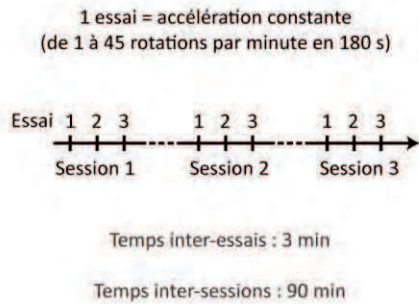
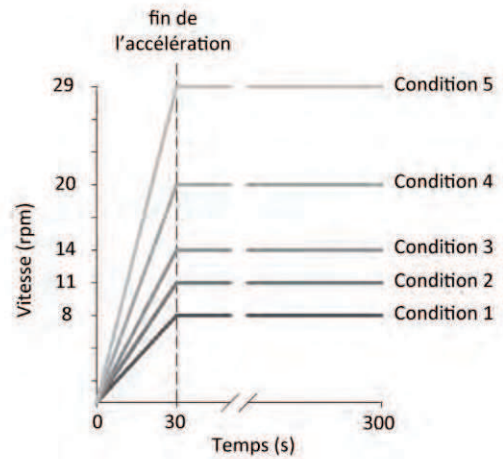
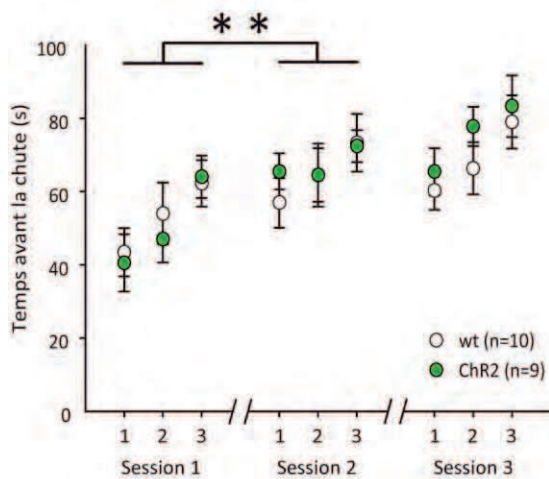
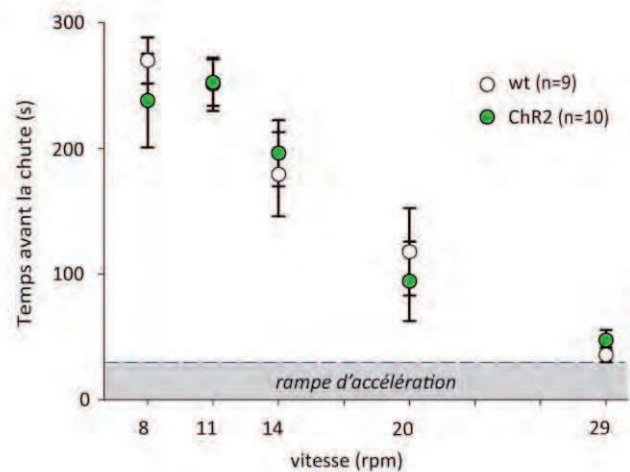
Ai

Bi

Aii

Bii


Figure 29 : Absence de phénotype comportemental. **Ai** : Explication du protocole d'apprentissage. **Aii** : Latence précédant la chute de la souris en fonction des essais. Les deux groupes ne présentent pas de performances différentes (ANOVA multifactorielle, $p = 0.392$; tracés noirs = SEM). Un apprentissage est observable entre les sessions 1 & 2 pour les souris ChR2 aussi bien que pour les wt (ANOVA multifactorielle, $p < 0.01$). **Bi** : Explication du protocole de coordination motrice. **Bii** : Latence précédant la chute de la souris en fonction des conditions. Les deux groupes ne présentent pas de performances différentes (tracés noirs = SEM ; Mann-Witney, 8 rpm : $p = 0.58$; 11 rpm : $p = 0.83$; 14 rpm : $p = 0.87$; 20 rpm : $p = 0.87$; 29 rpm : $p = 0.36$).

Abréviations : ChR2 = Channelrhodopsin-2 ; rpm = rotation par minute ; wt = wild type.

2.2. Contrôle indirect de l'activité des noyaux cérébelleux

Des enregistrements sur des tranches parasagittales aiguës de cervelet en configuration *loose cell attached* nous ont permis de mesurer l'activité spontanée des neurones des noyaux cérébelleux (n = 3). La stimulation lumineuse des cellules de Purkinje bloque temporairement l'activité spontanée des neurones des noyaux cérébelleux (figure 28A et B). Le blocage des transmissions GABAergiques entre les cellules de Purkinje et les noyaux cérébelleux par l'application de picrotoxine (0.1 mM) supprime l'effet de la stimulation, confirmant ainsi que l'inhibition enregistrée provient des cellules de Purkinje (n = 2 ; figure 28C).

3. ABSENCE DE PHENOTYPE COMPORTEMENTAL

L'insertion d'un BAC se faisant aléatoirement dans le génome de la souris, il est possible d'observer une perturbation des comportements des animaux modifiés génétiquement.

Nos travaux portant sur le cervelet, nous avons testé les comportements de ces souris dans deux tâches différentes du Rotarod, particulièrement adaptées à l'évaluation des compétences motrices. L'ensemble des tests comportementaux et des analyses ont été fait en condition "aveugle" afin que le comportement de l'expérimentateur n'influence pas les performances de l'un ou l'autre groupe.

3.1. Protocole d'apprentissage

Ce protocole consiste à placer les souris naïves sur les cylindres immobiles du Rotarod. Après environ 5 s le cylindre commence à tourner en accélérant de 0 à 45 rotations par minute en 180 s. Durant une session, chaque souris effectue 3 essais espacés de 3 min. La durée précédant la chute est mesurée. Trois sessions espacées de 90 min sont ainsi pratiquées pour chaque animal (figure 29Ai).

Les résultats (figure 29Aii) montrent que les souris ChR2 (n = 9) aussi bien que les sauvages (wt : *wild type* ; n = 10) issues de la même portée améliorent leurs performances d'une session à l'autre, signifiant que les deux groupes d'animaux sont capables d'apprentissages (ANOVA multifactorielle, $p < 0.01$). Aucune différence significative n'a été trouvée entre les souris "ChR2" et les souris "wt" issues de la même portée (ANOVA multifactorielle, $p = 0.392$).

3.2. Protocole de coordination motrice

Bien que le premier paradigme permette également de tester la coordination motrice, nous avons effectué un second test dans le but de valider l'absence de phénotype des comportements moteurs chez nos souris transgéniques. Ce protocole est constitué de 5 conditions différentes dans lesquelles des rampes d'accélération sont générées pendant les 30 premières secondes, puis la vitesse est maintenue constante pendant 4 min 30. Les conditions 1 à 5 représentent respectivement

des plateaux de 8, 11, 14, 20 et 29 rotations par minute (figure 29Bi). Ce test est précédé d'une ré-habitude correspondant à un essai du protocole d'apprentissage réalisé la veille. Aucune différence significative n'a été trouvée entre les souris "Chr2" et les souris "wt" issues de la même portée (Mann-Witney, condition 1, $p = 0.58$; condition 2, $p = 0.83$; condition 3, $p = 0.87$; condition 4, $p = 0.87$; condition 5, $p = 0.36$), confirmant ainsi les résultats obtenus avec le protocole précédent (figure 29Bii).

ARTICLE

L'article ayant été écrit dans un cadre collaboratif, il convient de discerner les expériences réalisées par mes soins de celles effectuées par nos partenaires. La construction du BAC a été réalisée sous la direction de Fekrije Selini (CIRB, Collège de France). Les enregistrements *in vivo* des noyaux cérébelleux ainsi que l'étude de la diffusion de la lumière dans le tissu cérébelleux ont été effectués à l'Ecole Normale Supérieure sous la conduite de Clément Léna. Enfin, le comportement, les révélations immunohistochimiques, la majeure partie de la caractérisation *in vitro* et l'intégralité des enregistrements *in vivo* des cellules de Purkinje ont été réalisés dans le cadre de ma thèse.

Afin de faciliter la lecture de l'article, les figures ont été agrandies et le texte remis en page. Les figures 2, 3 et 4 se retrouvent donc scindées en 2 parties.

CLUSTERS OF CEREBELLAR PURKINJE CELLS CONTROL THEIR AFFERENT CLIMBING FIBER DISCHARGE

Joseph Chaumont^a, Nicolas Guyon^b, Antoine M. Valera^a, Guillaume P. Dugué^b, Daniela Popa^b, Paikan Marcaggi^b, Vanessa Gautheron^c, Sophie Reibel-Foisset^d, Stéphane Dieudonné^b, Aline Stephan^e, Michel Barrot^a, Jean-Christophe Cassel^f, Jean-Luc Dupont^a, Frédéric Doussau^a, Bernard Poulain^a, Fekrije Selimi^{c,1}, Clément Léna^{b,1}, and Philippe Isope^{a,1,2}

^aInstitut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Propre de Recherche 3212, Université de Strasbourg, 67084 Strasbourg, France; ^bInstitut de Biologie de l'École Normale Supérieure, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 8197, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 1024, 75005 Paris, France; ^cCenter for Interdisciplinary Research in Biology, Collège de France, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 7241, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 1050, 75005 Paris, France; ^dChronobiotron, Unité Mixte de Service 3415, Centre National pour la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, 67084 Strasbourg, France; ^eInstitut de Génétique Moléculaire et Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 7104, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 964, Université de Strasbourg, 67400 Illkirch, France; and ^fLaboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 7364, Université de Strasbourg, 67084 Strasbourg, France

Edited by Shigetada Nakanishi, Osaka Bioscience Institute, Suita, Japan, and approved August 29, 2013 (received for review February 5, 2013)

ABSTRACT

Climbing fibers, the projections from the inferior olive to the cerebellar cortex, carry sensorimotor error and clock signals that trigger motor learning by controlling cerebellar Purkinje cell synaptic plasticity and discharge. Purkinje cells target the deep cerebellar nuclei, which are the output of the cerebellum and include an inhibitory GABAergic projection to the inferior olive. This pathway identifies a potential closed loop in the olivo-cortico-nuclear network. Therefore, sets of Purkinje cells may phasically control their own climbing fiber afferents. Here, using *in vitro* and *in vivo* recordings, we describe a genetically modified mouse model that allows the specific optogenetic control of Purkinje cell discharge. Tetrode recordings in the cerebellar nuclei demonstrate that focal stimulations of Purkinje cells strongly inhibit spatially restricted sets of cerebellar nuclear neurons. Strikingly, such stimulations trigger delayed climbing-fiber input signals in the stimulated Purkinje cells. Therefore, our results demonstrate that Purkinje cells phasically control the discharge of their own olivary afferents and thus might participate in the regulation of cerebellar motor learning.

Keywords: motor control | olivo-cerebellar loop | complex spikes

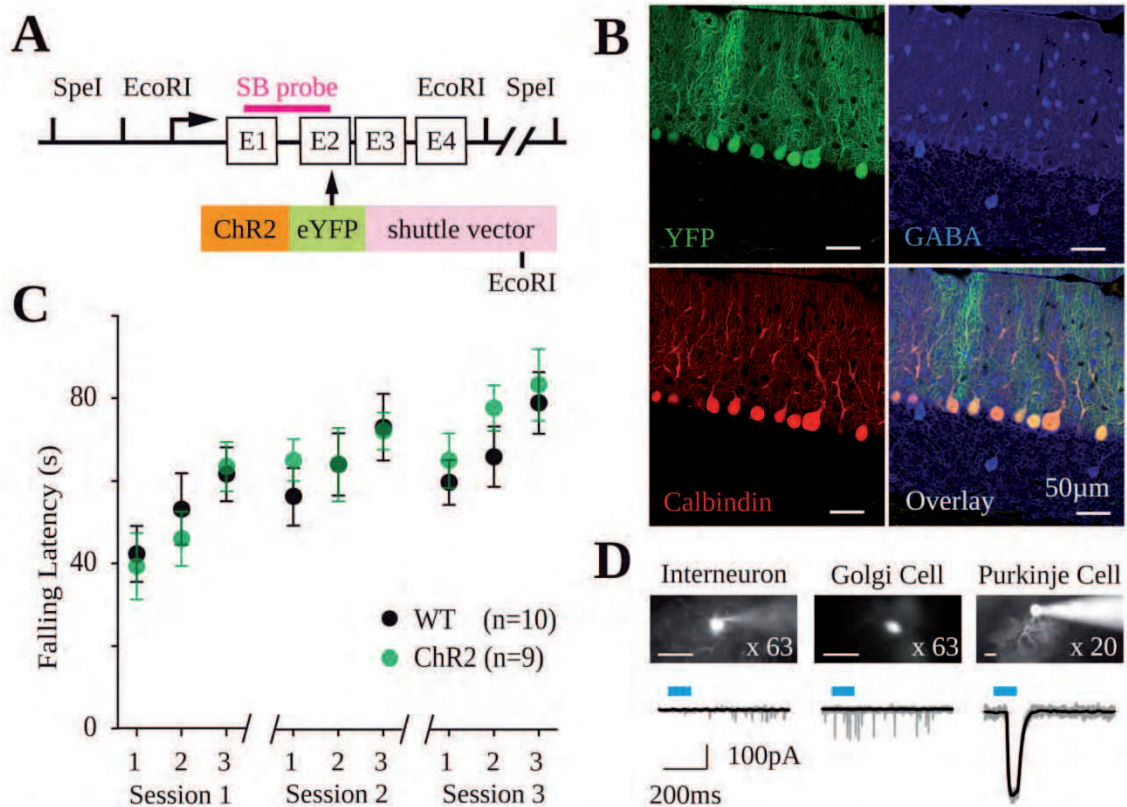


Fig. 1. Generation and characterization of L7-Chr2(H134R)-eYFP mice. **(A)** Diagram of the modified BAC containing the Chr2(H134R)-eYFP cDNA under the control of the L7/*pcp2* gene regulatory elements. **(B)** Transgene expression monitored by YFP fluorescence in cerebellar sections (*Upper Left*); (*Lower Left*) calbindin immunolabeling; (*Upper Right*) GABA immunolabeling; (*Lower Right*) overlay. **(C)** Falling latencies in the rotarod test during three sessions of three trials at 0–45 rpm (tested by multifactorial ANOVA, $P = 0.392$; WT, $n = 10$; Chr2, $n = 9$). **(D)** Molecular layer interneurons, Golgi cells, and Purkinje cells recorded in acute cerebellar slices visualized using Alexa 594 in the pipette and wide-field illumination at 473 nm. (Scale bar: 20 μm .) No current was observed in molecular layer interneurons ($n = 4$) and Golgi cells ($n = 6$).

INTRODUCTION

The cerebellar cortex is involved in a wealth of functions, from the control of posture to higher cognitive processes (1–3). Purkinje cells (PCs) are key processing units of the cerebellar cortex (4): each PC receives more than 175,000 parallel fiber synaptic inputs carrying information about the ongoing sensorymotor context. It also receives a single inferior olive afferent, the climbing fiber, which triggers a complex spike (CS), modulates PC firing (5), controls synaptic input plasticity, and has been proposed to carry error and clock signals to the cerebellum (2, 4– 8). PCs are grouped in multiple parasagittal microzones, each receiving projections from separate areas of the inferior olive and projecting to subregions of the cerebellar nuclei (CN) (9– 12). In the CN, PCs make inhibitory contacts on excitatory neurons that project to various premotor areas and propagate cerebellar computations to the motor system. Anatomical evidence indicates that PC terminals also contact CN inhibitory neurons that target inferior olive cells (13, 14). This nucleoolivary pathway is topographically organized in multiple parallel projections to the inferior olive subnuclei (15), suggesting the existence of closed olivary-cortico-nuclear loops. Therefore, the discharge of a population of PCs in a microzone might not only shape the output of the cerebellum but also control its afferent climbing-fiber signal. Previous studies have shown that stimulation of the nucleo-olivary pathway significantly reduces olivary cell firing (16–18) and that pharmacological and genetic manipulations of PCs or olivary cell activity induce reciprocal modulations of the firing rate of PCs and climbing fibers (19, 20). These results indicate that PCs may tonically modulate the nucleo-olivary pathway. However, whether the cerebellar cortex can phasically recruit this pathway and whether this circuit functions as a closed loop is currently unknown. We thus set out to study the impact of phasic stimulations of PCs on cortico-nucleo-olivary loops. To control selectively PC firing rates, we engineered a mouse line expressing Channelrhodopsin-2 (ChR2) specifically in PCs. By combining optogenetic stimulation and *in vivo* electrophysiological recordings, we show that stimulating a set of PCs in a region of the cerebellar cortex triggers a restricted inhibition in the cerebellar nuclei and a transient disinhibition of the inferior olive cells that project to this set of PCs.

RESULTS

L7-ChR2-eYFP Mice Engineering. A genetically modified mouse (L7-ChR2) that expresses ChR2(H134R)-Yellow Fluorescent Protein (YFP) under the control of the regulatory elements of the *pcp2* gene was created using the bacterial artificial chromosome modification strategy (SI Methods, Fig. 1A, and Fig. S1A) (21). Specific expression of the ChR2-YFP fusion protein in all PCs of the cerebellar cortex was detected by YFP fluorescence on cerebellar sections and confirmed by anti-calbindin immunostaining (Fig. 1B and Fig. S1B). GABA immunostaining and wholecell patch-clamp recordings in acute cerebellar slices showed no expression in molecular layer interneurons or Golgi cells (Fig. 1D). Behavioral tests were performed to assess motor performance of the mutant mice. No difference was found between L7-ChR2 mice and wild-type littermates (Fig. 1C), indicating that this transgene expression does not perturb motor functions.

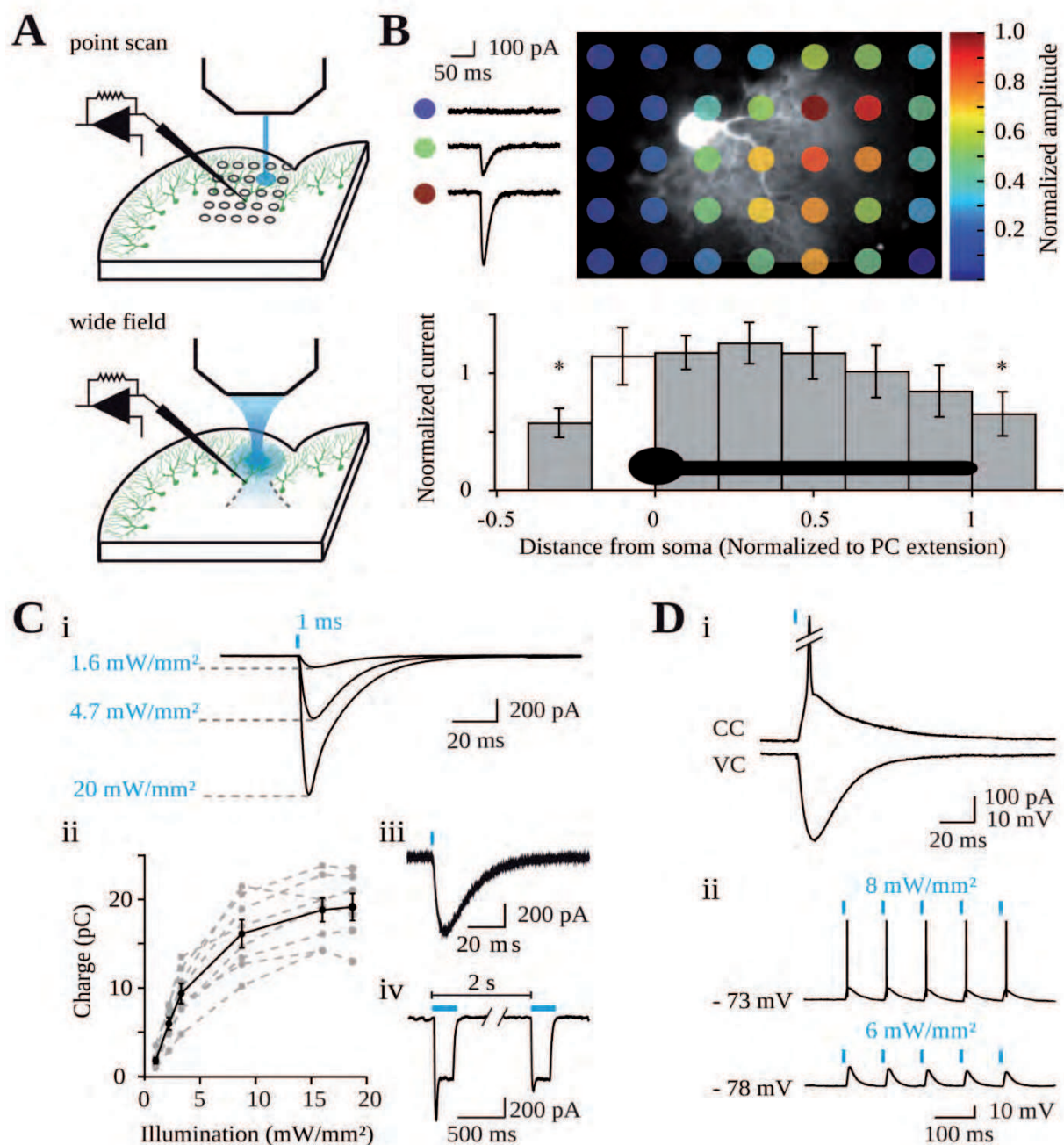


Fig. 2. Electrophysiological characterization of L7-ChR2(H134R)-eYFP mice *in vitro* and *in vivo*. **(A)** Schematics of acute cerebellar slices illustrating whole-cell recordings combined with laser-point scan photostimulation (*Upper*) or wide-field illumination (*Lower*). **(B, Upper)** Point-scan photostimulation (1-ms pulses) of Purkinje-cell dendrites and average current elicited at identified color-code points. **(B, Lower)** normalized current (\pm SEM) plotted against the distance from the soma ($n = 7$, Mann-Whitney test, $P < 0.05$). **(C, i)** Average whole-cell currents recorded in a PC with 1-ms wide-field LED illumination at various irradiances. **(C, ii)** Average charge against irradiance ($n = 8$ cells; black, mean \pm SEM). **(C, iii)** Example of 10 successive traces superimposed from one cell. **(C, iv)** Desensitization of peak current at 0.5 Hz (100-ms pulses). Panels iii and iv are from different cells. **(D, i)** Action potential recorded in current-clamp mode elicited by a 1-ms light pulse (top) and corresponding photocurrent recorded in voltage clamp (bottom). **(D, ii)** Action potential initiation for burst of illumination (1-ms pulses at 10 Hz).

Control of Purkinje Cells by Light. To characterize PC activation by ChR2, *in vitro* recordings were performed on acute cerebellar slices using whole-cell patch-clamp. Wide-field illumination with blue light (Fig. 2A and SI Methods) systematically activated an inward current in all PCs tested ($n = 65$; Fig. 2 B–D). By restricting the field of illumination (SI Methods), we could show that ChR2 channels are expressed throughout PC dendrites (Fig. 2B) and estimate their density to be 150–300 channels per μm^2 illuminated [Fig. S2, assuming a unitary conductance of 100 fS (22)]. We then set out to characterize the current induced in PCs by illumination as a function of irradiance and pulse duration. For a pulse duration of 1 ms, increasing irradiance enhanced the amplitude of the photocurrent up to several hundred picoamps (Fig. 2C and SI Methods) with a decay time constant of 17.3 ± 8.5 ms ($n = 11$). For longer pulses (100 ms), the current rapidly desensitized to a stationary current at $58 \pm 3\%$ of the peak for stimulation frequency below 0.05 Hz ($n = 5$) (Fig. 2 C, iv), in agreement with previous work (23). The pulse frequency used in most of the experiments reported in this work was above 0.05 Hz, leading to a smaller peak current but a similar stationary current (Fig. 2C). Current-clamp recordings showed that light-evoked current carrying a charge above 14.7 ± 10 pC ($n = 4$) elicited an action potential in PCs ($V_m = -60$ mV) and that action potentials were repeated during burst illuminations of up to 10 Hz for irradiance above 8 mW/mm² (Fig. 2D). These results demonstrate that, despite its very low conductance, the density of ChR2 channels is high enough to produce large currents and reliably elicit action potentials in PCs of L7-ChR2 mice.

Next, the activation of PCs was characterized *in vivo* using juxtacellular recordings in anesthetized mice. Blue-light illumination was delivered through optical fibers coupled to a LED and positioned in the vicinity of the brain surface (SI Methods and Fig. 2E). In contrast to *in vitro* conditions, the irradiance received by the PCs *in vivo* depends strongly on the scattering of light in the tissue and varies as a function of the depth and orientation of the dendrite of the PC. PCs were identified by the occurrence of complex spikes (CSs), produced by the climbingfiber input, and by the frequency of spontaneous simple spikes (mean CS rate = 0.44 ± 0.63 Hz; mean simple spike rate = 39.7 ± 3.9 Hz, $n = 19$, $n = 16$ mice). Increasing irradiance intensity led to an increase in simple spike firing rate in all cells ($n = 14$) whose somata lie in the first hundreds of micrometers from the surface of the tissue (Fig. 2 F and G). This increase in simple spike-firing rate could continue up to 500 ms (the longest duration tested) and reach up to 250 Hz. Further increasing the intensity induced a depolarization block consisting of a burst of spikes at light onset followed by a complete suppression of PC firing during the remaining time of illumination (Fig. 2F). Because of the diffusion of light (SI Methods; and see Fig. S5), depolarization block was not observed for cells distant from the tip of the optic fiber by more than 300 μm even at tip irradiance above 30 mW/mm². Also, no depolarization block was elicited with short pulses of light (≤ 2 ms). To quantify the onset of the effect of illumination, the latency of the first spike after the onset of illumination was measured. This latency was significantly shortened to a median delay of 5.5 ms ($n = 19$) (Fig. 2H) for irradiance as low as 2.5 mW/mm², and further decreased to a minimum median of 3.0 ms for an irradiance intensity of 19 mW/mm² (Fig. 2H). At the offset of the illumination, the time required to resume basal firing rate ranged between 10 and 30 ms (Fig. 2I). These findings demonstrate that ChR2-expressing PCs can be excited by light with high temporal precision *in vivo*.

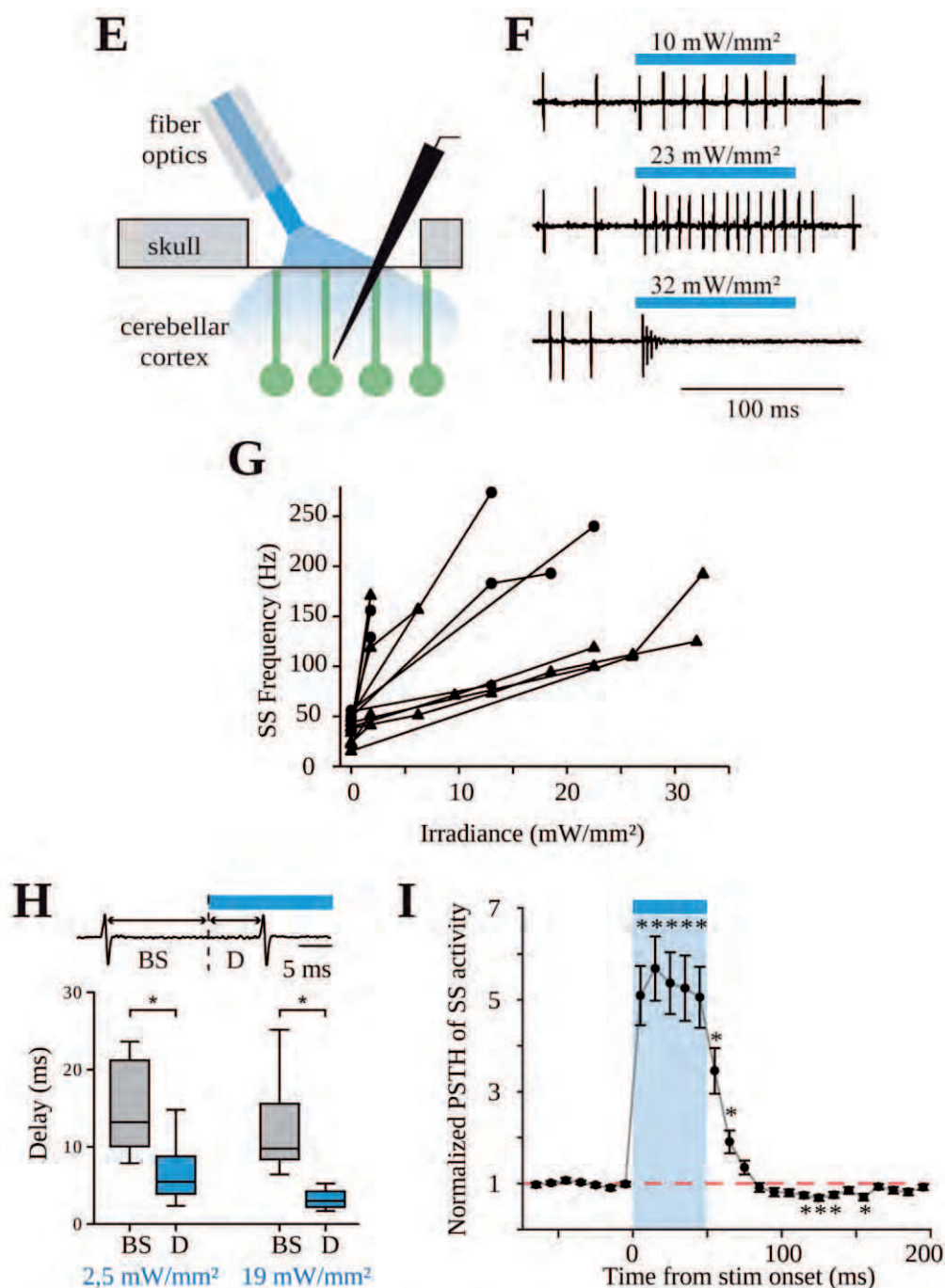


Fig. 2bis. Electrophysiological characterization of L7-ChR2(H134R)-eYFP mice in vitro and in vivo. **(E)** Schematic of in vivo juxtacellular recordings of PCs combined with optical fiber illumination. **(F)** Example traces recorded in juxtacellular mode during 100-ms pulses. **(G)** Relationship between PC firing rate and irradiance intensity ($n = 14$ cells). Triangle, cells deeper than $400 \mu\text{m}$. **(H)** Delay of occurrence (D) of the first spike during illumination, compared with the preceding spike (BS) at various irradiances ($n = 20$ cells, 16 mice). Box plots show median values and 25/75% percentiles. Control median delay = 10.9 ms (quartiles: $8.4, 17.1$); median delay = 5.5 ms (quartiles: $3.9, 8.8$) at 2.5 mW/mm^2 and 3 ms (quartiles $2.2, 4.2$) at 19 mW/mm^2 , Kruskal–Wallis One-Way ANOVA, $P < 0.001$. Pairwise multiple comparison, Dunn’s method, $*P < 0.05$. Median delays during illumination were not significantly different. **(I)** Time course of the effect of illumination on the firing rate. Post stimulus time histograms (PSTHs) were normalized to the baseline frequency before averaging. Only cells with strong increases in firing rate (greater than twofold increase) were used in this panel. Kruskal–Wallis One-Way ANOVA, $P < 0.001$. Pairwise multiple comparisons, Dunn’s method. $*P < 0.05$.

Inhibition of Cerebellar Nuclei Neurons by Purkinje Cells. To assess whether the photostimulation of PCs was able to modulate the activity of their target neurons in the cerebellar nuclei (CN), *in vivo* extracellular recordings were performed with tetrodes in the CN while illuminating the ipsilateral cerebellar cortex (SI Methods and Fig. 3 A and B). To increase the probability of stimulating the group of PCs that target the recording site in the CN, we used illumination parameters that maximize the number of PCs excited (optical fiber of 600 μm diameter, 100-ms pulses, irradiance at 60 mW/mm^2) (SI Methods). Using these conditions, only 10% of activated PCs are likely to experience intensities that trigger a depolarization block (SI Methods; and see Fig. S5). By illuminating the lateral part of Crus I, sites that induced inhibition in recorded units from the interposed nucleus were found (26/48 tested sites; 21 animals) (Fig. 3 C–G). The suppression of firing was often accompanied by a small deflection in the field potential, presumably due to synaptic activation (red arrow, Fig. 3C). Usually, several cells were recorded simultaneously by the tetrode at each recording site (3.7 ± 1.7 cells per site) (Fig. 3B). Among the 97 cells recorded at responding sites (i.e., where at least one cell was inhibited), 70 cells were inhibited by Crus I illumination whereas 27 did not respond (average of $76 \pm 26\%$ inhibited cells at each site). These cells exhibited a mean firing rate of 18.0 ± 13.1 Hz and a coefficient of variation of 0.58 ± 0.29 for the interspike interval.

To quantify the effectiveness of the inhibition, the parameters of illumination were then varied (Fig. 3E and Fig. S3). Decreasing the intensity of irradiance to 19 mW/mm^2 did not change the proportion of responding cells at responding sites in the CN ($72.8 \pm 31\%$ responding cells from 57 cells recorded at 25 responding sites in four mice), showing that this intensity is enough to recruit the minimum number of PCs necessary for CN inhibition. The duration of full inhibition (complete suppression of firing) increased with pulse duration and irradiance intensity (Fig. 3E). For 25-ms pulses, a complete inhibition of some CN units could be observed at irradiance higher than 3 mW/mm^2 . The mean latency to full inhibition was slow but variable (mean = 18.9 ± 11.7 ms at 19 mW/mm^2 and 19.7 ± 12.15 ms at 60 mW/mm^2) (Fig. S3 D–F), which is consistent with the requirement of a large number of activated PCs for complete inhibition of CN firing. Finally, trains of 20-Hz and 30-Hz light pulses induced a rhythmic modulation of CN firing (Fig. S4). Taken together, these data show that illumination of PCs allows a dynamic control of CN firing (24) and that the duration of inhibition increases with the intensity and duration of light stimulations. Because PC inhibition has been proposed to produce a rebound excitation in CN neurons (25), we examined whether the instantaneous frequency was significantly enhanced relative to baseline values when the cells resumed their firing. The inhibition produced by PC inputs did not trigger a detectable rebound excitation even at high irradiance (60 mW/mm^2) in most CN cells (about 90%) but was followed by either a progressive or a direct return of CN discharge to its baseline value after the end of the stimulation (Fig. S3). To test the spatial specificity of the responses, the light source at the surface of the cerebellum was displaced from Crus I to Crus II, once a responding site was found; in most cells, the light-induced inhibition was lost ($n = 12/14$ cells recorded, six recording sites, four mice) (Fig. 3F), consistent with the zonal anatomical organization of the cortico-nuclear pathway. We then mapped the region of the CN inhibited by activation of ~ 1000 – 3000 PCs in Crus I (pulse duration: 100 ms, irradiance 19 mW/mm^2 ; see Fig. 3A, Fig. S5, and SI Methods). The cellular responses were explored by systematic penetrations in ranges of stereotaxic coordinates [antero-posterior (AP) -5.9 to 6.4 , medio-lateral (ML) 1.5 ; 2.5 , depth 2.1 , 3.3], and the most responsive sites were located in a small area (AP -6.2 , -6.4 , ML 1.7 , 1.9 , depth 2.7 ; 3.2) ($n = 106$ cells, 53 recording sites, four mice) (Fig. 3G and Fig. S3).

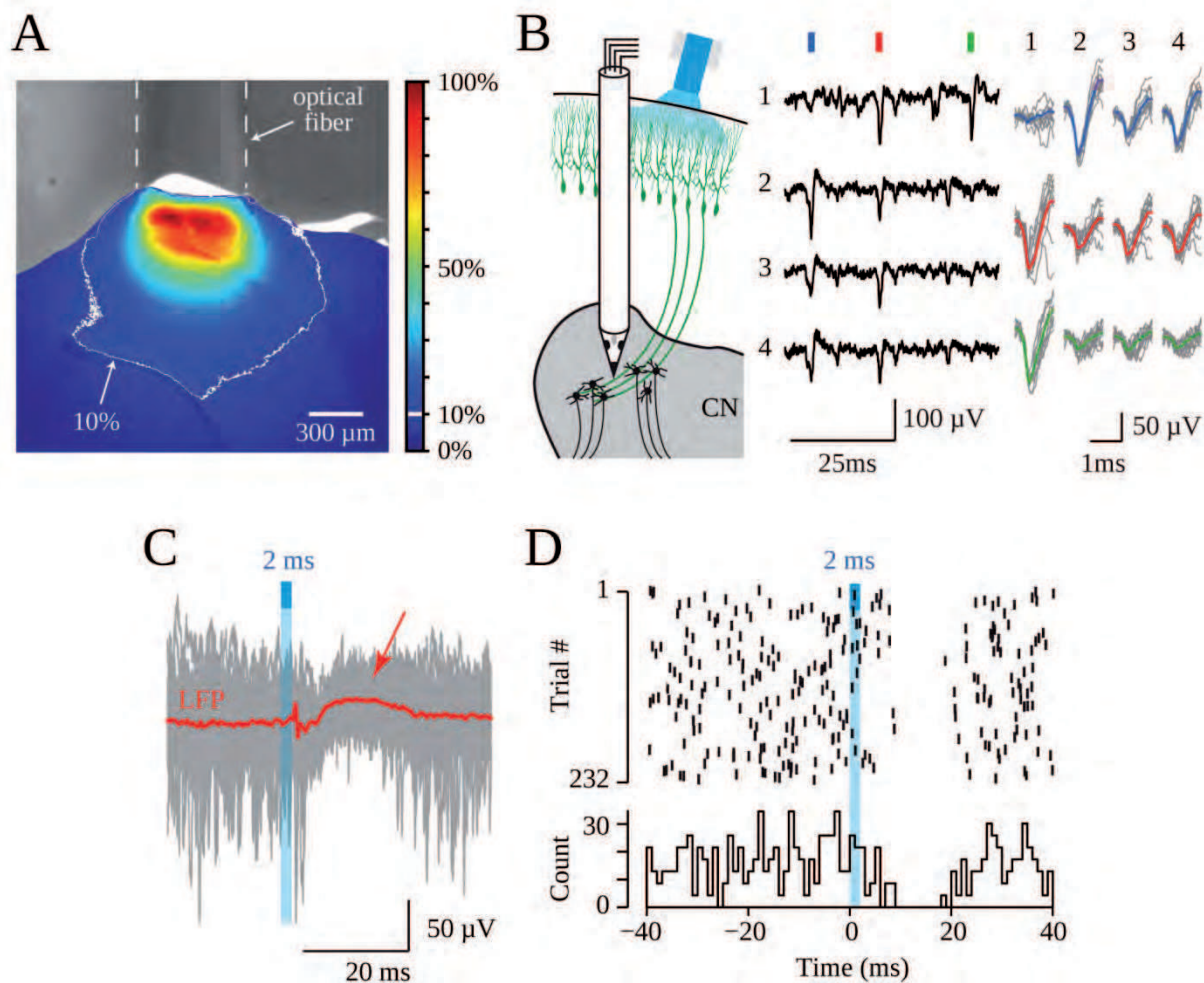


Fig. 3. Effective silencing of cerebellar nuclear cells by photostimulation of Purkinje cells in vivo. **(A)** Propagation of blue light in the cerebellar cortex (color coded part of the image) for a 600- μm optical fiber placed on the surface of the cerebellum (grayscale part of the image). In the color-coded part, the color of each pixel corresponds to its value expressed as a percentage of the intensity of the brightest pixel. The 10% isoline is delineated in white (i.e., corresponding to $\sim 2 \text{ mW}/\text{mm}^2$ if the brightest pixel immediately under the fiber corresponds to $20 \text{ mW}/\text{mm}^2$). **(B)** Illustration of tetrode recordings in cerebellar nuclei. *(Left)* Schematics of the experiment. *(Center)* Example traces (vertical ticks of different colors signal different spikes; numbers identify the four channels of the tetrode). *(Right)* Average unfiltered waveforms on the four channels (same color code as for Center), superimposed on 10 successive events (gray traces). **(C)** Example of a recording obtained on one channel in the interposed nucleus. The average extracellular potential (LFP, local field potential, red) recorded in CN is superimposed on 30 successive sweeps (gray lines) aligned on the onset of photo-stimulation (2 ms, 60 mW/mm^2). Note the suppression of extracellular (negative) spikes after the stimulation. The average LFP was calculated from 232 sweeps. The red arrow signals the deflection of LFP. **(D)** Example of a raster plot (*Upper*) and corresponding PSTH (*Lower*; bin, 1 ms), showing a complete suppression of firing following the stimulation (blue bar); the example is the same as in C.

Activation of Purkinje Cells Controls Inferior Olivary Neurons Discharge. We then set out to assess whether the stimulation of a population of PCs can stop the firing of CN neurons and then influence the discharge of inferior olivary neurons. Complex spikes (CS) in PCs were monitored in juxtacellular recordings *in vivo* as a readout of olivary cells discharge. The recorded PC and its neighbors were then excited using small optical fibers (diameter 50–200 μm), and the irradiance was adjusted to obtain a strong activation without depolarization block (mean = 20.6 ± 11.7 mW/mm^2). Local illumination by pulses of light lasting 35–500 ms elicited a CS in 25 out of 42 PCs ($n = 25$ mice) (Fig. S6) with a mean latency of 138 ± 39 ms after the onset of the stimulation (Fig. 4 A and B). No response was observed for pulse durations of 10 and 20 ms. For pulse durations of 100 ms or less, most stimulation-induced CSs were elicited tens of milliseconds after the end of illumination, thus ruling out the possibility that CSs are a direct (artifactual) consequence of light stimulation. Indeed, no effect of illumination was detected in wild-type control mice either in PCs or in other cell types ($n = 4$ PCs, 7 non-PCs, presumably inhibitory interneurons from four wild-type mice). Interestingly, once a rebound CS was observed, the response rate was independent of the size of the fiber used ($F(1,23) = 2.85$, $P = 0.10$) and the irradiance at the tip of the optic fiber ($F(1,52) = 0.73$, $P = 0.40$). Therefore, data obtained using different irradiance intensities and fiber diameters were pooled together. No difference was observed in the onset of the CS responses for pulse durations between 35 and 500 ms whereas the offset of the response increased with pulse duration (Fig. 4C), suggesting that the beginning and the end of the response are locked respectively to the beginning—with a long delay—and to the end of the stimulation. Therefore, CS were evoked by pulses of irradiance around 20 mW/mm^2 using a 100- μm optical fiber that should activate about 200–500 PCs (Fig. 4A and Fig. S5). Taken together, these results indicate that, provided a critical number of PCs were illuminated for a minimal period (35 ms), the disinhibition of olivary neurons resulted in CSs evoked with a minimal delay of 80–100 ms. Moreover, experiments in which the optical fiber was moved along the transverse axis above the surface showed that the evoked CS response (i.e., the inferior olive disinhibition) decreased and disappeared together with the simple spike response (i.e., the direct activation of the recorded cell) (Fig. 4E). These results indicate that the set of PCs that control the climbing fiber afferent to a PC is localized close to that PC (Fig. 4F), consistent with the topographical organization of the cortico-nucleo-olivary circuit.

There is a substantial jitter in the time of occurrence of the CS after the onset of illumination (several tens of milliseconds) (Fig. 4 B and D), suggesting a temporal fluctuation of the responsiveness of the inferior olivary neurons to disinhibition. There was indeed a correlation between the probability of occurrence of the CS following the stimulation of PCs and the CS baseline firing rate (Fig. S6B), indicating that PC illumination is more efficient when olivary cells are more depolarized. Because inferior olivary neurons are known to express subthreshold oscillations spontaneously (26), we examined whether such oscillations would condition the timing of the CS evoked by PCs stimulations. Poststimulus time histograms were constructed by aligning individual trials on the time of the first CS after the onset of stimulation (Fig. 4D, green ticks; 100 ms pulse, $n = 8$), and the evoked CS were found to occur preferentially ~ 225 ms and ~ 450 ms after a preceding spontaneous CS (Fig. 4D, Bottom). These results show that the disinhibition of olivary neurons triggers CS spikes in phase with an ~ 4 -Hz subthreshold oscillation.

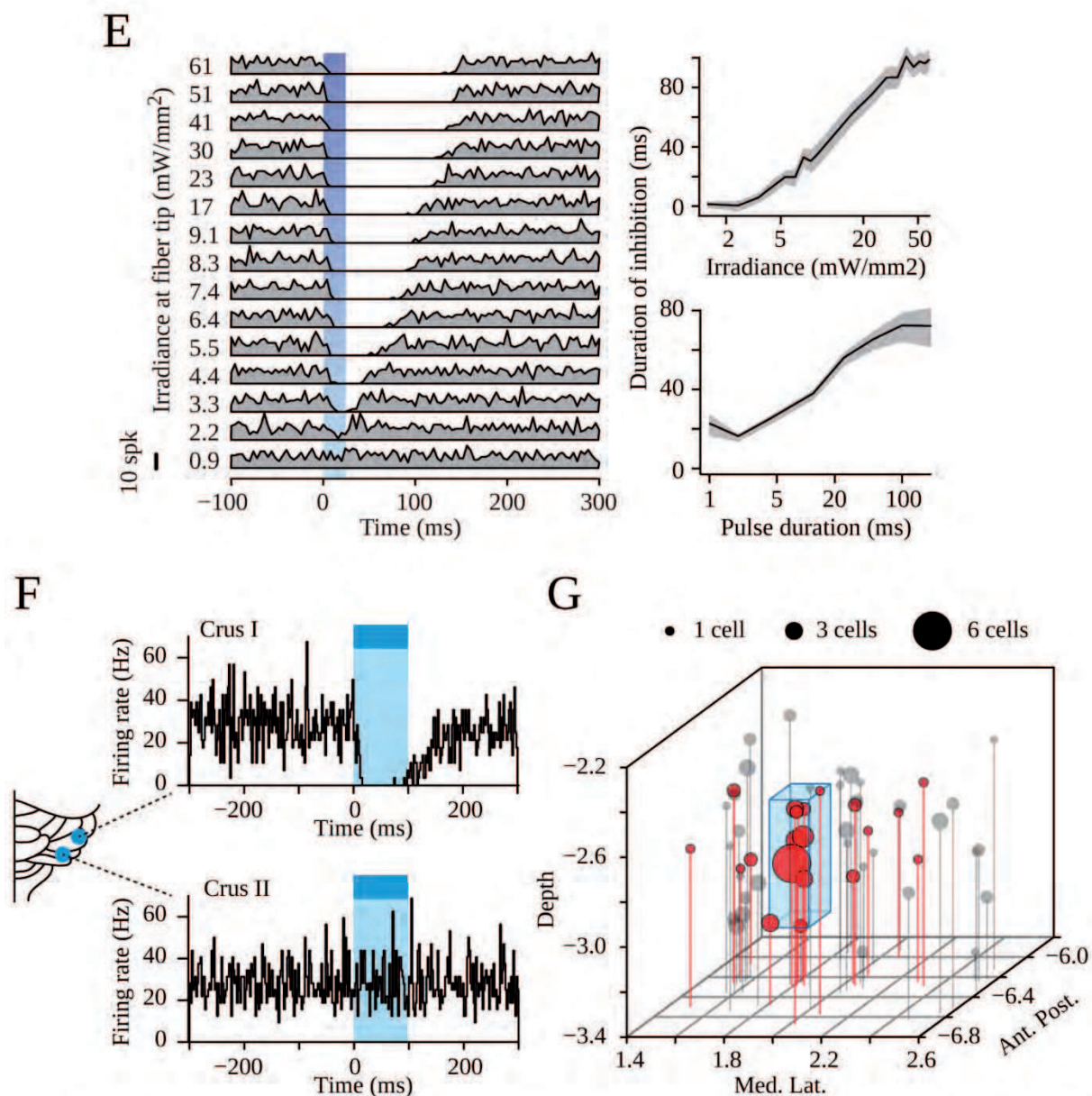


Fig. 3bis. Effective silencing of cerebellar nuclear cells by photostimulation of Purkinje cells in vivo. **(E, Left)** Example of PSTHs for one cell tested with different light intensities (pulse duration, 25 ms). **(E, Right)** Average duration of full inhibition plotted against the irradiance at the fiber tip (at 25 ms) or pulse duration (at 60 mW/mm^2) ($n = 74$ cells) (SI Methods). The shaded area indicates the SEM. **(F)** Example cell inhibited in response to the illumination of Crus I (Upper, PSTH), but not Crus II (Lower, PSTH). Bin, 5 ms. Blue bar, light pulse (100 ms, 60 mW/mm^2). **(G)** A 3D view of the distribution of CN recording sites where inhibited cells were found (red) or not (gray) during Crus I illumination (100 ms, 19 mW/mm^2) on the ipsilateral cerebellar Crus I region (AP, -6.1; ML, 3.3). The 3D rectangle arrow identifies the region where most responsive sites are clustered. See Fig. S3 planar projections.

DISCUSSION

In this study, a transgenic mouse line expressing ChR2 specifically in PCs is described and used to investigate the functional organization of the olivo-cerebellar circuit. The level of ChR2 (H134) expression yielded reliable and sustained currents (23, 27) in PCs and increased the cells' discharge. Focal illumination in one specific part of the cerebellar cortex (crus I) transiently inhibited 75% of the cells recorded simultaneously from the same tetrode in a restricted area of the cerebellar nuclei. Lowering the intensity of stimulation did not change the percentage of responsive cells at responsive sites, suggesting that the nonresponsive cells receive weaker PC inputs, as it has been suggested for nuclear GABAergic interneurons (28). Although light stimulations took a few milliseconds to evoke spikes in PCs, the complete suppression of firing in CN cells was variable among cells and was reached on average in ~20 ms, indicating the need for a high convergence of presynaptic PCs or a temporal summation of inhibitory PC inputs to fully inhibit CN neurons. Surprisingly, although sustained inhibition was induced in CN neurons following activation of PCs, rebound excitation (29, 30) was observed in only ~10% of the cells, in agreement with the study of Alviña et al. (31). Anesthesia might alter physiological properties of CN neurons. However, recent studies (25, 32) have demonstrated that rebound excitation in CN neurons requires the extensive activation of the presynaptic PCs. Thus, a more likely interpretation is that our protocol of illumination leads to poorly synchronized PC discharges and/or fails to recruit enough presynaptic PCs.

The stimulation of PCs during tens of milliseconds elicited olivary discharge with an onset latency close to 100 ms and an offset latency that increased with stimulation duration. Such long-latency phenomenon has been previously suggested in behaving monkeys (33) by analyzing the simple spike discharge preceding complex spikes. In our experiments, the CS response started while the CN neurons were still inhibited, which rules out the recruitment of an (indirect) excitatory output of the CN to the inferior olive (15, 34). However, the evoked CS is consistent with properties of the nucleo-olivary inhibitory pathway (35), which is dominated by asynchronous release (17) leading to long latencies for inhibition (18); this mode of transmission should delay the transmission of changes in CN firing rate and filter out very transient suppressions of CN firing. Moreover, the variability of the latency of the CS response across trials seems to be partly due to intrinsic subthreshold fluctuations (26) (in our case, 4-Hz oscillation) of the membrane potential of inferior olivary neurons. Indeed, the maximal probability of occurrence of CS response was found in phase with olivary oscillations. Overall, the characteristics of the CS response to increased PC discharge are consistent with a disinhibition of the inferior olive via the nucleo-olivary pathway. Our results are also consistent with a topographical organization of the cortico-nucleo-olivary pathway. CN neurons inhibition was lost when the illumination was moved to a neighboring lobule. Moreover, the CS response in the recorded PCs disappeared as soon as direct excitation (evidenced by simple spike modulation) was lost when the optic fiber was moved away in the transverse direction. The combination of these results and those from previous studies (9, 16, 24, 26, 27, 30–32, 36) strongly argue for the existence of closed cortico-nucleo-olivary loops where spatially restricted sets of PCs control their afferent climbing fibers. The spatial extension of the set of PCs excited by our smallest illumination (around 300 μm diameter) is closer to the scale of cerebellar zones than of microzones (11). Indeed, recent imaging studies *in vivo* describing synchronized CSs during sensory stimulation identified microbands narrower than 100 μm (37, 38). Testing whether the control of the CS is segregated across such microzones may require the use of specific strategies (39) to restrict the expression of the opsin to

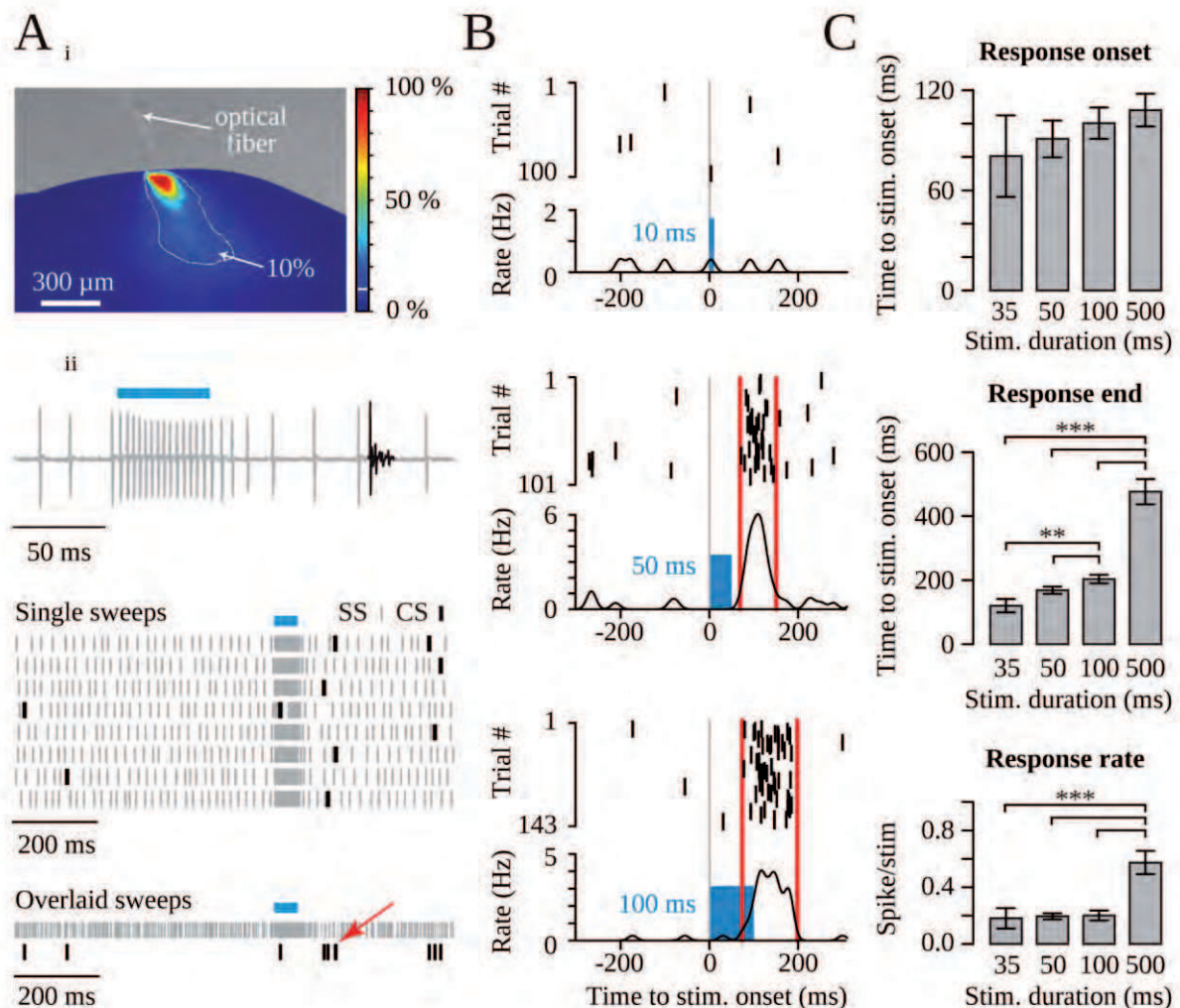


Fig. 4. Photostimulation of Purkinje cells controls inferior olivary cell discharge. **(A, i)** Blue-light propagation observed in a transverse section of the cerebellar cortex using a 100- μ m optical fiber. The same code as in Fig. 3A. **(A, ii)** Individual trace from in vivo juxtacellular PC recordings and corresponding raster plot for both simple spikes (gray ticks) and CSs (black ticks, the signature of olivary cell discharge in PCs). Light illumination elicited CSs in the recorded PC. The arrow indicates the evoked complex spikes. **(B)** Example raster plot and average peri-stimulation firing rate (obtained from the density of spikes convolved with a Gaussian kernel with a 10-ms variance) of CSs recorded with 10-, 50-, and 100-ms illumination pulses (blue rectangles). Red lines identify the time periods with significant increase in the CS firing rate relative to baseline. **(C)** Mean latency from stimulation onset to response onset (*Top*, no significant difference, $F_{1,56} = 0.074$, $P = 0.79$) and response end (*Middle*, significant difference across conditions, $F_{1,56} = 465$, $P < 10^{-4}$), and mean response rate (spike/stim, *Bottom*, significant difference across conditions, $F_{1,56} = 56$, $P < 10^{-4}$) for 35-, 50-, 100-, and 500-ms pulses ($n = 4, 13, 19$, and 11 cells, respectively; 50–200 trials by conditions). *, **, *** $P < 0.05, 0.01$, and 0.001, respectively.

single microzones and therefore circumvent the difficulty of illuminating very narrow bands of cells. The closed cortico-nucleo-olivary loops will favor the triggering of a CS volley in a subset of PCs shortly after their firing rate is increased. Moreover, because the nucleo-olivary inhibitory pathway targets gap junctions between olivary cells and promotes their decoupling (7, 40), the inhibition of this pathway should promote CS synchrony (19, 41). This feedback excitatory loop could also modulate plasticity in the cerebellar cortex, for example, at the parallel fiber to PC synapse because the delay between the onset of the increased PCs firing and the rebound CS (around 100 ms) matches the optimal interval between parallel-fiber and climbing-fiber discharges required for the induction of long-term depression (42, 43). Indeed, the nucleo-olivary pathway has been proposed to play important roles in conditioning (44, 45), and an appealing possibility is that the cortico-nuclear pathway controls the contribution of the nucleo-olivary pathway to motor learning. A wide range of theoretical and experimental evidence has led to the proposal that learning mechanisms in the cerebellar cortex underlie the formation and the storage of internal models of the sensory-motor system (46). These models convert desired movements into motor commands or predict sensory outcomes of planned movements (47); the adjustment of the models is performed by supervised learning via the climbing fibers. The cortico-nucleo-olivary pathway described in our study provides a way to propagate the predictions computed in the cerebellar cortex to the inferior olive, where it can be compared, with an appropriate delay, with the actual outcome of the ongoing task carried by other inputs to the inferior olive. Therefore, the closed cortico-nucleo-olivary loops may play an essential role in adjusting the internal models in the cerebellum.

METHODS

All experimental procedures conform to Centre National de la Recherche Scientifique and National Institutes of Health guidelines on animal experimentation. A BAC transgenic mouse expressing channelrhodopsin-2(H134R) under the control of the regulatory elements of the L7-pcp2 gene was generated (21) (SI Methods and Fig. S1). *In vivo* extracellular recordings of PCs were performed in anesthetized animals (SI Methods). Means were given \pm SD unless otherwise stated.

Acknowledgments. We thank Pr Karl Deisseroth for kindly providing the pAAV-double floxed-hChr2(H134R)EYFP-WPRE-pA vector. We thank the Mouse Clinical Institute, Laurence Huck, and Cassidy Fiford for technical assistance. We thank Samuel Garcia for support on software and Boris Barbour and Nancy Grant for comments on this manuscript. This work was supported by the Centre National pour la Recherche Scientifique, Ecole Normale Supérieure, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université de Strasbourg, Ministère de la Recherche, Agence Nationale pour la Recherche Grants ANR-09-MNPS-038 CeCoMod, ANR-2010-JCJC-1403-1 MicroCer, and ANR-GUI-AAP-04 Sensocode; the INTERREG IV Rhin Supérieur Program; and the European Funds for Regional Development, TIGER project. Publication costs are supported by the Neurex network (www.neurex.org).

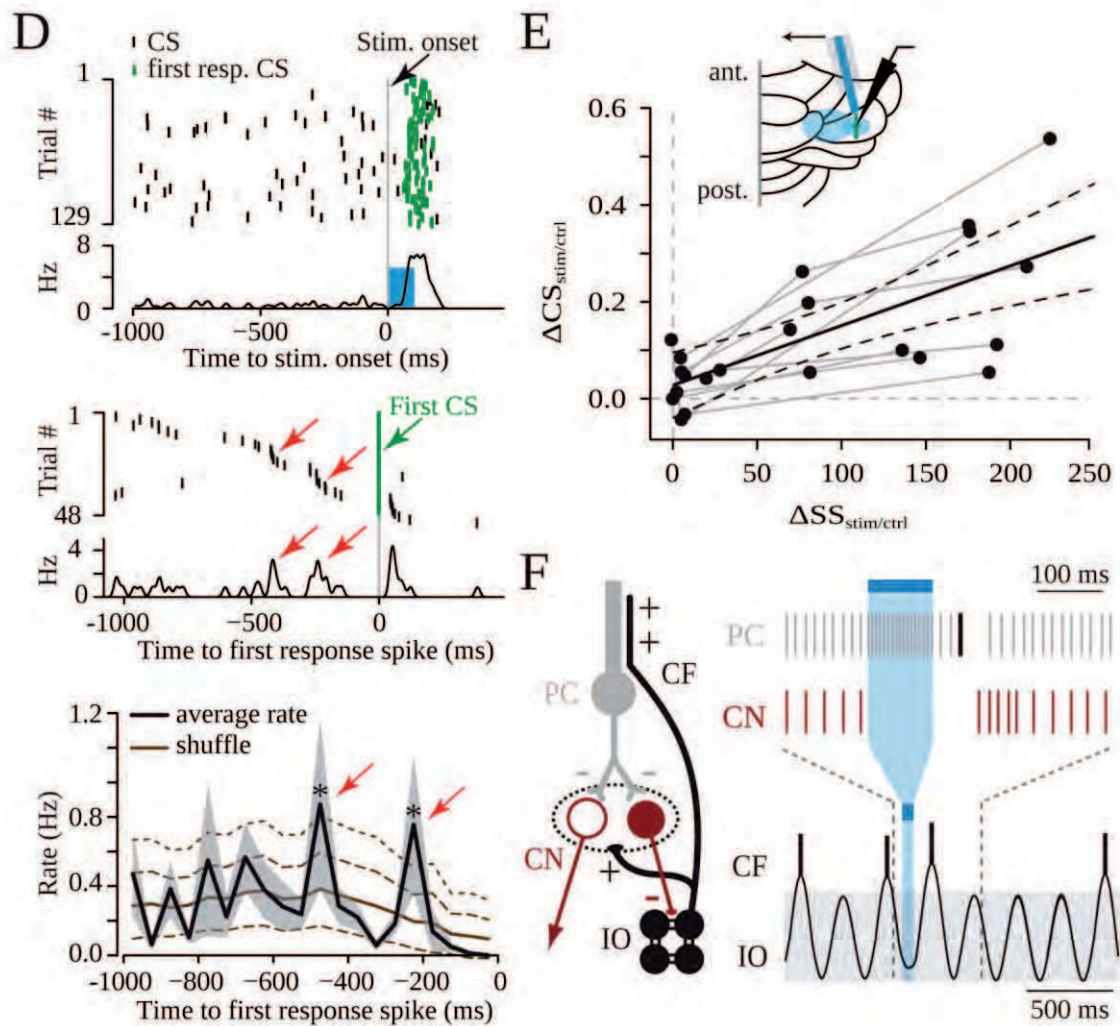


Fig. 4bis. Photostimulation of Purkinje cells controls inferior olivary cell discharge. **(D)** Influence of the recent history of CS firing on the timing of the disinhibitory response. For each cell, the PSTH (*Top*) was recalculated to realign the trials on the time of the first CS after stimulus onset (*Middle*, green CSs are aligned, trials without CS are not represented). In the example (*Middle*), the trials are sorted by decreasing ISIs before the response CS showing that the first response spikes occurred preferentially after specific ISIs (red arrows); in some trials, the illumination triggered two CSs yielding a peak at positive times. The realigned PSTH were averaged for eight cells (*Bottom*) and compared with the expected values after randomly shifting the prerresponse CS (± 300 ms). The disinhibitory response occurred preferentially after specific intervals (*) after the last prestimulation CS spikes. Dashed and dotted lines represent shuffled PSTH ± 1 SD and ± 2 SD respectively. **(E)** Increase of CS frequency against the modulation of simple spike frequency after blue-light illumination at different optical-fiber position. Points acquired from the same cell are connected by a gray line. A linear fit (black line, $r^2 = 0.7$) with confidence interval at 95% (dashed black line) is superimposed on the data showing the correlation between direct PC activation and CS response (and the simultaneous disappearance of both responses when the fiber is moved away). **(F)** Diagram of the synaptic connections in the olivo-cortico-nucleo-olivary loop and illustration of discharge in Purkinje cells, CN neurons, and olivary cells based on our results. Blue light activates PCs (simple spike firing rate increased during stimulation, gray ticks) that stop CN neuron discharge and consequently disinhibit inferior olive neurons. A CS is then observed in PCs. Ticks illustrate neuronal discharge.

REFERENCES

1. Ito M (2006) Cerebellar circuitry as a neuronal machine. *Prog Neurobiol* 78(3-5):272–303.
2. Thach WT, Goodkin HP, Keating JG (1992) The cerebellum and the adaptive coordination of movement. *Annu Rev Neurosci* 15:403–442.
3. Dean P, Porrill J, Ekerot C-F, Jörntell H (2010) The cerebellar microcircuit as an adaptive filter: Experimental and computational evidence. *Nat Rev Neurosci* 11(1):30–43.
4. Ito M (1984) *The Cerebellum and Neural Control* (Raven, New York).
5. De Zeeuw CI, et al. (2011) Spatiotemporal firing patterns in the cerebellum. *Nat Rev Neurosci* 12(6):327–344.
6. Llinás RR (2011) Cerebellar motor learning versus cerebellar motor timing: The climbing fibre story. *J Physiol* 589(Pt 14):3423–3432.
7. Yarom Y, Cohen D (2002) The olivocerebellar system as a generator of temporal patterns. *Ann N Y Acad Sci* 978:122–134.
8. Barmack NH (2006) Inferior olive and oculomotor system. *Prog Brain Res* 151:269–291.
9. Oscarsson O (1979) Functional units of the cerebellum—sagittal zones and microzones. *Trends Neurosci* 2:143–145.
10. Voogd J, Glickstein M (1998) The anatomy of the cerebellum. *Trends Neurosci* 21(9):370–375.
11. Apps R, Hawkes R (2009) Cerebellar cortical organization: A one-map hypothesis. *Nat Rev Neurosci* 10(9):670–681.
12. Glickstein M, Sultan F, Voogd J (2011) Functional localization in the cerebellum. *Cortex* 47(1):59–80.
13. Nelson BJ, Adams JC, Barmack NH, Mugnaini E (1989) Comparative study of glutamate decarboxylase immunoreactive boutons in the mammalian inferior olive. *J Comp Neurol* 286(4):514–539.
14. Teune TM, van der Burg J, de Zeeuw CI, Voogd J, Ruigrok TJ (1998) Single Purkinje cell can innervate multiple classes of projection neurons in the cerebellar nuclei of the rat: A light microscopic and ultrastructural triple-tracer study in the rat. *J Comp Neurol* 392(2):164–178.
15. Teune TM, van der Burg J, van der Moer J, Voogd J, Ruigrok TJ (2000) Topography of cerebellar nuclear projections to the brain stem in the rat. *Prog Brain Res* 124:141–172.
16. Bengtsson F, Hesslow G (2006) Cerebellar control of the inferior olive. *Cerebellum* 5(1):7–14.
17. Best AR, Regehr WG (2009) Inhibitory regulation of electrically coupled neurons in the inferior olive is mediated by asynchronous release of GABA. *Neuron* 62(4):555–565.
18. Bazzigaluppi P, Ruigrok T, Saisan P, De Zeeuw CI, de Jeu M (2012) Properties of the nucleo-olivary pathway: An *in vivo* whole-cell patch clamp study. *PLoS ONE* 7(9):e46360.
19. Marshall SP, Lang EJ (2009) Local changes in the excitability of the cerebellar cortex produce spatially restricted changes in complex spike synchrony. *J Neurosci* 29(45):14352–14362.
20. Chen X, et al. (2010) Disruption of the olivo-cerebellar circuit by Purkinje neuronspecific ablation of BK channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(27):12323–12328.
21. Gong S, et al. (2003) A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. *Nature* 425(6961):917–925.
22. Lin JY (2011) A user's guide to channelrhodopsin variants: Features, limitations and future developments. *Exp Physiol* 96(1):19–25.

23. Berndt A, et al. (2011) High-efficiency channelrhodopsins for fast neuronal stimulation at low light levels. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(18):7595–7600.
24. Person AL, Raman IM (2012) Purkinje neuron synchrony elicits time-locked spiking in the cerebellar nuclei. *Nature* 481(7382):502–505.
25. Bengtsson F, Ekerot CF, Jörntell H (2011) *In vivo* analysis of inhibitory synaptic inputs and rebounds in deep cerebellar nuclear neurons. *PLoS ONE* 6(4):e18822.
26. Khosrovani S, Van Der Giessen RS, De Zeeuw CI, De Jeu MT (2007) *In vivo* mouse inferior olive neurons exhibit heterogeneous subthreshold oscillations and spiking patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(40):15911–15916.
27. Zhao S, et al. (2011) Cell type-specific channelrhodopsin-2 transgenic mice for optogenetic dissection of neural circuitry function. *Nat Methods* 8(9):745–752.
28. Uusisaari M, Knöpfel T (2011) Functional classification of neurons in the mouse lateral cerebellar nuclei. *Cerebellum* 10(4):637–646.
29. Tadayonnejad R, et al. (2010) Rebound discharge in deep cerebellar nuclear neurons *in vitro*. *Cerebellum* 9(3):352–374.
30. Aizenman CD, Linden DJ (1999) Regulation of the rebound depolarization and spontaneous firing patterns of deep nuclear neurons in slices of rat cerebellum. *J Neurophysiol* 82(4):1697–1709.
31. Alviña K, Walter JT, Kohn A, Ellis-Davies G, Khodakhah K (2008) Questioning the role of rebound firing in the cerebellum. *Nat Neurosci* 11(11):1256–1258.
32. Hoebeek FE, Witter L, Ruigrok TJ, De Zeeuw CI (2010) Differential olivo-cerebellar cortical control of rebound activity in the cerebellar nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(18):8410–8415.
33. Miall RC, Keating JG, Malkmus M, Thach WT (1998) Simple spike activity predicts occurrence of complex spikes in cerebellar Purkinje cells. *Nat Neurosci* 1(1):13–15.
34. Ruigrok TJ, de Zeeuw CI, van der Burg J, Voogd J (1990) Intracellular labeling of neurons in the medial accessory olive of the cat. I. Physiology and light microscopy. *J Comp Neurol* 300(4):462–477.
35. Lang EJ, Sugihara I, Llinás R (1996) GABAergic modulation of complex spike activity by the cerebellar nucleoolivary pathway in rat. *J Neurophysiol* 76(1):255–275.
36. Sugihara I, et al. (2009) Projection of reconstructed single Purkinje cell axons in relation to the cortical and nuclear aldolase C compartments of the rat cerebellum. *J Comp Neurol* 512(2):282–304.
37. Ozden I, Sullivan MR, Lee HM, Wang SS (2009) Reliable coding emerges from coactivation of climbing fibers in microbands of cerebellar Purkinje neurons. *J Neurosci* 29(34):10463–10473.
38. Ghosh KK, et al. (2011) Miniaturized integration of a fluorescence microscope. *Nat Methods* 8(10):871–878.
39. Tsubota T, Ohashi Y, Tamura K (2013) Optogenetics in the cerebellum: Purkinje cell-specific approaches for understanding local cerebellar functions. *Behav Brain Res*, 10.1016/j.bbr.2013.04.019.
40. de Zeeuw CI, Holstege JC, Ruigrok TJ, Voogd J (1989) Ultrastructural study of the GABAergic, cerebellar, and mesodiencephalic innervation of the cat medial accessory olive: Anterograde tracing combined with immunocytochemistry. *J Comp Neurol* 284(1):12–35.
41. Welsh JP, Llinás R (1997) Some organizing principles for the control of movement based on olivocerebellar physiology. *Prog Brain Res* 114:449–461.

42. Safo P, Regehr WG (2008) Timing dependence of the induction of cerebellar LTD. *Neuropharmacology* 54(1):213–218.
43. Wang SS, Denk W, Häusser M (2000) Coincidence detection in single dendritic spines mediated by calcium release. *Nat Neurosci* 3(12):1266–1273.
44. Rasmussen A, Jirenhed DA, Hesslow G (2008) Simple and complex spike firing patterns in Purkinje cells during classical conditioning. *Cerebellum* 7(4):563–566.
45. Kim JJ, Krupa DJ, Thompson RF (1998) Inhibitory cerebello-olivary projections and blocking effect in classical conditioning. *Science* 279(5350):570–573.
46. Ito M (2008) Control of mental activities by internal models in the cerebellum. *Nat Rev Neurosci* 9(4):304–313.
47. Kawato M (1999) Internal models for motor control and trajectory planning. *Curr Opin Neurobiol* 9(6):718–727.

SUPPORTING INFORMATION

SI METHODS

BAC Modification and Transgenic Mice. A 1-kb homology box located 5' of the ATG of the *pcp2* gene was amplified by PCR from bacterial artificial chromosome (BAC) RP24-186D18 and subcloned in the pLD53.SC2 shuttle vector. The cDNA encoding hChr2(H134R)EYFP was amplified from the vector pAAV-double floxed-hChr2(H134R)EYFP-WPRE-pA (kindly provided by K. Deisseroth, Stanford University, Stanford, California), and placed behind the *pcp2* homology box. The resulting *pcp2*/hChr2(H134R)EYFP shuttle vector was used to modify the BAC RP24-186D18 by homologous recombination according to previously published protocols (1). The recombination design allows the replacement of the *pcp2* ATG by the cDNA construct in the BAC, effectively placing the expression of the channelrhodopsin hChr2(H134R)EYFP construct under the control of the regulatory elements of the *pcp2* gene. Correct modification of the RP24-186D18 BAC was visualized by Southern blot on BAC DNA digested by EcoRI, separated on 0.8% agarose gel, and probed with digoxigenin-labeled *pcp2* homology box. Pulsed-field gel electrophoresis was performed on BAC DNA digested by SpeI. A correctly modified BAC was selected (Fig. 1A) based on the pattern observed by Southern blot and pulsed-field gel analysis (including no visible reorganization of the BAC). This BAC was amplified and purified using a cesium chloride gradient. DNA was then dialyzed in oocyte injection buffer for generation of transgenic mice (injection performed by the Institut Clinique de la Souris, Illkirch, France). Founders were genotyped using two sets of primers ensuring the integrity of the inserted BAC: one set in the BAC backbone (forward: 5'GTGATATCGCGGAAGGAAA3'; reverse: 5'AGGATATACGGCAGGCATTG3'), another set encompassing the L7 homology box and the Chr2 cDNA (forward: 5'GCTCTTCAACCTGCTGACC3'; reverse: 5'aaaaatgtgttcgcccata3').

In vitro Recordings. All experimental procedures conformed to Centre National de la Recherche Scientifique and National Institutes of Health guidelines on animal experimentation. Slices were prepared from juvenile L7-ChR2-eYFP mice (postnatal 15 to 24) as described in ref. 2. Following anesthesia by isoflurane inhalation, animals were killed by decapitation, the cerebellum was dissected out and placed in a cold artificial cerebrospinal fluid (ACSF) (4 °C) bubbled with carbogen [95% O₂, 5% CO₂ (vol/vol)], containing in mM: NaCl 120; KCl 3; NaHCO₃ 26; NaH₂PO₄ 1.25; CaCl₂ 2.5; MgCl₂ 2. Glucose 10, Minocyclin 0.00005 (Sigma-Aldrich). The 330 μm-thick sagittal slices were prepared (Microm HM 650V, Microm) in potassium-based medium, containing in mM: K-gluconate 130; KCl 14.6; EGTA 2; Hepes 20; Glucose 25; minocyclin 0.00005, and D-AP5 0.05. This method was used to protect acute brain slices during cutting (3). After cutting, slices were soaked a few seconds in a sucrose-based medium at 34 °C, containing in mM: sucrose 230; KCl 2.5; NaHCO₃ 26; NaH₂PO₄ 1.25; glucose 25; CaCl₂ 0.8; MgCl₂ 8; minocyclin 0.00005; and D-APV 0.05. Slices were maintained in a water bath at 34 °C in bubbled ACSF. Experiments were done at 34 °C using the same bubbled ACSF. Drugs were obtained from Tocris-Cookson or Ascent Scientific. Purkinje cells (PCs) were whole-cell patch-clamped both in voltage and current clamp mode using 3- to 4-MΩ pipettes with a Multiclamp 700 amplifier (Molecular Devices), and optimal series resistance (R_s) compensation (80% of 5–10 MΩ typically) was applied. R_s was monitored in all experiments, and cells were held at –60 mV (Figs. 1 and 2) or –70 mV (Fig. S2). The pipette solution contained (in mM): KMeSO₄ 135; NaCl 6,

Hepes 10; MgATP 4; Na2GTP 0.4, with pH adjusted to 7.3 with KOH and osmolarity to 300 mOsm. Voltages were not corrected for the liquid junction potential, which was calculated to be 9 mV (i.e., the real membrane potential was 9 mV more hyperpolarized than reported). Currents in Purkinje cells were low-pass filtered at 2 kHz, and then sampled at 20-50 kHz. Acquisition of data and control of light illumination were performed using the WinWCP 4.2.x freeware (John Dempster, University of Strathclyde, Glasgow, UK).

***In vitro* Photostimulation.** For experiments of Fig. 2 C and D, PCs were photostimulated using wide field LED-based illumination (collimated LED M470L2-C1 powered by a T-cube LEDD1B driver from Thorlabs or a collimated black LED 460 nm from Prizmatix) through the objective (20×, NA = 0.5) of the microscope (BX51 Olympus). Irradiance was measured with a PM100D power meter equipped with an S120C photodiode sensor (Thorlabs) under the objective, and the illuminated area was estimated to a disk of 600 μm . In Fig. 2B, a 473-nm diode-pumped solidstate (DPSS) laser (CrystaLaser) was used for laser scan illumination on an Olympus microscope. In Fig. S2, photostimulation at 460nm (Lumen Dynamics X-cite XLED1) was carried out on an optogenetic workstation based on a Leica DM6000 FS fixedstage microscope, with patterned illumination (digital micromirror device; AndorTM Mosaic). The position and shape of illumination masks were verified by using a mirror slide straight after the experiment. The homogeneous illumination over masks of defined size enabled the accurate calibration of the irradiance. Recorded PCs were loaded with alexa 568 to draw the masks and estimate their depth (on average $\sim 30 \mu\text{m}$ below the slice surface).

Surgery. Mice were anesthetized using urethane (1.9 g/kg i.p.) and mounted in a stereotaxic frame (Model 942; David Kopf Instruments; or SR-6M; Narishige). Their body temperature was maintained at 36–37 °C throughout the experiment using a heating blanket controlled by rectal temperature (CMA 450, CMA or TC-1000; CWE Inc). Before scalp incision, 3% lidocaine was injected s.c. at the incision site. After incision, the skull was exposed, and a craniotomy was drilled above the right cerebellar hemisphere. During surgery, a long pass filter (cut on 550 nm) on white-light apparatus was used to avoid spurious Chr2 activation. The surface of the cerebellum was kept moist with a saline solution throughout the experiment. For juxtacellular recordings, mice were ventilated (SAR-830/P, BIOSEB; Dwyer). All *in vivo* electrophysiological experiments were performed on anesthetized mice.

Rotarod. To evaluate motor coordination, mice were placed on immobile rotarod cylinders, which ramped up from 0 to 45 rotations per minute (IITC) in 180 s. The timer was stopped when the mouse fell off the cylinder or did a whole turn with it. For a given session, this procedure was repeated three consecutive times. The full experiment comprised three sessions per animal, separated by 90 min.

***in vivo* Juxtacellular Recordings and Data Analysis.** Juxtacellular recordings in anesthetized mice were made as in ref. 4 using 15–30 M Ω resistance borosilicate glass pipettes (Warner Instruments), filled with a 0.5 M NaCl solution and mounted on motorized micromanipulators (Luigs and Neumann). Data were recorded and filtered between 300 Hz and 5 kHz and sampled at 20 kHz using an amplifier in current clamp mode (ELC 03XS; NPI). Acquisition of data and control of light illumination were performed using the WinWCP 4.2.x freeware (John Dempster). Spike sorting and data storage were designed with OpenElectrophy open source software in a sql environment (<http://neuralensemble.org/OpenElectrophy/>) [Garcia and Fourcaud-Trocmé (5)].

Cerebellar Nuclei Recordings. For electrophysiological recordings, a commercial quartz tetrode (Thomas Recordings) was lowered into the right nucleus interpositus (from Bregma, -6.2 to -6.4 mm antero-posterior (AP), 1.5 – 2.0 mm medio-lateral (ML), and 2.4 – 2.8 mm below brain surface). As we showed earlier, these tetrodes produce more reliable penetrations of the cerebellar cortex and less tissue damage than conventional wire tetrodes (6). Each tetrode was covered with dye (Vybrant DiI; Life Technologies), and its position in the nucleus interpositus was verified by post hoc analysis of cryostat brain sections. Extracellular potentials measured by the tetrode were amplified and digitized using a System 3 workstation purchased from Tucker Davis Technologies.

***In vivo* Photostimulation of Purkinje Cells.** Light was delivered to discrete areas of the exposed cerebellar surface using a highbrightness blue light emitting diode (LED) coupled with optical fibers of different diameters (50 , 100 , 200 , and 600 μm , numerical aperture 0.22 , 0.22 , 0.48 , and 0.37), purchased from Prizmatix or Doric Lenses. The LED had a peak wavelength of 460 or 463 nm and a spectral bandwidth (full-width at half maximum) of 27 or 24 nm. Light pulses were generated using a universal LED controller (Prizmatix; SLC-AA02-US; Mightex Systems) triggered from the electrophysiology acquisition software (WinWCP or Tucker-Davis). Optical power at the fiber tip was measured with a PM100D power meter equipped with an S120C photodiode sensor (Thorlabs). The waveform and timing of individual light pulses were monitored using a silicon photodiode (SM1PD1A; Thorlabs). All values of irradiance in the text correspond to the value at the tip of the optic fiber. For photostimulation of Purkinje cells, the tip of the optical fiber was positioned in close vicinity or in contact with the cerebellar surface (except in the experiments where the fiber was moved while recording the cell).

Initially, a 200 - μm fiber was used to study Purkinje-cell response to blue light in juxtacellular recordings and control the emission of spikes by olivary cells as shown in Fig. 4. In an attempt to restrict the spread of light, a set of experiments with a fiber of 100 μm diameter (and a few experiments using a fiber of 50 μm) was performed. In these experiments, the irradiance at the tip of the optical fiber was adjusted to compensate for light diffusion between the optical fiber and the recorded PC (and its neighbors), so that it generated a strong increase in the frequency of simple spikes but remained below the threshold triggering depolarization block in the recorded PC.

A 600 - μm -diameter fiber combined with high irradiance was used for the recordings in the cerebellar nuclei: in these experiments we needed to stimulate a larger area to increase the chance to stimulate the few tens of Purkinje cells that contact the cerebellar nuclei (CN) units recorded.

In the experiment of Fig. 4E for which the fiber was moved while recording the PC, the fiber had to be kept distant from the surface to avoid the loss of the cell, thus yielding more diffuse activation [these data were analyzed by comparing the occurrence of the light-evoked complex-spike (CS) response to the modulation of the simple-spike discharge as a signature of a direct effect].

Estimation of the Number of Stimulated Purkinje Cells. To estimate the number of cells activated during photostimulation, we first assessed the volume of tissue that received enough light to increase the simple spike firing rate and then calculated the number of Purkinje cells in this volume.

We first performed a series of experiments as in ref. 7 using freshly dissected hemisectioned cerebellum maintained in saline and embedded in 2% agarose gel to hold the surface horizontal. An opening in the agarose gel surrounding the tissue was made around CrusII to bring an optical fiber

next to the cerebellar surface. The optical fibers (100 μm core 0.22 NA and 600 μm core 0.37 NA) were positioned against the pia in a plane parallel to the section and with a distance and angle relative to the surface as in the *in vivo* CN recordings (Fig. 3) and evoked CS experiments (Fig. 4 A–D). The cut surface was imaged from the top using a CCD camera; this measure provides a coarse estimate of the power density distribution in the depth of the cerebellar cortex. Series of images were collected while the optical fiber was translated vertically to change the distance between the axis of the fiber and the plane of the section (Fig. S5), thus exploring the lateral extension of the power density profiles.

We then estimated the volume receiving enough light to activate Purkinje cells (i.e., irradiances ≥ 2 mW/mm²) in experiments aimed at studying the nuclear and olivary responses (Figs. 3A and 4A). For irradiance of 20 mW/mm² at the fiber tip (intensity used for mapping the CN responsive area and mean intensity in the study of olivary disinhibition), we identified on all images the pixels with intensities above 10% of the intensity of the brightest pixel immediately underneath the fiber. (This provides probably an overestimation of the volume because, for this brightest pixel, the irradiance is probably lower than the irradiance at the fiber tip, and thus the 10% threshold corresponds to an even lower irradiance threshold.) For the 100- μm fiber, this volume has a roughly conical shape, with a maximal width of 360 μm in the transverse direction and 800 μm in the sagittal direction. For the 600- μm fiber, we found a roughly spherical volume with a diameter of 1,300 μm . Purkinje cells are organized in layers that are intersecting these volumes. For planar layers, this intersection will have an elliptic surface of at most 0.2 mm² for the 100- μm fiber, and a circular surface of at most 1.3 mm² for the 600- μm fiber. In the mouse, the total surface of the Purkinje-cell layer has been estimated to ~ 190 mm² (8) or 80 mm² (9). According to these authors, the patch of activated Purkinje cells will represent 0.1–0.25% (respectively 0.7–1.6%) of the total Purkinje-cell layer surface when using a 100- μm (respectively 600 μm) optical fiber. Using a density of Purkinje cell of 1,018 per mm² [Napper and Harvey (10)], this estimation would yield ~ 200 Purkinje cells per layer for the 100- μm fiber and $\sim 1,300$ Purkinje cells per layer for the 600- μm fiber at 20 mW/mm². For irradiance of 60 mW/mm² (used to study CN responses), the volume receiving enough light to activate Purkinje cells had a radial extension of 1 mm and maximal depth of 1.5 mm (with thus $\sim 3,000$ Purkinje cells per layer activated), whereas the volume exposed to intensities above 10 mW/mm² (which provides a conservative volume where depolarization block may occur) has a radial extension of 450 μm and maximal depth of 750 μm , and thus represents only $\sim 10\%$ of the activated volume. The 60 mW/mm² condition will thus increase the volume stimulated by a factor of 5 compared to the 20 mW/mm² condition.

Because we computed the widest intersection of a planar Purkinje cell layer, these numbers provide only order-of-magnitude estimates and not accurate numerical predictions; depending on the recording site, the topology of the lobule may bring one or two layers within the photostimulated volume. Therefore, we may consider that with a 100- μm fiber, we will activate 200–500 Purkinje cells whereas these numbers may be closer to 1,000–3,000 Purkinje cells with a 600- μm optic fiber at 20 mW/mm² and 5,000–10,000 Purkinje cells at 60 mW/mm².

CN Data Analysis. Single units were isolated as described previously (4, 11). Briefly, spikes were detected by thresholding of a highpass filtered version (1 kHz) of the continuous recording, and the main parameters of their waveforms were extracted. The data were then hand clustered by polygon-cutting in 2-dimensional projections of the parameter space using Xclust (Matt Wilson,

Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA). The quality of clustering was evaluated by inspecting the autocorrelograms of the units. To assess the presence of inhibition and to quantify its intensity, we applied more than 150 light pulses of various durations and intensities at 1 Hz or 0.3 Hz. Peri-stimulus-histograms (PSTHs) with bins of 2 ms were constructed. The latency to full inhibition corresponded to the time to the first empty bin after light onset, and the duration of full inhibition was obtained by counting the empty bins during or immediately after the light pulse. The instantaneous frequency was computed for each time bin (5 ms) by computing the geometric mean of the inverse of the interspike interval that preceded all of the spikes occurring within this time bin. The ability of rhythmic trains of light pulses to constrain the firing of CN units is reflected by the presence of oscillations in the PSTHs during the stimulation. We therefore computed the power spectral density of PSTHs from experiments with 20 pulses of 12 ms and irradiance of 16.6 mW/mm² at 20 Hz/30 Hz; the peak value in the spectrum was normalized to the total power in the 0- to 100-Hz window.

Statistical Analysis. Means are given \pm SD in the text unless otherwise stated. See figure legends for statistics in figures. Significance levels are indicated in figures as follows: (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$, (***) $P < 0.001$. The parameters (onset, offset, response rate) of the light-evoked CSs were obtained from the density of spikes convolved with a Gaussian kernel with a 20-ms variance; this convolution provides a curve similar to a peristimulus histogram with bin 20 ms; the baseline average (1 s before stimulation) was subtracted from the spike density and the result was divided by the SD of the baseline. Significant departure from baseline over a search period T was detected when this studentized spike density departed by more than a zscore critical value corresponding to $P = 0.05/(T/\text{bin})$. We used a search period starting at light onset and ending 250 ms after the light offset. The response rate is defined as the number of CS observed during the identified time interval of significant deviation from baseline, divided by the number of trial. For the study of the dependence of the timing of CSs to the recent history of CS firing (Fig. 4D), we constructed, for each cell in which CS frequency was above 0.1 Hz and for which at least 20 lightevoked CS were recorded, a PSTH aligned to the first CS response in each trial (with a response). Shuffled PSTHs were obtained by shifting each trial with a random number in the interval (-0.3; 0.3) ms. The average PSTHs were then compared with the average of 300 shuffled PSTHs.

Immunocytochemistry. Mice were perfused with 4%paraformaldehyde, and their brains were postfixed in 4%paraformaldehyde overnight. Sagittal Slices of 35 μm thickness were cut with a vibratome (Leica VT1000). Sections were washed three time with PBS and nonspecific staining was blocked for 24 h using PBS containing 1% BSA, 4% normal goat serum, and 0.5% triton. Slices were incubated for 48 h at 4 °C with the following antibodies: mouse anticallbindin monoclonal antibody (1:1,000; Sigma Aldrich) and rabbit anti-GABA polyclonal antibody (1:1,000; Sigma Aldrich). Then sections were washed with PBS (5 \times 10 min) and incubated for 2 h at room temperature with Alexa Fluor 633-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:500; Invitrogen) and Alexa Fluor 555- conjugated goat anti-mouse antibody (1:500; Invitrogen).

REFERENCES

1. Gong S, et al. (2003) A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. *Nature* 425(6961):917–925.
2. Valera AM, Doussau F, Poulain B, Barbour B, Isope P (2012) Adaptation of granule cell to Purkinje cell synapses to high-frequency transmission. *J Neurosci* 32(9):3267–3280.
3. Dugué GP, Dumoulin A, Triller A, Dieudonné S (2005) Target-dependent use of coreleased inhibitory transmitters at central synapses. *J Neurosci* 25(28):6490–6498.
4. Pinault D (1996) A novel single-cell staining procedure performed *in vivo* under electrophysiological control: Morpho-functional features of juxtacellularly labeled thalamic cells and other central neurons with biocytin or Neurobiotin. *J Neurosci Methods* 65(2):113–136.
5. Garcia S, Fourcaud-Trocme N (2009) OpenElectrophy: An electrophysiological data and analysis-sharing framework. *Front Neuroinform* 3:14.
6. Gao H, Solages Cd, Lena C (2012) Tetrode recordings in the cerebellar cortex. *J Physiol Paris* 106(3-4):128–136.
7. Huber D, et al. (2008) Sparse optical microstimulation in barrel cortex drives learned behaviour in freely moving mice. *Nature* 451(7174):61–64.
8. Sultan F, Braitenberg V (1993) Shapes and sizes of different mammalian cerebella. A study in quantitative comparative neuroanatomy. *J Hirnforsch* 34(1):79–92.
9. Van Essen DC (2002) Surface-based atlases of cerebellar cortex in the human, macaque, and mouse. *Ann N Y Acad Sci* 978:468–479.
10. Napper RM, Harvey RJ (1988) Quantitative study of the Purkinje cell dendritic spines in the rat cerebellum. *J Comp Neurol* 274(2):158–167.
11. de Solages C, et al. (2008) High-frequency organization and synchrony of activity in the purkinje cell layer of the cerebellum. *Neuron* 58(5):775–788.

SI FIGURE

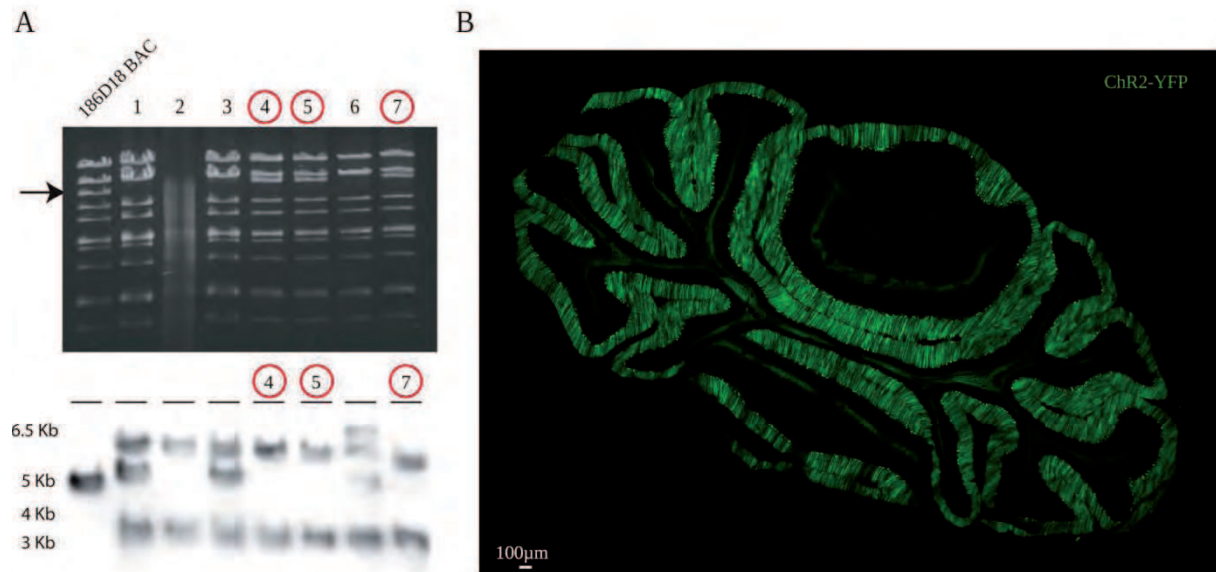


Fig. S1. Construction of L7-ChR2(H134R)-eYFP mice. **(A)** Pulsed-field gel analysis (*Upper*) of Spel-digested BAC DNA confirmed correct insertion of the shuttle vector at the level of the *pcp2* ATG starting codon in exon 2 and ruled out major reorganization of the BAC (only one band shifted compared with the profile of the original BAC vector 186D18, arrow). Correct insertion of the shuttle vector was also checked by Southern blot analysis (*Lower*) using the homology box as a probe (SB probe, Fig. 1) and EcoRI-digested BAC DNA. The correctly recombined clones are circled in red. **(B)** L7-ChR2(H134R)-eYFP expression in cerebellar sections at P40 (50 μm).

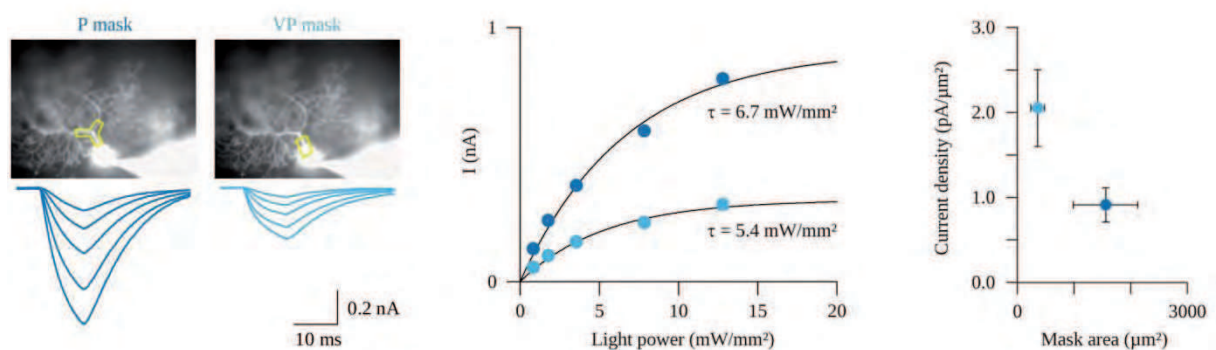


Fig. S2. Density of ChR2 currents in L7-ChR2(H134R)-eYFP Purkinje cells. (*Left*) Representative whole-cell recording from one PC. Currents evoked by 10 ms illumination (460 nm LED) at increasing irradiances (0.83, 1.79, 3.56, 7.84, and 12.80 mW/mm²) over spatial patterns (masks) defined by a digital micromirror device (Mosaic; Andor Technology). The positions of proximal (P) and very proximal (VP) masks were verified by using a mirror slide, and their contours are shown over the recorded PC (loaded with Alexa 568). (*Center*) A 10-ms illumination peak current and their exponential fit plotted against irradiance for the two masks. (*Right*) Density current recorded using the two masks.

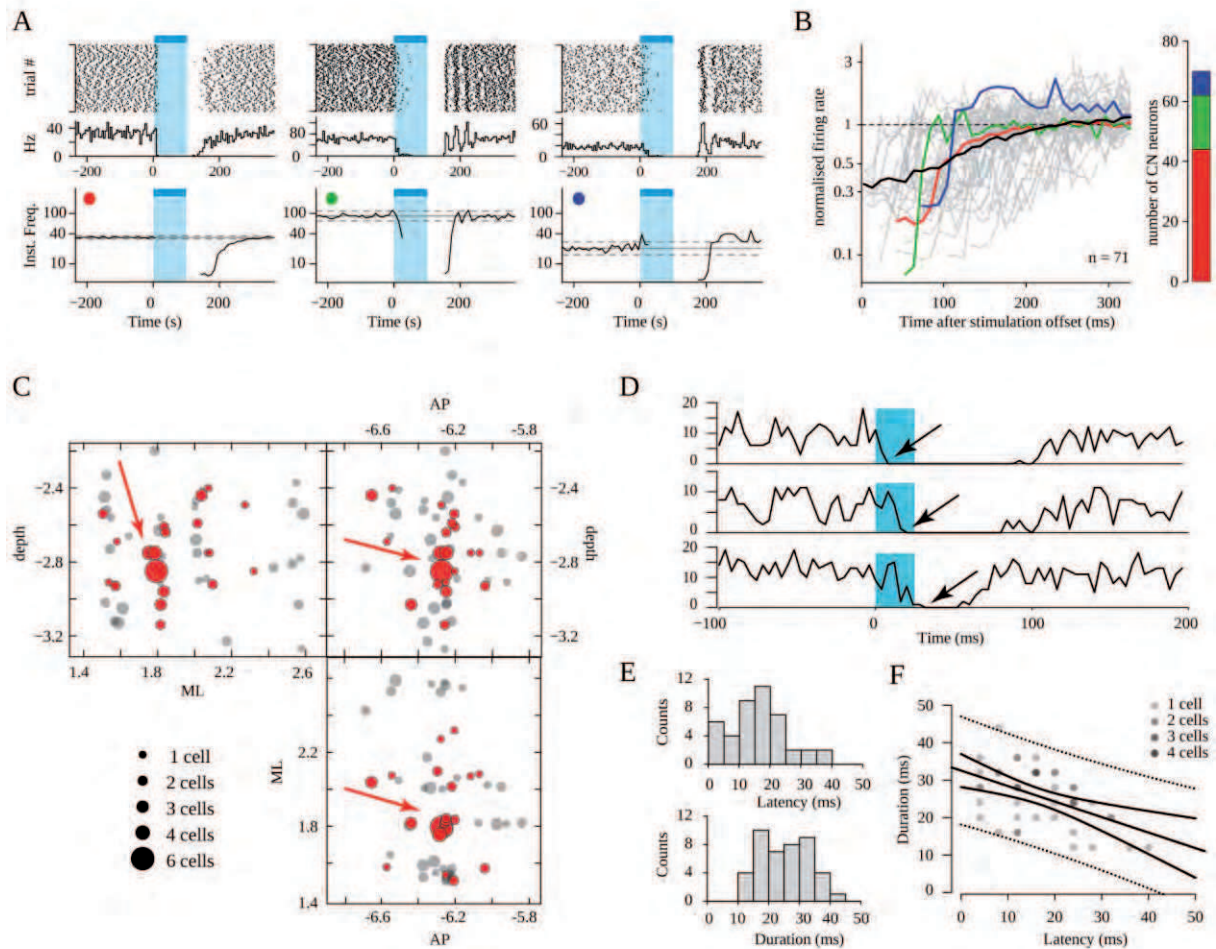


Fig. S3 : Temporal and spatial properties of the light-triggered inhibition of cerebellar nuclear neurons. **(A and B)** Postsuppression firing behavior of cerebellar nuclear cells following photostimulation of Purkinje cells. **(A)** Three examples of cells displaying complete suppression of their firing in response to illumination of the ipsilateral Crus I region (100-ms light pulses, 60 mW/mm²). For each cell, a raster plot (*Upper*) is represented on top of the corresponding PSTH (*Center*; bin, 5 ms) and average instantaneous frequency profile (*Lower*; bin, 10 ms; gray lines correspond to mean \pm 2 SD of the baseline values). Unlike the first cell (red dot), the two other cells (green and blue dot) readily resumed their firing with a strong locking relative to the stimulation. However, only the third cell (blue dot) exhibited a modest but significant peak in the instantaneous frequency, suggestive of a postsuppression "rebound excitation." **(B)** Superimposed (gray) and average (black) instantaneous frequency traces of 70 cells during the postsuppression period (bin, 10 ms). Traces from example cells are plotted in red, green, and blue, respectively. The bar graph summarizes the distribution of the cells in the three categories depending on their postinhibitory behavior: no rebound and progressive return to baseline firing rate (red, $n = 44$); no rebound and time-locked return to baseline firing (green, $n = 18$); rebound (blue, $n = 8$). **(C)** Distribution of the coordinates of CN recording sites where inhibited cells were found (red) or not (black) during illumination of the ipsilateral cerebellar Crus I region [antero-posterior (AP), 6.1; medio-lateral (ML), 3.3; pulse = 100 ms, irradiance = 19 mW/mm²]. The number of cell recorded at each site is represented as the diameter of the points. The red arrow identifies the region where most responsive sites are clustered. See Fig. 3G for a 3D view of the same data. **(D)** Examples of peri-stimulus histograms from three different CN neurons with latency to full inhibition (black arrow) smaller than 10 ms, between 10 and 20 ms, and longer than 20 ms, from top to bottom panels respectively (25 ms, 19 mW/mm², bin = 4 ms). **(E)** Histograms showing the distribution of latency and duration of full inhibition (for 43 cells, 25 ms, 19 mW/mm², bin = 4 ms). **(F)** Plot showing the anti-correlation of these response parameters (linear fit: $r_2 = 0.24$, $P = 8.10 \times 10^{-4}$).

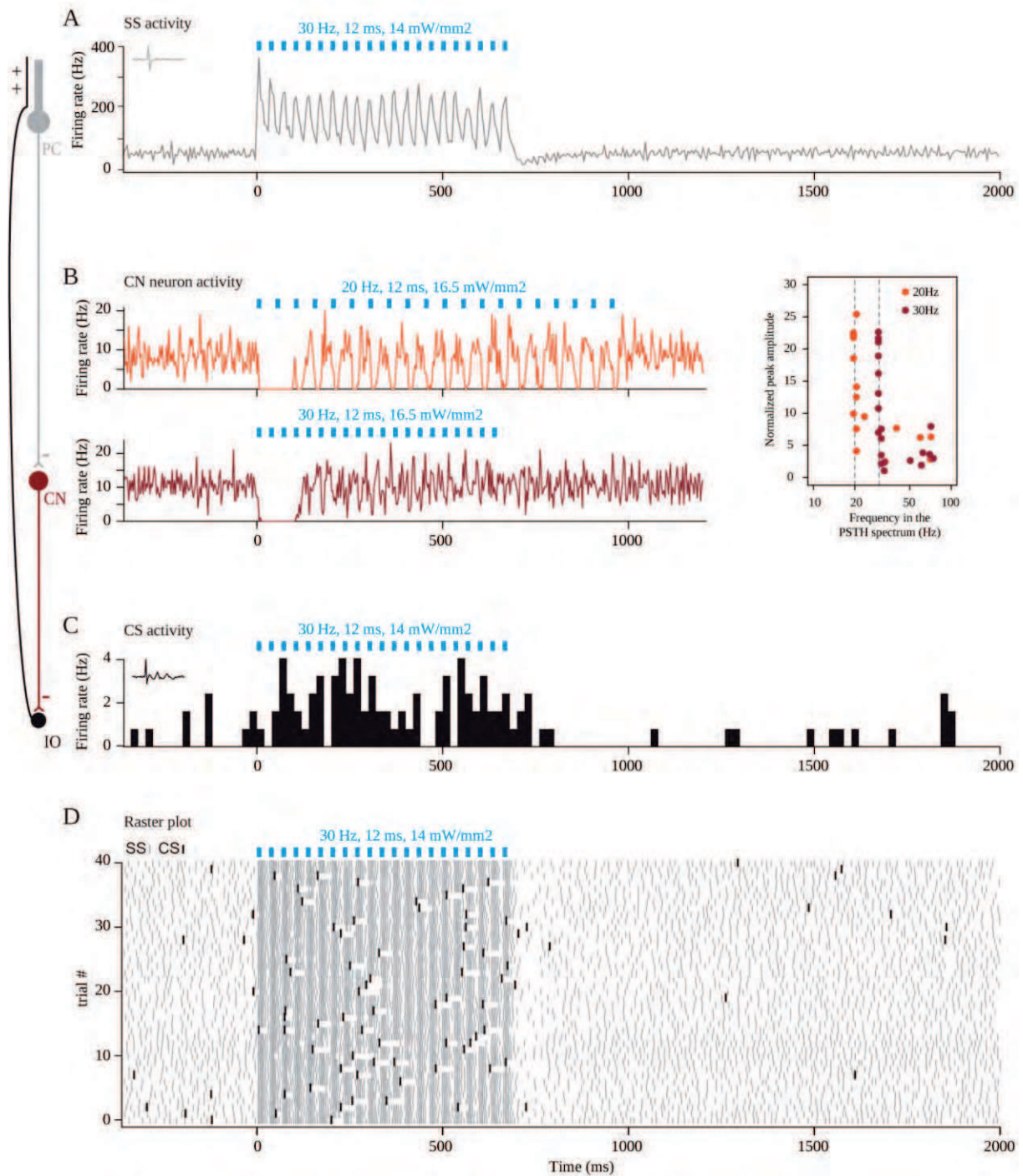


Fig. S4. : Burst of light pulses elicits CSs in PCs in vivo. **(A)** Simple spike PSTH in one PC (bin: 5 ms) during 30 Hz illumination (12 ms light pulse, 14 mW/mm², blue bars). **(B, Left)** PSTH of one CN neuron (bin: 1 ms) in response to trains of illuminations (12-ms light pulses, 16.5 mW/mm², blue bars). After a short period of complete inhibition, the cell discharge was locked to the illumination pulses. **(Right)** For all 22 cells tested with stimulations pulses, the power spectral density of the PSTH (SI Methods) was calculated during the illumination; the presence of a peak at the same frequency as the stimulation evidences a time-locked inhibition of the cells. **(C)** PSTH of light-induced CSs in a PC (bin: 20 ms) during 30-Hz stimulation (same stimulation and same cell as in A). **(D)** Raster plot of simple spikes (gray ticks) and CS (black ticks) activity during 30-Hz stimulation of the cell in A and C. CN and PC are recordings from different set of experiments.

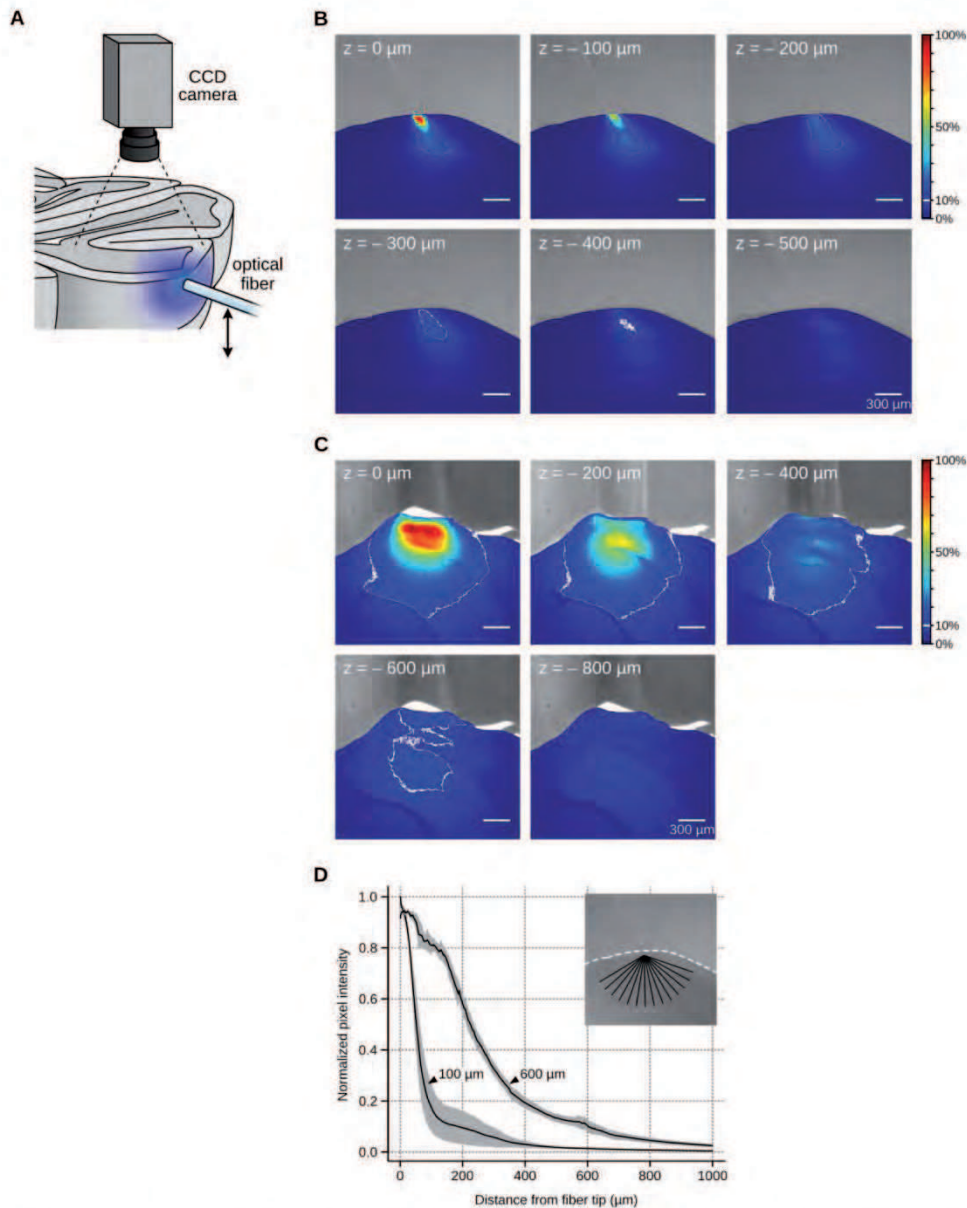


Fig. S5. : Light power density mapping using cerebellar hemisections. **(A)** Schematic of the experimental setup. The cut surface was imaged from the top using a CCD camera whereas the tissue was illuminated from the side through an optical fiber coupled to blue (470 nm) LED. The fiber was translated vertically (two headed arrow) to assess the lateral propagation of light. **(B)** Series of images taken for different vertical fiber positions using a 100- μ m optical fiber with an angle of incidence of $\sim 30^\circ$ and a distance to the pia of around 100 μ m. The position of the fiber relative to the cut surface is indicated in white. Pictures were taken in the dark with a power at the fiber tip of 125 μ W. The intensity of each pixel is expressed as a percentage of the intensity of the brightest pixel of the image series and color coded. The 10% isoline is delineated in white on each image. The color-coded image of the tissue is superimposed on a grayscale picture of the fiber obtained with a brightfield side illumination. Here, the hemisection was done coronally. **(C)** A similar series of images taken for different vertical fiber positions, using a 600- μ m optical fiber. Here, the fiber was affixed perpendicularly to the pia, and the hemisection was performed parasagittally. The power at the fiber tip was 200 μ W. The white patches in the grayscale picture are due to reflections of the brightfield side illumination on the surface of the liquid. **(D)** Decay of the pixel intensity as a function of distance from the brightest pixel. Pixel intensity profiles were measured for the upper fiber position ($z = 0 \mu\text{m}$) along 70 evenly distributed lines drawn through the tissue. All lines originated from the brightest pixel underneath the fiber tip (as indicated in the top right Inset). The average curves calculated from these profiles are plotted for the experiments shown in B and C. Note the much steeper decay of pixel intensity for the 100- μ m fiber. The shaded area represents the SD for the 70 profiles along the lines radiating from the most intense pixel.

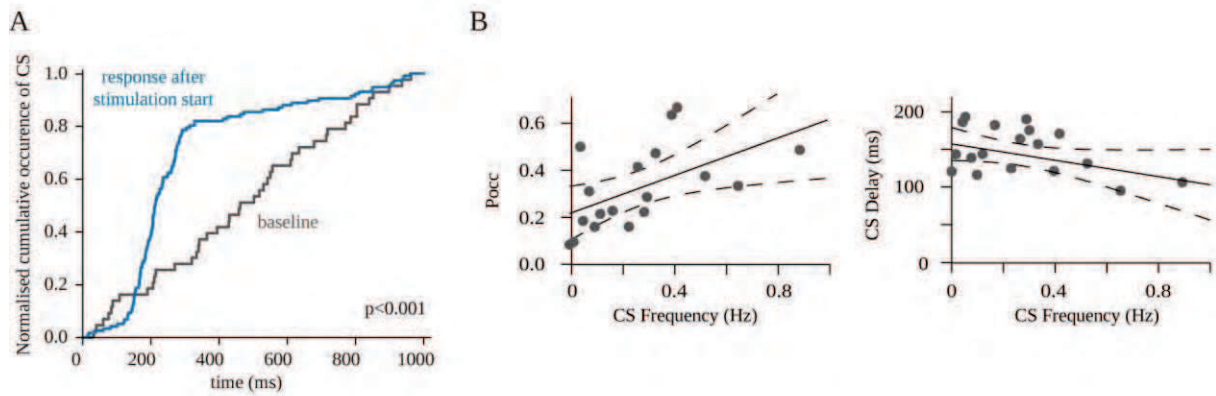


Fig. S6. : Purkinje-cell synchronization triggers complex spike responses. **(A)** Normalized cumulative PSTH of light-induced CS for one cell (bin: 2ms) during 1 s before (gray) and after stimulation start (blue). Cumulative PSTHs were significantly different for 25/42 PCs (Kolmogorov–Smirnov; $P < 0.001$). **(B)** Scatter plot of the probability of occurrence (*Pocc*, *Left*) or the delay (*Right*) of the light-induced CSs as a function of the baseline CS firing rate.

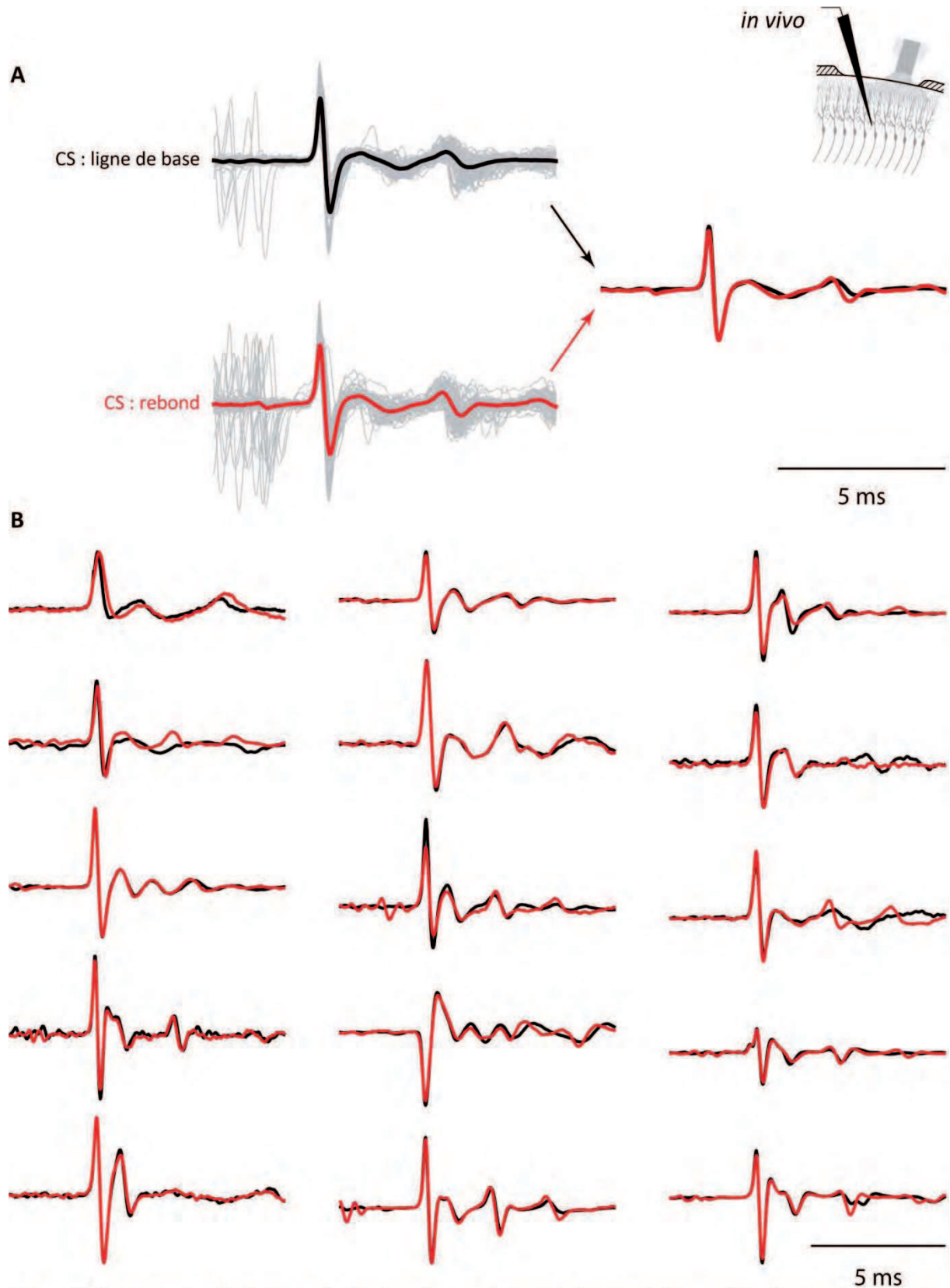


Figure 30 : La forme des CS n'est pas affectée lors du recrutement de la voie cortico-nucléo-olivaire. **A** : Forme des CS enregistrée dans la seconde précédant la stimulation - condition "contrôle" (noir) - ou dans une fenêtre de 50 à 200 ms suivant la stimulation - condition "rebond" (rouge) - et présentation de la superposition des deux moyennes (à droite). Les tracés gris correspondent aux traces individuelles pour lesquelles il est possible de voir occasionnellement une activité SS précédant le CS. **B** : Même procédé qu'en A (droite) pour 15 autres cellules.

DONNEES COMPLEMENTAIRES A L'ARTICLE

1. L'ACTIVATION DE LA VOIE OLIVO-CORTICALE N'AFPECTE PAS LA MORPHOLOGIE DES CS

La forme d'un CS et la longueur de la pause SS sont dépendants du nombre de potentiels d'actions arrivant, sous forme de *burst*, par la fibre grimpante (Mathy et al., 2009). Afin d'évaluer si le recrutement de la voie cortico-nucléo-olivaire influence le type de CS émis dans le cadre du "rebond", nous avons comparé la morphologie de ces derniers avec celle de l'activité CS basale de la cellule enregistrée. La forme moyennée des CS émis dans la seconde précédant la stimulation a été comparée à celle des CS induits entre 50 et 200 ms (fenêtre dans laquelle le CS est évoqué) après le début de la stimulation (figure 30A). Les neurones présentant moins de 20 CS pour une des deux conditions - avant vs après - n'ont pas été inclus dans la figure. Ainsi, l'amplitude du premier potentiel d'action est identique dans 13 cas sur 16 ; le nombre de *spikelets* ne change pas dans 12 cas sur 16 ; la durée et l'amplitude des *spikelets* sont semblables dans 11 cas sur 16. L'observation des 16 cellules permet donc de conclure qu'il n'y a pas de changement majeur de la morphologie des CS émis lors du recrutement de la voie olivo-nucléaire faisant suite à une stimulation des cellules de Purkinje (figure 30B).

2. CORRELATION NEGATIVE DES ACTIVITES SS ET CS

Les données de la littérature font état d'une corrélation négative entre les fréquences des SS et des CS. Afin de vérifier ces informations, nous avons comparé la fréquence de ces deux types de décharges pendant les périodes sans stimulation (1 à 5 min). Il apparaît que l'activité SS et CS des cellules de Purkinje est anticorrélée (figure 31). En revanche, il est possible d'observer une activité relativement basse pour les SS et les CS d'une même cellule de Purkinje.

3. EXISTENCE DE CELLULES DE PURKINJE "SILENCIEUSES"

Les enregistrements juxta-cellulaires *in vivo* ont permis de révéler l'existence de cellules de Purkinje ayant de longues périodes d'inactivation de la décharge SS (de 1 min à plus de 20 min ; figure 32A). Ces cellules ont pu être observées par l'enregistrement de leur activité CS. Nous avons également pu constater l'existence de cellules n'ayant aucune activité CS en plus de cette absence de SS. Ces neurones ont pu être identifiés comme étant des cellules de Purkinje par l'induction d'une activité SS temporaire lors de stimulations lumineuses des ChR2 (figure 32B). Ces observations restent cependant à considérer dans le cadre de l'anesthésie à l'uréthane qui influence potentiellement ce type d'activité.

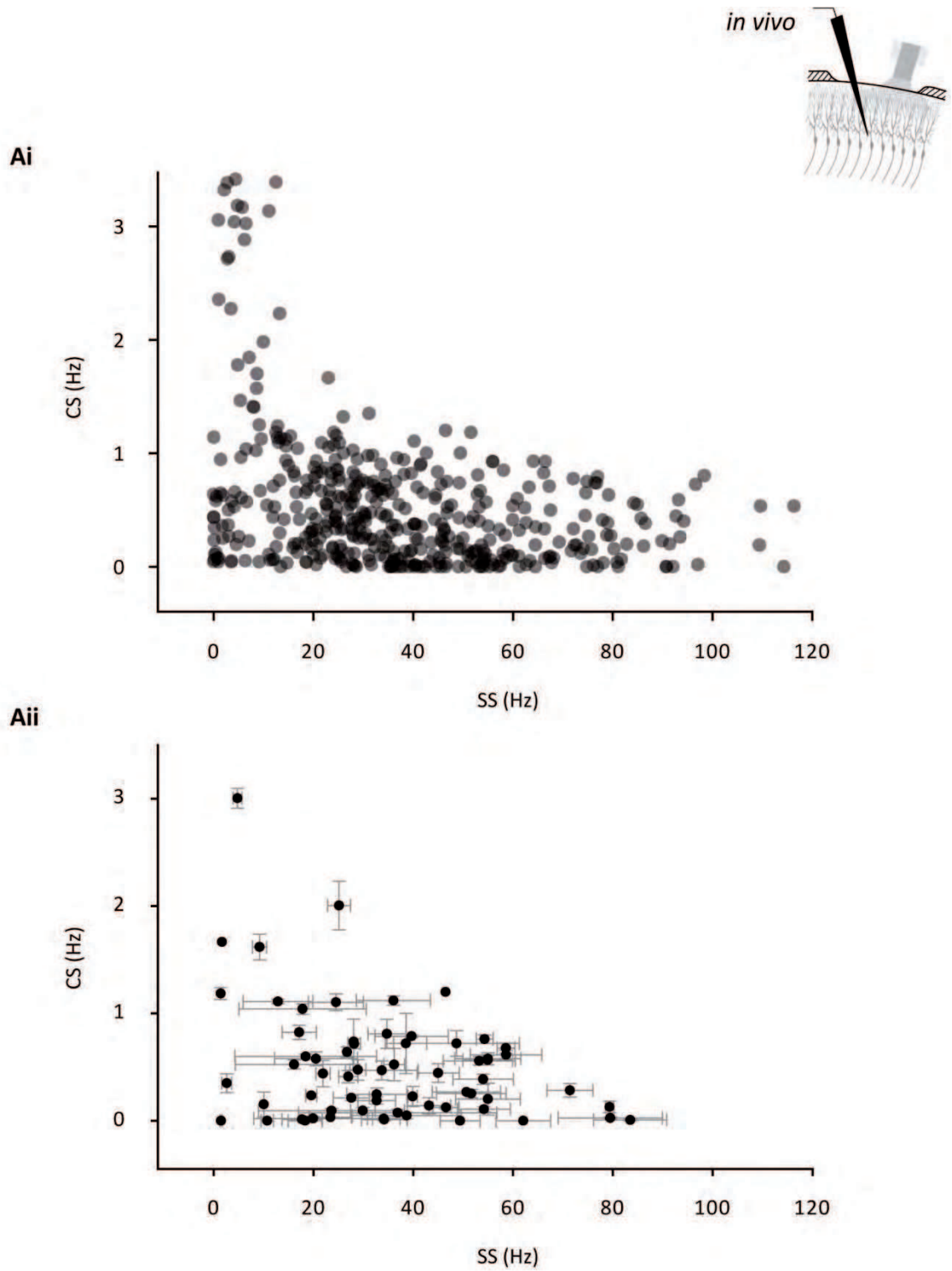


Figure 31 : Relation d'activité entre les SS et les CS. **Ai** : Fréquence des CS exprimée en fonction de la fréquence des SS pour des enregistrements sans stimulation. Chaque point représente une moyenne de l'activité SS et CS calculée sur des périodes allant de 1 à 5 min. Plusieurs points peuvent appartenir à la même cellule. **Aii** : Regroupement de tous les points du graphique 'Ai' appartenant à un même neurone (tracés gris = SEM).

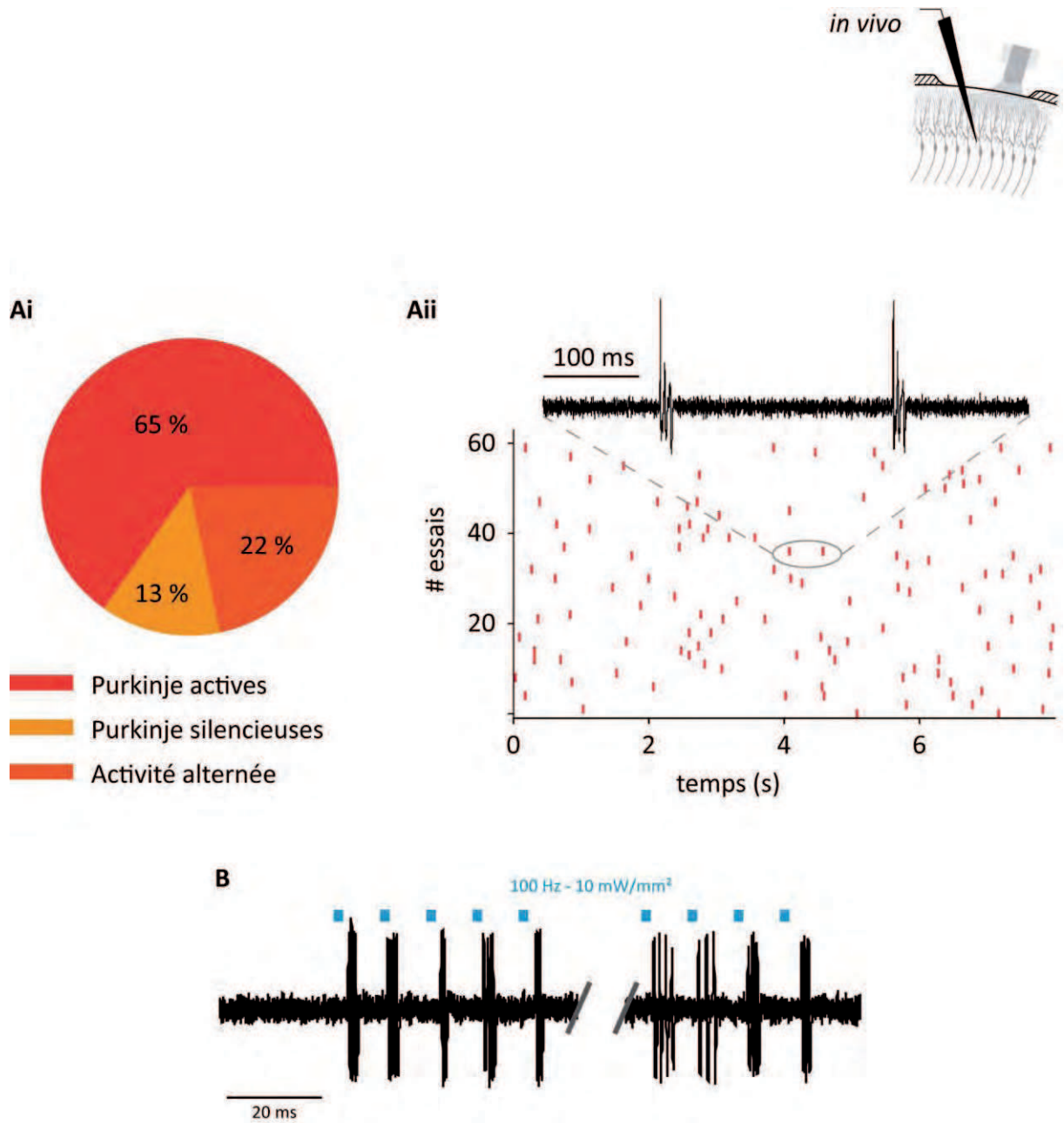


Figure 32 : Existence de cellules de Purkinje silencieuses. **Ai** : Distribution de l'activité SS chez des souris anesthésiées à l'uréthane. **Aii** : Représentation de 8 min d'enregistrement durant lesquelles seule une activité CS a pu être enregistrée. **B** : Les cellules silencieuses sont activables par la stimulation de la Chr2. Exemple de 20 stimulations (symbolisées par les barres bleues) de 2 ms à une fréquence de 100 Hz. Superposition de 6 traces.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

La création des lignées exprimant la ChR2(H134R) dans les cellules de Purkinje avait pour but initial le développement d'un outil permettant le contrôle de l'unique voie de sortie du cortex cérébelleux. Le premier objectif déclaré de ma thèse a donc été le développement des outils d'optogénétiques dans le but de répondre à deux questions :

- Comment les neurones des noyaux cérébelleux intègrent-ils l'information provenant des cellules de Purkinje d'un module cortical défini ?
- Comment la perturbation locale et temporelle de l'activité de décharge des cellules de Purkinje effectuée pendant un test comportemental peut-elle porter atteinte aux apprentissages moteurs relatifs à cette tâche ?

Les résultats initiaux ont généré une question supplémentaire sur la fonctionnalité des collatérales des cellules de Purkinje ainsi que la nécessité de faire l'étude des noyaux cérébelleux *in vivo* et non *in vitro*. La première partie de ma thèse est ainsi consacrée à la caractérisation des souris transgéniques ainsi qu'au développement des enregistrements *in vivo*. La question de la modulation des noyaux cérébelleux a ensuite été traitée dans le cadre de la boucle olivo-cortico-nucléaire. La discussion qui va suivre s'intéresse donc majoritairement au contrôle de l'olive inférieure par le cortex du cervelet ainsi qu'à ses fonctions potentielles dans les processus cérébelleux. Une interprétation des résultats préliminaires sera également proposée à la fin de cette partie.

CONTROLE DE L'ACTIVITE OLIVAIRE PAR LES CELLULES DE PURKINJE

Notre étude de l'organisation modulaire des circuits cérébello-olivaires est basée sur l'utilisation d'une lignée de souris exprimant la protéine de fusion ChR2(H134R)-YFP spécifiquement dans les cellules de Purkinje. La caractérisation électrophysiologique de cette lignée montre que les effets induits par l'activation des ChR2 lors de stimulations lumineuses sont reproductibles (Berndt et al., 2011; Zhao et al., 2011). L'intensité des courants entrants - observée en *voltage clamp* - et la fréquence de décharge des SS - observée en *current clamp* sur tranche et en *juxta-cellulaire in vivo* - sont dépendantes de l'accroissement de puissance de la stimulation lumineuse. L'expression des ChR2(H134R) à la membrane plasmique des cellules de Purkinje - 150 à 300 canaux par μm^2 (voir partie *results* de l'article) - est étonnamment forte pour une souris transgénique. Bien que cette expression soit intéressante pour la finesse et la sensibilité des réponses aux stimulations lumineuses, il a été montré qu'une trop forte densité de la ChR2(H134R) peut perturber le développement et la morphologie de l'axone d'un neurone (Miyashita et al., 2013). Une telle perturbation poserait de réels problèmes pour l'étude de la boucle olivo-cortico-nucléaire. Cependant, une atteinte fonctionnelle des cellules de Purkinje aurait probablement des répercussions au niveau phénotypique avec la possible induction d'une ataxie ou d'un autre symptôme cérébelleux. Or, l'expression de la ChR2(H134R) dans les cellules de Purkinje ne semble pas influencer les comportements et apprentissages moteurs de ces animaux lors de différents tests comportementaux effectués sur un Rotarod.

1. ORGANISATION FONCTIONNELLE DES EFFERENCES CEREBELLEUSES

L'inhibition des noyaux cérébelleux interposés induite par la stimulation des cellules de Purkinje situées dans Crus 1 correspond à l'organisation topographique connue de ces connexions (Herrero et al., 2006). Les axones des cellules de Purkinje qui convergent vers les noyaux cérébelleux vont contacter les corps cellulaires des neurones glutamatergiques et GABAergiques (Uusisaari and Knöpfel, 2011). Selon nos conditions expérimentales, un délai d'environ 20 ms est nécessaire pour supprimer l'activité des neurones de ces noyaux. Ce résultat reflète probablement qu'une sommation temporelle des entrées en plus de la forte convergence des axones de cellules de Purkinje sur ces neurones est nécessaire à l'induction d'une telle inhibition.

Nos paramètres expérimentaux ne permettent pas l'identification des neurones enregistrés dans les noyaux cérébelleux. La variation des résultats peut donc potentiellement provenir de différences dans les populations de neurones enregistrés. L'existence d'un rebond d'excitation observé après une pause de la décharge des noyaux cérébelleux (Aizenman and Linden, 1999; Tadayonnejad et al., 2010) ne représente que 10 % des neurones enregistrés dans notre étude. Bien que nos résultats soient en accord avec certains travaux récents faits *in vivo* (Alviña et al., 2008; Bengtsson et al., 2011), il est possible que cette faible proportion de rebonds excitateurs dépende de l'utilisation d'une anesthésie à l'uréthane. Des expériences supplémentaires permettant l'identification des neurones des noyaux cérébelleux et idéalement des enregistrements chez l'animal éveillé seraient nécessaires pour statuer sur la présence et la localisation d'un tel phénomène à la suite d'une stimulation lumineuse des cellules de Purkinje.

Il existe deux voies de projections majeures des noyaux cérébelleux vers l'olive inférieure. La voie directe est constituée des axones des neurones GABAergiques qui contactent les dendrites des cellules olivaires. C'est l'inhibition de cette voie qui est impliquée dans la régulation des rebonds CS. La seconde voie, indirecte, effectue un relais excitateur dans les noyaux de la jonction méso-dencéphalique avant de projeter sur l'olive inférieure (Ruigrok and Voogd, 1995; Teune et al., 2000). Lors d'une stimulation des cellules de Purkinje, le rebond d'activité CS se fait alors que les neurones de projections glutamatergiques constituant la voie indirecte sont toujours inhibés. La production d'un rebond CS est donc contrôlée par une levée d'inhibition sur l'olive inférieure et non par une entrée excitatrice. Les neurones de projections Glycinergiques (Chen and Hillman, 1993; Bagnall et al., 2009) pourraient être impliqués dans ce rebond CS, mais le manque d'information concernant leur zone de projection à partir des noyaux interposés rend toute interprétation complexe. Il semble cependant que les efferences de ces neurones soient dirigées ipsilatéralement, rendant peu probable leur intervention dans la modulation de l'olive controlatérale.

L'implication de la boucle olivo-cortico-nucléaire dans le contrôle de l'activité CS a été suggérée par Miall et collègues sur la base d'études effectuées chez le primate (Miall et al., 1998). Ils estiment ainsi qu'une augmentation de l'activité SS doit pouvoir induire un CS selon un délai d'environ 150 ms. Cependant, ils ne font pas l'hypothèse que ce contrôle s'effectue au sein d'une boucle topographiquement organisée.

2. ORGANISATION TEMPORELLE DU REBOND CS

La latence du rebond CS d'environ 100 ms peut paraître longue pour un circuit myélinisé n'impliquant que 3 synapses. Nous avons déjà décrit que l'inhibition des noyaux cérébelleux par la stimulation des cellules de Purkinje nécessite approximativement 20 ms. Cette latence n'étant pas suffisante pour expliquer le délai total, nous proposons que ce dernier soit majoritairement dépendant des propriétés d'intégration et de transmission de l'information au niveau des neurones de l'olive inférieure.

La libération GABAergique asynchrone de la voie nucléo-olivaire semble ralentir la transmission du signal provenant des noyaux cérébelleux et ainsi participer au maintien d'une inhibition soutenue par ces derniers sur l'olive inférieure (Best and Regehr, 2009; Bazzigaluppi et al., 2012). Dans ce contexte, les suppressions d'activités courtes des noyaux cérébelleux pourraient être filtrées au niveau de la synapse nucléo-olivaire, ce qui expliquerait que les stimulations inférieures à 35 ms ne parviennent pas à induire un rebond d'activité des CS.

La voie nucléo-olivaire, via son action de découplage des *gap junctions* (De Zeeuw et al., 1998; Yarom and Cohen, 2002), joue également un rôle majeur dans la régulation des phénomènes oscillatoires de l'olive inférieure et dans la synchronisation de la décharge des neurones olivaires (voir figures 19 de l'introduction) (Lang et al., 1996). Ainsi, l'inhibition de cette voie favorise l'émission et la synchronisation des CS (Welsh and Llinás, 1997; Marshall and Lang, 2009). De plus, le déclenchement des potentiels d'actions olivaires est dépendant de la phase de l'oscillation membranaire, induisant ainsi une fluctuation des réponses pour une même stimulation (voir figures 20 de l'introduction). Ces phénomènes d'oscillations participent donc à la variabilité temporelle du déclenchement des rebonds CS. Les oscillations olivaires n'ont, à ma connaissance, pas fait l'objet d'étude chez la souris anesthésiée à l'uréthane. Nos résultats suggèrent une oscillation membranaire des cellules olivaires à 4 Hz qui est cohérente avec les gammes de fréquences observées pour d'autres anesthésiques (Bazzigaluppi et al., 2012). Cependant, ces estimations nécessitent d'enregistrer un très grand nombre de CS ce qui, au vu de leur faible décharge spontanée, est expérimentalement très contraignant. Une perspective d'étude permettant d'affiner ces résultats serait d'enregistrer l'activité oscillatoire olivaire en parallèle du rebond de CS. Les difficultés techniques de cette étude résideraient au niveau de la précision stéréotaxique nécessaire à l'enregistrement simultané des neurones olivaires et des cellules de Purkinje topographiquement contactées par ces derniers.

3. ORGANISATION TOPOGRAPHIQUE DE LA BOUCLE

Nos résultats montrent que l'inhibition des noyaux cérébelleux est perdue lors du déplacement de la stimulation des cellules de Purkinje - via une fibre optique - vers un autre lobule. De plus, le même type de protocole appliqué aux expériences sur les rebonds CS aboutit à la perte de ce phénomène conjointement avec la disparition de la réponse SS de la cellule enregistrée (voir figure 4E de l'article). Ces résultats suggèrent donc que la boucle fermée cortico-nucléo-olivaire suit une organisation topographique et fonctionnelle.

Cependant, les stimulations effectuées par l'utilisation de fibres optiques n'ont pas une bonne résolution spatiale et présentent des limites techniques relatives au contrôle de la diffusion de la lumière. De plus, la pénétration de la lumière bleue - 460 nm - dans le tissu s'atténue rapidement, ne permettant pas une diffusion en profondeur. Nous avons ainsi pu évaluer que les cellules de Purkinje sont stimulées sur un volume d'environ 300 μm de diamètre. Cette résolution est proche de la taille des zones parasagittales décrites dans la voie olivo-cortico-nucléaire (Voogd, 1964; Sugihara and Shinoda, 2004; Schonewille et al., 2006). Cependant, une organisation plus fine des afférences grimpantes existe sous la forme de microzones (voir "Partie III 2.2" de l'introduction). L'étude de ces dernières montre que les CS qui y sont enregistrés répondent aux mêmes stimulations périphériques (Schonewille et al., 2006) et présentent une activité spontanée fortement synchronisée (Ozden et al., 2009; Ghosh et al., 2011). Ces expériences suggèrent l'existence d'une organisation anatomique et fonctionnelle de l'olive correspondant aux microzones (Sugihara et al., 2007). Nous faisons donc l'hypothèse que les rebonds CS, s'ils existent chez l'animal vigile, sont probablement gérés au sein des microzones. Nos conditions expérimentales n'étant pas assez précises pour tester cette hypothèse, il faudrait développer d'autres approches permettant la stimulation spécifique d'une ou de plusieurs microzones. Une première possibilité serait d'utiliser des stratégies d'expression de la ChR2 restreintes aux cellules de Purkinje d'une seule microzone. Cette opération pourrait être réalisée par l'injection d'un virus transfectant la ChR2 au niveau des axones de cellules de Purkinje situées dans les noyaux cérébelleux (Tsubota et al., 2013). Une seconde stratégie consisterait à localiser les microzones qui répondent à une même entrée périphérique et d'y appliquer une stimulation lumineuse précise sous forme de "masque" (voir Fig. S2. et *SI Methods* de l'article).

Selon Miall et collègues, l'activité spontanée des CS aurait pour rôle de contrebalancer une activité SS trop élevée afin de maintenir les cellules de Purkinje dans une "gamme opérationnelle" d'excitabilité (Miall et al., 1998). Une perspective d'étude serait de voir si la stimulation d'une unique cellule de Purkinje - par l'injection de courants juxta-cellulaires - permet de modifier l'activité de décharge de ces CS (Houweling et al., 2010). Même si un rebond ou une augmentation de l'activité CS est peu probable, cette étude permettrait de montrer que le contrôle de la boucle fermée cortico-nucléo-olivaire passe nécessairement par l'activité conjointe de plusieurs cellules de Purkinje.

S'il est évident que le cortex cérébelleux est impliqué dans le traitement de l'information entrant via les fibres grimpantes, le rôle et l'organisation des collatérales adressées aux noyaux cérébelleux par ces entrées restent à élucider. Même si nos paradigmes expérimentaux ne permettent pas de traiter cette question, nous pouvons tout de même faire l'hypothèse que le rebond de CS observé dans la cellule de Purkinje arrive également, via les collatérales des fibres grimpantes, aux noyaux cérébelleux (Blenkinsop and Lang, 2011).

FONCTIONS POTENTIELLES DE LA BOUCLE OLIVO-CORTICO-NUCLEO-OLIVAIRE

1. PLASTICITE SYNAPTIQUE

L'activation de la boucle fermée cortico-nucléo-olivaire par la stimulation des cellules de Purkinje pourrait jouer un rôle dans l'établissement de plasticités synaptiques au niveau du cortex. En effet, le délai de 100 ms nécessaire au déclenchement d'un rebond CS semble parfaitement correspondre avec les expériences de LTD menées à la synapse entre les cellules en grain et les cellules de Purkinje (Wang et al., 2000; Safo and Regehr, 2008). Dans le cas de nos expériences, la dépolarisation des cellules de Purkinje est artificiellement induite par l'activation des ChR2. Cependant, chez l'animal vigile, l'unique entrée excitatrice permettant une augmentation de l'activité SS provient des fibres parallèles. Ainsi, l'induction, par ces dernières, d'une dépolarisation de cellules de Purkinje pourrait mener au déclenchement d'un CS, environ 100 ms après cette entrée excitatrice. Cet enchaînement aurait pour conséquence la mise en place d'une LTD au niveau des synapses grain-Purkinje à l'origine de ce processus. L'induction d'une telle LTD aboutirait à la diminution du poids de ces entrées réduisant ainsi la probabilité de déclencher un nouveau CS.

Cette hypothèse peut être testée par l'utilisation de stimulations des fibres parallèles couplée à l'enregistrement d'une cellule de Purkinje *in vivo*. De telles stimulations doivent induire une augmentation de l'activité SS de la cellule enregistrée. Le déclenchement d'un CS par cette décharge SS pourrait ainsi induire un processus de LTD aux synapses recrutées. La répétition de ce protocole devrait mener à une diminution, voire une disparition, de l'effet de la stimulation sur l'activité SS de la cellule enregistrée.

Suivant le même principe, l'induction d'un CS par une forte entrée provenant des cellules granulaires pourrait, via la diffusion du glutamate (Szapiro and Barbour, 2007), induire une plasticité au niveau des interneurons contactés par ces mêmes fibres parallèles (Rancillac and Crépel, 2004). La LTP ainsi induite aurait pour conséquence une augmentation de l'inhibition des cellules de Purkinje diminuant ainsi la probabilité d'occurrence d'un rebond CS. L'étude de cette synapse *in vivo* est probablement plus complexe, car elle nécessiterait l'enregistrement de l'activité CS des cellules de Purkinje voisines de l'interneurone étudié.

2. APPRENTISSAGES ET MODELES INTERNES

Lors d'un conditionnement Pavlovien de fermeture de la paupière, le SI promeut l'acquisition de la réponse conditionnée par l'activation des fibres grimpantes (Sears and Steinmetz, 1991; Mauk et al., 1998). Une fois l'apprentissage effectué, ces dernières ne sont plus recrutées (Hesslow and Ivarsson, 1996; Kim et al., 1998) suggérant la mise en place d'une plasticité. Medina et collaborateurs ont montré que l'acquisition et le maintien de l'apprentissage nécessitent un état élevé d'excitabilité de l'olive inférieure. A l'inverse, l'inhibition de cette structure empêche les apprentissages et accélère l'extinction (Medina et al., 2002). Le processus de LTD que nous venons de discuter permettrait d'expliquer la disparition du signal "d'instruction" des fibres grimpantes. En effet, l'affaiblissement des synapses grain - Purkinje n'induirait plus la décharge des SS à des hautes fréquences, réduisant ainsi la probabilité d'occurrence d'un CS via la désinhibition de la voie nucléo-olivaire (voir figure 21C

de l'introduction). Ainsi, la connexion GABAergique des noyaux cérébelleux vers l'olive inférieure jouerait le rôle de bloqueur du signal d'instruction une fois l'apprentissage moteur optimisé ou encore lors de l'extinction d'une tâche motrice devenue non pertinente (Andersson et al., 1988; Kim et al., 1988; Rasmussen et al., 2008). De plus, l'apprentissage de fermeture de la paupière est impossible si la latence entre le SC et le SI est inférieure à 100 ms (Mauk and Donegan, 1997). Cet ordre de grandeur correspond aux délais mesurés dans nos protocoles d'induction d'un CS au sein de la boucle cortico-nucléo-olivaire. Ce rôle des fibres grimpances est également soutenu par des données issues d'autres formes d'apprentissages moteurs (Thach et al., 1992; Raymond et al., 1996; De Zeeuw et al., 1998; Kim et al., 1998).

Ces mécanismes d'apprentissages sont à la base de la formation des modèles internes cérébelleux ayant pour fonction de reproduire les propriétés dynamiques, sensorielles et motrices des différentes parties du corps (Ito, 2008). Ces modèles permettent de transformer un mouvement programmé en commande motrice afin d'affiner son contrôle sans nécessiter la perception d'un retour sensoriel. L'ajustement de ces modèles internes serait supervisé par les fibres grimpances (Kawato, 1999). La boucle fermée cortico-nucléo-olivaire représente une voie de propagation possible des prédictions encodées par ces modèles internes dans le cortex cérébelleux. L'olive inférieure serait alors le lieu d'intégration conjoint de cette information corticale et des informations périphériques relatives à la tâche en cours. L'activité SS représenterait ainsi le signal prédictif du retour sensoriel (Miall et al., 1993) et de la commande motrice (Keating and Thach, 1995). L'hypothèse faite par Miall et collègues suggère que la prédiction provenant du cortex cérébelleux est retardée afin d'être synchronisée avec le retour arrivant dans l'olive inférieure. Ils estiment ainsi que, dans l'exécution des mouvements oculaires chez le primate, l'augmentation de SS - symbolisant l'intervalle de prédilection - devrait être de 150 ms (Keele and Posner, 1968; Miall et al., 1998). Cette prévision est comparable aux délais que nous avons décrits pour la transmission de l'information corticale vers l'olive inférieure dans l'étude des rebonds d'activité CS.

3. PROPOSITION D'UN MODELE

3.1. Divergence et convergence de l'information cérébelleuse

L'axone d'un neurone olivaire se projette sous forme de fibres grimpances réparties dans plusieurs lobules cérébelleux d'une même zone longitudinale. Cette division morphologique crée une divergence de l'information olivaire au niveau cortical (figure 37Ai). Les cellules de Purkinje ciblées par ce neurone olivaire projettent vers les mêmes neurones des noyaux cérébelleux, créant ainsi une convergence de l'information. La structuration en zones, microzones et boucle fermée olivo-cortico-nucléaire implique que ce phénomène de divergence/convergence se fait de manière organisée au sein des différentes subdivisions anatomiques de ces trois structures (figure 37Aii).

Suivant le même principe, l'information provenant des fibres moussues est également divergente au niveau du cortex cérébelleux. Cependant, l'organisation de ces dernières se fait aussi bien dans le sens parasagittal que médio-latéral (figure 38A). De plus, les informations moussues sont relayées par les fibres parallèles et les interneurons du cortex cérébelleux qui modulent à leur

tour l'activité des cellules de Purkinje. La convergence des informations moussues vers les noyaux cérébelleux semble donc moins évidente que pour les fibres grimpantes.

3.2. Modulation de l'activité des cellules de Purkinje par les entrées moussues

L'entrée de plusieurs fibres moussues va, par la stimulation des réseaux de neurones corticaux, moduler la fréquence des décharges SS des cellules de Purkinje. L'activation des cellules de Purkinje va ainsi majoritairement dépendre de la transmission des informations moussues par les cellules en grain :

- Selon un premier point de vue, les fibres parallèles des cellules en grain activent les cellules de Purkinje qu'elles traversent dans le sens médio-latéral (Braitenberg and Atwood, 1958; Eccles et al., 1967). L'activation de ces faisceaux de fibres parallèles par des entrées moussues différentes pourrait ainsi aboutir à l'augmentation SS de cellules de Purkinje situées vers les zones de convergence des informations ainsi relayées (figure 38Bi).
- Selon un second point de vue, les fibres moussues, arrivant dans le cortex cérébelleux sous forme de patches, activent principalement les cellules de Purkinje situées au dessus de ces zones de projections (Shambes et al., 1978b; Bower et al., 1981; Ekerot and Jörntell, 2001). Dans ce contexte, l'activation d'un même patch par plusieurs fibres moussues aboutirait à une augmentation locale de l'activité SS des cellules de Purkinje (figure 38Bii).

Nous proposons, quelle que soit l'hypothèse retenue, que des combinaisons d'entrées moussues aboutissent à l'augmentation de l'activité de décharge SS de cellules de Purkinje situées dans une même zone/microzone (entourée en vert dans les figures 38Bi et Bii). Ainsi, un ensemble de cellules de Purkinje pourrait être activé par la combinaison de différentes voies des fibres moussues. La variation de ces combinaisons permettrait le recrutement de différents groupements de cellules de Purkinje.

3.3. Modulation locale des plasticités corticales

Les cellules de Purkinje ainsi recrutées pourraient, par l'inhibition de la voie nucléo-olivaire, augmenter le niveau d'excitation de l'olive inférieure facilitant de la sorte l'émission d'un rebond CS dans la zone/microzone correspondante (figure 38C). Le délai de 100 ms entre l'augmentation de l'activité SS et le déclenchement du CS indique que la répétition de cette opération devrait induire une LTD au niveau de ces synapses grain-Purkinje (entourées en vert clair figure 38D). La précision de ce processus hypothétique est intéressante car, seules les synapses ayant été impliquées dans l'activation de la voie cortico-nucléo-olivaire seront déprimées. Ce modèle permettrait donc d'expliquer comment des informations divergentes peuvent être impliquées dans la mise en place de plasticités locales.

En plus des connexions GABAergiques nucléaires, l'activité de l'olive inférieure est dépendante des afférences extra-cérébelleuses. Ce sont la sommation et la synchronisation de ces 2 types d'informations au niveau de l'olive inférieure qui facilitent ou non l'émission d'un potentiel

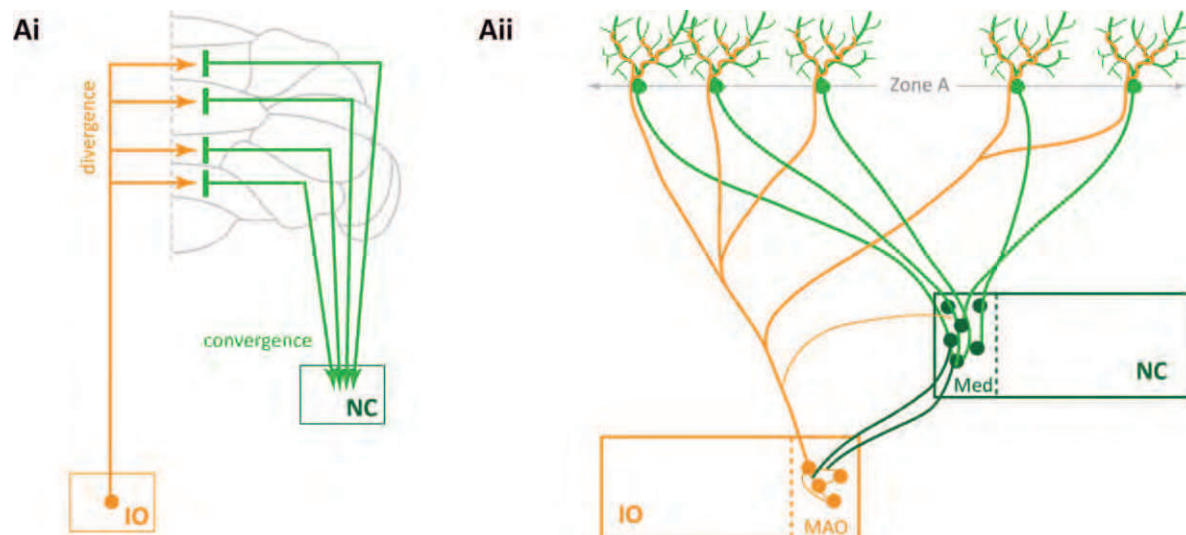


Figure 37 : Divergence et convergence des informations grimpantes. **Ai** : Représentation de la divergence d'une fibre grimpante au niveau du cortex cérébelleux et de la convergence des axones de cellules de Purkinje vers les noyaux cérébelleux. **Aii** : Exemple d'organisation topographique du même phénomène dans la boucle olivo-cortico-nucléaire.

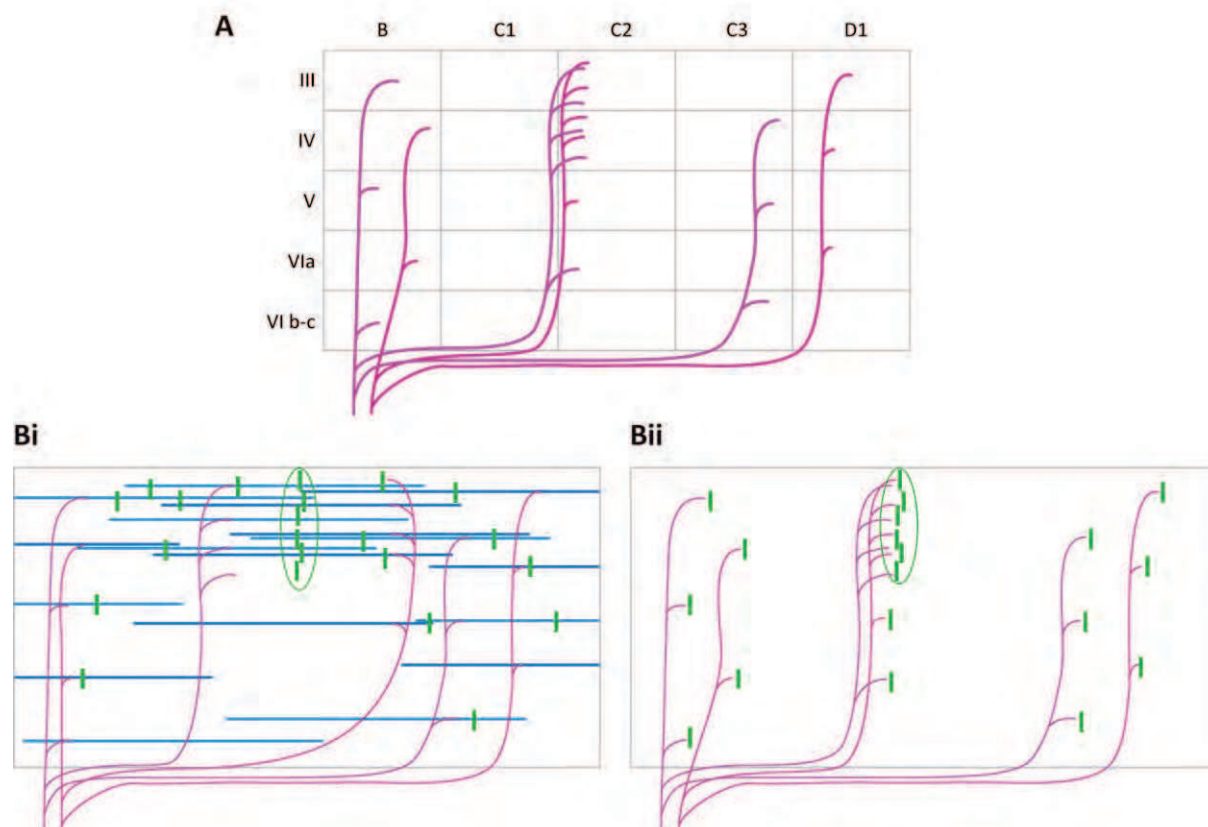


Figure 38 : Modèle. **A** : Exemple de deux fibres mossues projetant dans le cortex cérébelleux selon l'axe antéro-postérieur et l'axe médio-latéral. **B** : Activation des cellules de Purkinje faisant suite à deux entrées excitatrices de fibres mossues différentes. **Bi** : Exemple de transmission médio-latérale de l'information mossue par les fibres parallèles. **Bii** : Exemple de transmission locale de l'information par les patches formés par les fibres mossues.

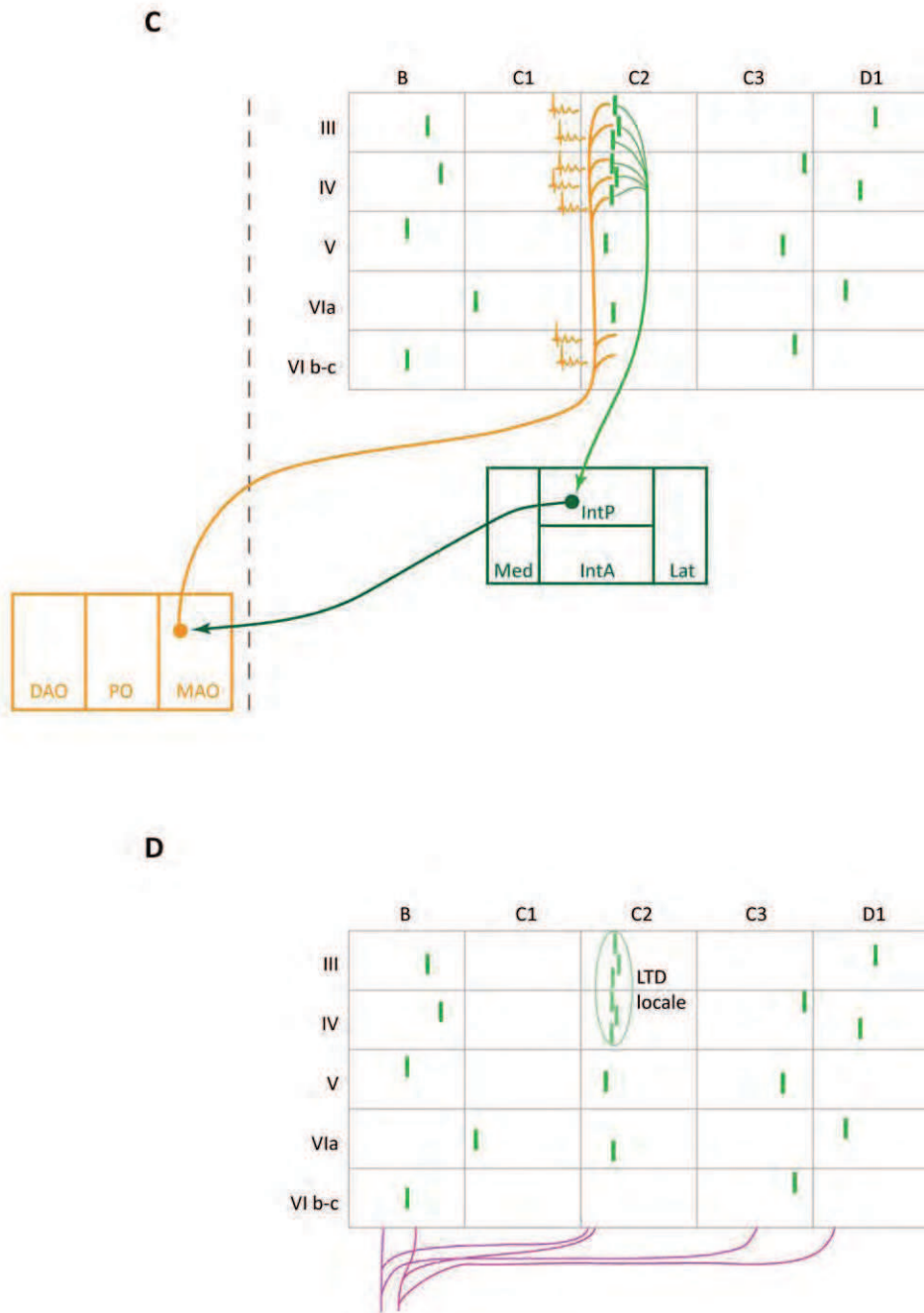


Figure 38 (suite) : Modèle. C : L'activation d'un groupe de cellules de Purkinje situé au sein d'une même zone/microzone entraîne l'induction d'un rebond CS via leurs afférences grimpantes. **D :** Cette émission d'un CS entraîne une LTD à la synapse grain-Purkinje qui aura pour conséquence une diminution du poids synaptique des entrées granulaires activée par les fibres moussues spécifiquement dans la zone/microzone à l'origine du rebond CS.

d'action (*in fine* un CS). L'activation synchrone de ces deux entrées olivaires pourrait se faire sous contrôle des modèles internes cérébelleux. Ainsi, la diminution d'activité des afférences excitatrices olivaires chez l'animal anesthésié pourrait expliquer que l'émission d'un rebond CS ait nécessité des stimulations massives de cellules de Purkinje dans nos conditions expérimentales. Cependant, chez l'animal éveillé, la sommation des activités du cortex cérébelleux sous contrôle des modèles internes (levée de l'inhibition olivaire) et des retours sensoriels (excitation olivaire) va faciliter l'émission d'un potentiel d'action olivaire dans des gammes d'activités beaucoup plus physiologiques. Cet argument, même s'il reste à être démontré, va dans le sens de l'existence fonctionnelle de la boucle fermée olivo-cortico-nucléaire.

Un tel processus pourrait alors expliquer l'apparition et la diminution de l'activité CS lors d'un apprentissage moteur. En effet, l'inhibition pharmacologique de la voie nucléo-olivaire va faciliter l'acquisition et le maintien du conditionnement de fermeture de la paupière (Medina et al., 2002). Avec la répétition du protocole d'apprentissage, l'activité CS va induire une LTD aux synapses grain-Purkinje. L'installation de cette dépression ne permettra plus l'augmentation SS impliquées dans l'inhibition de la voie nucléo-olivaire, réduisant ainsi la probabilité d'émission d'un CS.

La modulation rapide des CS par l'activité corticale générée par les fibres moussues n'a fait l'objet, à ma connaissance, que d'une seule publication (Miall et al., 1998). La fonctionnalité de la boucle fermée olivo-cortico-nucléaire amène donc une vision nouvelle sur le rôle du signal provenant des fibres moussues. Il est important de souligner que le modèle proposé ici est très proche des théories de Marr et Albus (Marr, 1969; Albus, 1971), à ceci près que le signal d'instruction provenant des fibres grimpantes et permettant la mise en place de plasticités est également sous contrôle des activités corticales cérébelleuses.

RESULTATS PRELIMINAIRES

1. CELLULES DE PURKINJE SILENCIEUSES

Les éléments expérimentaux relatifs à un état potentiellement silencieux des cellules de Purkinje ne sont ni assez précis ni assez bien qualifiés à l'heure actuelle pour me permettre d'intégrer ces résultats dans le cadre d'une discussion développée. Cependant, si un état de "silence" total - aucun CS et aucun SS - existe réellement, il est probable que les recherches antérieures n'aient pas pu le remarquer sans utiliser l'optogénétique. Une approche utilisant des multi-enregistrements permettrait de voir si la stimulation des ChR2 peut activer des cellules qui, jusque là, étaient silencieuses. Enfin, si les résultats sont positifs, il faudrait également essayer de les retrouver avec d'autres anesthésies et, idéalement, chez l'animal vigile.

2. EFFET DE LA STIMULATION DES PURKINJE SUR LES AUTRES NEURONES CORTICAUX

2.1. Collatérales des cellules de Purkinje

Nos résultats suggèrent l'existence fonctionnelle de collatérales des cellules de Purkinje dirigées vers les interneurons inhibiteurs du cortex cérébelleux. Les connexions fonctionnelles entre les cellules de Purkinje sont démontrées aussi bien morphologiquement que physiologiquement et semblent présenter des caractéristiques facilitatrices pour des intervalles de stimulations inférieurs à 20 ms (Orduz and Llano, 2007). Les entrées ainsi produites lors de bouffées d'activité de la cellule de Purkinje afférente sont plus fidèles et plus importantes que celles produites par des événements individuels.

La rapidité dans l'arrêt de la décharge des interneurons enregistrés montre que l'inhibition provenant des collatérales est forte en plus d'être durable. Cette constatation signifie soit que la synapse Purkinje-interneurone est également facilitatrice, soit que les collatérales de plusieurs cellules de Purkinje contactent le même neurone. Cependant, même si nous ne pouvons pas trancher sur ce point, il semble qu'une décharge à haute fréquence (> 150Hz) des cellules de Purkinje soit nécessaire à l'inhibition des interneurons.

Nos résultats préliminaires montrent que les interneurons de la couche moléculaire sont des cibles réelles des collatérales de Purkinje, confirmant ainsi des observations antérieures (O'Donoghue et al., 1989). Les neurones non identifiés laissent également la possibilité que les cellules de Golgi ou les cellules de Lugaro soient contactées par les cellules de Purkinje. L'extension majoritairement parasagittale des collatérales des cellules de Purkinje indique que, lors d'une stimulation lumineuse, l'activité des interneurons situés dans la même zone/microzone est fortement réduite. Dans le cas des interneurons de la couche moléculaire, de telles connexions auraient pour conséquence une levée de l'inhibition sur les cellules de Purkinje avoisinantes, facilitant la décharge collective de ces dernières au sein d'une même zone/microzones. Nous pouvons spéculer que ce mécanisme qui facilite la synchronisation des cellules de Purkinje pourrait activer la boucle fermée cortico-nucléo-olivaire et permettre ainsi l'émission d'un rebond CS.

L'étude de la fonctionnalité des collatérales par des enregistrements juxta-cellulaires *in vivo* présente l'avantage de la préservation du circuit. Cependant, l'activité de décharge d'une cellule n'est probablement pas le meilleur critère pour définir les caractéristiques de ces connexions. De plus, l'identification des neurones ciblés par les collatérales est centrale dans le traitement de cette question. Les difficultés que nous avons rencontrées lors des remplissages cellulaires ou des révélations au cours de nos expériences nous invitent à envisager un changement de stratégie expérimentale. Il serait probablement plus intéressant de procéder à des enregistrements intracellulaires *in vivo* ou encore d'étudier les connexions sur les interneurons en configuration *patch clamp* sur des tranches aiguës de cervelet, plus simple techniquement, mais ne permettant pas facilement la préservation du circuit.

L'étude des collatérales entre les cellules de Purkinje par l'utilisation de l'optogénétique est complexe techniquement car l'effet de la stimulation des ChR2 rend la détection d'événements inhibiteurs difficile et l'examen des variations de l'activité SS impossible.

2.2. Activations lentes d'autres types neuronaux

La stimulation des cellules de Purkinje a également permis l'observation de phénomènes plus lents correspondant à des rebonds d'activités des neurones enregistrés. Ces neurones présentent une activité de décharge basale inférieure à 5 Hz (voir figure 36 des résultats) indiquant qu'ils sont probablement différents des cellules rapidement inhibées qui elles, déchargent spontanément à 30 - 40 Hz (voir figure 35 des résultats). Le délai temporel des réponses indique l'activation probable d'un circuit poly-synaptique passant possiblement par des structures extra-cérébelleuses, ce qui rend toute interprétation complexe.

Il est probable que l'étude de ce phénomène ne puisse se faire que dans le cadre d'expériences réalisées *in vivo*, rendant nécessaire le remplissage de ces neurones. Cependant, même si nous parvenons à identifier ces cellules, l'origine de l'excitation restera complexe à déterminer.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- A -

- Adrian ED (1943) Afferent areas in the cerebellum connected with limbs. *Brain* 66:289–315.
- Aizenman CD, Linden DJ (1999) Regulation of the rebound depolarization and spontaneous firing patterns of deep nuclear neurons in slices of rat cerebellum. *J Neurophysiol* 82:1697–1709.
- Akkal D, Dum RP, Strick PL (2007) Supplementary motor area and presupplementary motor area: targets of basal ganglia and cerebellar output. *J Neurosci* 27:10659–10673.
- Albus JS (1971) A theory of cerebellar function. *Math Biosci* 10:25–61.
- Alcami P, Marty A (2013) Estimating functional connectivity in an electrically coupled interneuron network. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:E4798–807.
- Altman J, Bayer SA (1977) Time of origin and distribution of a new cell type in the rat cerebellar cortex. *Exp brain Res* 29:265–274.
- Altman J, Bayer SA (1987) Development of the precerebellar nuclei in the rat: II. The intramural olivary migratory stream and the neurogenetic organization of the inferior olive. *J Comp Neurol* 257:490–512.
- Alviña K, Walter JT, Kohn A, Ellis-Davies G, Khodakhah K (2008) Questioning the role of rebound firing in the cerebellum. *Nat Neurosci* 11:1256–1258.
- Andersen BB, Korbo L, Pakkenberg B (1992) A quantitative study of the human cerebellum with unbiased stereological techniques. *J Comp Neurol* 326:549–560.
- Andersson G, Armstrong DM (1987) Complex spikes in Purkinje cells in the lateral vermis (b zone) of the cat cerebellum during locomotion. *J Physiol* 385:107–134.
- Andersson G, Garwicz M, Hesslow G (1988) Evidence for a GABA-mediated cerebellar inhibition of the inferior olive in the cat. *Exp Brain Res* 72:450–456.
- 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.
- Andreasen NC, Paradiso S, O’Leary DS (1998) “Cognitive dysmetria” as an integrative theory of schizophrenia: a dysfunction in cortical-subcortical-cerebellar circuitry? *Schizophr Bull* 24:203–218.
- Angaut P, Cicirata F (1982) Cerebello-olivary projections in the rat. An autoradiographic study. *Brain Behav Evol* 21:24–33.
- Angaut P, Sotelo C (1989) Synaptology of the cerebello-olivary pathway. Double labelling with anterograde axonal tracing and GABA immunocytochemistry in the rat. *Brain Res* 479:361–365.
- Apps R, Hawkes R (2009) Cerebellar cortical organization: a one-map hypothesis. *Nat Rev Neurosci* 10:670–681.
- Armstrong DM, Harvey RJ, Schild RF (1973) Branching of inferior olivary axons to terminate in different folia, lobules or lobes of the cerebellum. *Brain Res* 54:365–371.
- Armstrong DM, Harvey RJ, Schild RF (1974) Topographical localization in the olivo-cerebellar projection: an electrophysiological study in the cat. *J Comp Neurol* 154:287–302.
- Armstrong DM, Rawson JA (1979) Activity patterns of cerebellar cortical neurones and climbing fibre afferents in the awake cat. *J Physiol* 289:425–448.
- Azizi SA, Woodward DJ (1987) Inferior olivary nuclear complex of the rat: morphology and comments on the principles of organization within the olivocerebellar system. *J Comp Neurol* 263:467–484.

- B -

- Bagnall MW, Zingg B, Sakatos A, Moghadam SH, Zeilhofer HU, du Lac S (2009) Glycinergic projection neurons of the cerebellum. *J Neurosci* 29:10104–10110.
- Bal T, McCormick DA (1997) Synchronized oscillations in the inferior olive are controlled by the hyperpolarization-activated cation current I(h). *J Neurophysiol* 77:3145–3156.
- Barmack NH, Yakhnitsa V (2008) Functions of interneurons in mouse cerebellum. *J Neurosci* 28:1140–1152.

- Bastian AJ (2006) Learning to predict the future: the cerebellum adapts feedforward movement control. *Curr Opin Neurobiol* 16:645–649.
- Bazzigaluppi P, Ruigrok T, Saisan P, De Zeeuw CI, de Jeu M (2012) Properties of the nucleo-olivary pathway: an in vivo whole-cell patch clamp study. *PLoS One* 7:e46360.
- Beitz AJ (1976) The topographical organization of the olivo-dentate and dentato-olivary pathways in the cat. *Brain Res* 115:311–317.
- Bengtsson F, Ekerot C-F, Jörntell H (2011) In vivo analysis of inhibitory synaptic inputs and rebounds in deep cerebellar nuclear neurons. *PLoS One* 6:e18822.
- Bengtsson F, Jörntell H (2009) Climbing fiber coupling between adjacent purkinje cell dendrites in vivo. *Front Cell Neurosci* 3:7.
- Bengtsson F, Svensson P, Hesslow G (2004) Feedback control of Purkinje cell activity by the cerebello-olivary pathway. *Eur J Neurosci* 20:2999–3005.
- Berndt A, Schoenenberger P, Mattis J, Tye KM, Deisseroth K, Hegemann P, Oertner TG (2011) High-efficiency channelrhodopsins for fast neuronal stimulation at low light levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:7595–7600.
- Best AR, Regehr WG (2009) Inhibitory regulation of electrically coupled neurons in the inferior olive is mediated by asynchronous release of GABA. *Neuron* 62:555–565.
- Blenkinsop TA, Lang EJ (2011) Synaptic action of the olivocerebellar system on cerebellar nuclear spike activity. *J Neurosci* 31:14708–14720.
- 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.
- Bolk L (1906) *Das cerebellum der säugetiere: eine vergleichende anatomische untersuchung.*
- Bornschein G, Arendt O, Hallermann S, Brachtendorf S, Eilers J, Schmidt H (2013) Paired-pulse facilitation at recurrent Purkinje neuron synapses is independent of calbindin and parvalbumin during high-frequency activation. *J Physiol* 591:3355–3370.
- Bower JM (2011) Functional implications of tactile projection patterns to the lateral hemispheres of the cerebellum of the albino rat: the legacy of Wally Welker. *Ann N Y Acad Sci* 1225:130–141.
- Bower JM, Beermann DH, Gibson JM, Shambes GM, Welker W (1981) Principles of organization of a cerebro-cerebellar circuit. Micromapping the projections from cerebral (SI) to cerebellar (granule cell layer) tactile areas of rats. *Brain Behav Evol* 18:1–18.
- Bower JM, Kassel J (1990) Variability in tactile projection patterns to cerebellar folia crus IIA of the Norway rat. *J Comp Neurol* 302:768–778.
- Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K (2005) Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci* 8:1263–1268.
- Braak E, Braak H (1993) The new monodendritic neuronal type within the adult human cerebellar granule cell layer shows calretinin-immunoreactivity. *Neurosci Lett* 154:199–202.
- Braitenberg V, Atwood RP (1958) Morphological observations on the cerebellar cortex. *J Comp Neurol* 109:1–33.
- Brodal A (1940) Experimentelle untersuchungen tiber die olivo- cerebellare lokalisation. *Z Ges Neurol Psychiat* 169:1–153.
- Brown IE, Bower JM (2001) Congruence of mossy fiber and climbing fiber tactile projections in the lateral hemispheres of the rat cerebellum. *J Comp Neurol* 429:59–70.
- Bruckmoser P, Hepp-Reymond MC, Wiesendanger M (1970) Cortical influence on single neurons of the lateral reticular nucleus of the cat. *Exp Neurol* 26:239–252.
- Buisseret-Delmas C, Angaut P (1993) The cerebellar olivo-corticonuclear connections in the rat. *Prog Neurobiol* 40:63–87.

- C -

- Caddy KW, Biscoe TJ (1979) Structural and quantitative studies on the normal C3H and Lurcher mutant mouse. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 287:167–201.
- Chan-Palay V, Palay SL, Brown JT, Van Itallie C (1977) Sagittal organization of olivocerebellar and reticulocerebellar projections: autoradiographic studies with 35S-methionine. *Exp Brain Res* 30:561–576.

- Chan-Palay V, Palay SL, Wu JY (1979) Gamma-aminobutyric acid pathways in the cerebellum studied by retrograde and anterograde transport of glutamic acid decarboxylase antibody after in vivo injections. *Anat Embryol (Berl)* 157:1–14.
- Chen S, Hillman DE (1993) Colocalization of neurotransmitters in the deep cerebellar nuclei. *J Neurocytol* 22:81–91.
- Chung S-H, Marzban H, Watanabe M, Hawkes R (2009) Phospholipase Cbeta4 expression identifies a novel subset of unipolar brush cells in the adult mouse cerebellum. *Cerebellum* 8:267–276.
- Cicirata F, Pantò MR, Angaut P (1982) An autoradiographic study of the cerebellopontine projections in the rat. I. Projections from the medial cerebellar nucleus. *Brain Res* 253:303–308.
- Clower DM, West RA, Lynch JC, Strick PL (2001) The inferior parietal lobule is the target of output from the superior colliculus, hippocampus, and cerebellum. *J Neurosci* 21:6283–6291.
- Coemans M, Weber JT, De Zeeuw CI, Hansel C (2004) Bidirectional parallel fiber plasticity in the cerebellum under climbing fiber control. *Neuron* 44:691–700.
- Cohen D, Yarom Y (2000) Cerebellar on-beam and lateral inhibition: two functionally distinct circuits. *J Neurophysiol* 83:1932–1940.
- Colin F, Manil J, Desclin JC (1980) The olivocerebellar system. I. Delayed and slow inhibitory effects: an overlooked salient feature of cerebellar climbing fibers. *Brain Res* 187:3–27.
- Comolli A (1910) Per una nuova divisione del cervelletto dei mammiferi. *Arch It Anat* 9:247–273.
- Courville J, Faraco-Cantin F, Diakiw N (1974) A functionally important feature of the distribution of the olivo-cerebellar climbing fibers. *Can J Physiol Pharmacol* 52:1212–1217.
- Crepel F, Delhaye-Bouchaud N, Dupont JL (1981) Fate of the multiple innervation of cerebellar Purkinje cells by climbing fibers in immature control, x-irradiated and hypothyroid rats. *Brain Res* 227:59–71.
- Crepel F, Mariani J (1976) Multiple innervation of Purkinje cells by climbing fibers in the cerebellum of the Weaver Mutant Mouse. *J Neurobiol* 7:579–582.

- D -

- D'Angelo E, Casali S (2012) Seeking a unified framework for cerebellar function and dysfunction: from circuit operations to cognition. *Front Neural Circuits* 6:116.
- Dahhaoui M, Stelz T, Caston J (1992) Effects of lesion of the inferior olivary complex by 3-acetylpyridine on learning and memory in the rat. *J Comp Physiol A* 171:657–664.
- Daniel H, Billard JM, Angaut P, Batini C (1987) The interposito-rubrospinal system. Anatomical tracing of a motor control pathway in the rat. *Neurosci Res* 5:87–112.
- De Zeeuw CI, Chorev E, Devor A, Manor Y, Van Der Giessen RS, De Jeu MT, Hoogenraad CC, Bijman J, Ruigrok TJH, French P, Jaarsma D, Kistler WM, Meier C, Petrasch-Parwez E, Dermietzel R, Sohl G, Gueldenagel M, Willecke K, Yarom Y (2003) Deformation of network connectivity in the inferior olive of connexin 36-deficient mice is compensated by morphological and electrophysiological changes at the single neuron level. *J Neurosci* 23:4700–4711.
- De Zeeuw CI, Hoebeek FE, Bosman LWJ, Schonewille M, Witter L, Koekkoek SK (2011) Spatiotemporal firing patterns in the cerebellum. *Nat Rev Neurosci* 12:327–344.
- De Zeeuw CI, Holstege JC, Ruigrok TJ, Voogd J (1989) Ultrastructural study of the GABAergic, cerebellar, and mesodiencephalic innervation of the cat medial accessory olive: anterograde tracing combined with immunocytochemistry. *J Comp Neurol* 284:12–35.
- De Zeeuw CI, Holstege JC, Ruigrok TJ, Voogd J (1990a) Mesodiencephalic and cerebellar terminals terminate upon the same dendritic spines in the glomeruli of the cat and rat inferior olive: an ultrastructural study using a combination of [3H]leucine and wheat germ agglutinin coupled horseradish peroxidase ant. *Neuroscience* 34:645–655.
- De Zeeuw CI, Koekkoek SK, Wylie DR, Simpson JI (1997a) Association between dendritic lamellar bodies and complex spike synchrony in the olivocerebellar system. *J Neurophysiol* 77:1747–1758.
- De Zeeuw CI, Ruigrok TJ, Holstege JC, Jansen HG, Voogd J (1990b) Intracellular labeling of neurons in the medial accessory olive of the cat: II. Ultrastructure of dendritic spines and their GABAergic innervation. *J Comp Neurol* 300:478–494.
- De Zeeuw CI, Simpson JI, Hoogenraad CC, Galjart N, Koekkoek SK, Ruigrok TJ (1998) Microcircuitry and function of the inferior olive. *Trends Neurosci* 21:391–400.
- De Zeeuw CI, Van Alphen AM, Hawkins RK, Ruigrok TJ (1997b) Climbing fibre collaterals contact neurons in the cerebellar nuclei that provide a GABAergic feedback to the inferior olive. *Neuroscience* 80:981–986.

- Deisseroth K, Feng G, Majewska AK, Miesenböck G, Ting A, Schnitzer MJ (2006) Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits. *J Neurosci* 26:10380–10386.
- Demer JL, Echelman DA, Robinson DA (1985) Effects of electrical stimulation and reversible lesions of the olivocerebellar pathway on Purkinje cell activity in the flocculus of the cat. *Brain Res* 346:22–31.
- Devor A, Fritschy JM, Yarom Y (2001) Spatial distribution and subunit composition of GABA(A) receptors in the inferior olivary nucleus. *J Neurophysiol* 85:1686–1696.
- Devor A, Yarom Y (2000) GABAergic modulation of olivary oscillations. *Prog Brain Res* 124:213–220.
- Dieudonné S (1998) Submillisecond kinetics and low efficacy of parallel fibre-Golgi cell synaptic currents in the rat cerebellum. *J Physiol* 510 (Pt 3):845–866.
- Dieudonné S, Dumoulin A (2000) Serotonin-driven long-range inhibitory connections in the cerebellar cortex. *J Neurosci* 20:1837–1848.
- Dom R, King S, Martin GF (1973) Evidence for two direct cerebello-olivary connections. *Brain Res* 57:498–501.
- Dugué GP, Brunel N, Hakim V, Schwartz E, Chat M, Lévesque M, Courtemanche R, Léna C, Dieudonné S (2009) Electrical coupling mediates tunable low-frequency oscillations and resonance in the cerebellar Golgi cell network. *Neuron* 61:126–139.

- E -

- Ebner TJ, Bloedel JR (1981) Temporal patterning in simple spike discharge of Purkinje cells and its relationship to climbing fiber activity. *J Neurophysiol* 45:933–947.
- Ebner TJ, Chen G, Gao W, Reinert K (2005) Optical imaging of cerebellar functional architectures: parallel fiber beams, parasagittal bands and spreading acidification. *Prog Brain Res* 148:125–138.
- Eccles JC, Llinás R, Sasaki K (1966) The excitatory synaptic action of climbing fibres on the Purkinje cells of the cerebellum. *J Physiol* 182:268–296.
- Eccles JC, Provini L, Strata P, Táboríková H (1968) Analysis of electrical potentials evoked in the cerebellar anterior lobe by stimulation of hindlimb and forelimb nerves. *Exp brain Res* 6:171–194.
- Eccles JC, Sasaki K, Strata P (1967) Interpretation of the potential fields generated in the cerebellar cortex by a mossy fibre volley. *Exp brain Res* 3:58–80.
- Edinger L (1910) Ueber die Einteilung des Cerebellums. *Anat Anz* 35:319–323.
- Ekerot CF, Jörntell H (2001) Parallel fibre receptive fields of Purkinje cells and interneurons are climbing fibre-specific. *Eur J Neurosci* 13:1303–1310.
- Ekerot CF, Larson B (1973) Correlation between sagittal projection zones of climbing and mossy fibre paths in cat cerebellar anterior lobe. *Brain Res* 64:446–450.
- Ekerot CF, Larson B (1979) The dorsal spino-olivocerebellar system in the cat. I. Functional organization and termination in the anterior lobe. *Exp Brain Res* 36:201–217.
- Ekerot CF, Larson B (1982) Branching of olivary axons to innervate pairs of sagittal zones in the cerebellar anterior lobe of the cat. *Exp brain Res* 48:185–198.
- Escobar A, Sampedro ED, Dow RS (1968) Quantitative data on the inferior olivary nucleus in man, cat and vampire bat. *J Comp Neurol* 132:397–403.

- F -

- Fox CA (1959) The intermediate cells of Lugaro in the cerebellar cortex of the monkey. *J Comp Neurol* 112:39–53.
- Fredette BJ, Mugnaini E (1991) The GABAergic cerebello-olivary projection in the rat. *Anat Embryol (Berl)* 184:225–243.
- Fujita H, Sugihara I (2013) Branching patterns of olivocerebellar axons in relation to the compartmental organization of the cerebellum. *Front Neural Circuits* 7:3.

- G -

- Gao Z, van Beugen BJ, De Zeeuw CI (2012) Distributed synergistic plasticity and cerebellar learning. *Nat Rev Neurosci* 13:619–635.

- Garwicz M, Ekerot C-F, Jörntell H (1998a) Organizational Principles of Cerebellar Neuronal Circuitry. *Physiology* 13:26–32.
- Garwicz M, Ekerot C-F, Schouenborg J (1992) Distribution of Cutaneous Nociceptive and Tactile Climbing Fibre Input to Sagittal Zones in Cat Cerebellar Anterior Lobe. *Eur J Neurosci* 4:289–295.
- Garwicz M, Jörntell H, Ekerot CF (1998b) Cutaneous receptive fields and topography of mossy fibres and climbing fibres projecting to cat cerebellar C3 zone. *J Physiol* 512 (Pt 1):277–293.
- Gebre SA, Reeber SL, Sillitoe R V (2012) Parasagittal compartmentation of cerebellar mossy fibers as revealed by the patterned expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2. *Brain Struct Funct* 217:165–180.
- Gellman R, Miles F (1985) A new role for the cerebellum in conditioning? *Trends Neurosci* 8:181–182.
- Gerrits NM, Voogd J (1987) The projection of the nucleus reticularis tegmenti pontis and adjacent regions of the pontine nuclei to the central cerebellar nuclei in the cat. *J Comp Neurol* 258:52–69.
- Gerrits NM, Voogd J, Nas WS (1985) Cerebellar and olivary projections of the external and rostral internal cuneate nuclei in the cat. *Exp Brain Res* 57:239–255.
- Ghosh KK, Burns LD, Cocker ED, Nimmerjahn A, Ziv Y, Gamal A El, Schnitzer MJ (2011) Miniaturized integration of a fluorescence microscope. *Nat Methods* 8:871–878.
- Gilbert PF, Thach WT (1977) Purkinje cell activity during motor learning. *Brain Res* 128:309–328.
- 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.
- Glickstein M, Voogd J (1995) Lodewijk Bolk and the comparative anatomy of the cerebellum. *Trends Neurosci* 18:206–210.
- Goldowitz D, Cushing RC, Laywell E, D’Arcangelo G, Sheldon M, Sweet HO, Davisson M, Steindler D, Curran T (1997) Cerebellar disorganization characteristic of reeler in scrambler mutant mice despite presence of reelin. *J Neurosci* 17:8767–8777.
- Gonzalez L, Shumway C, Morissette J, Bower JM (1993) Developmental plasticity in cerebellar tactile maps: fractured maps retain a fractured organization. *J Comp Neurol* 332:487–498.
- Goodlett CR, Hamre KM, West JR (1992) Dissociation of spatial navigation and visual guidance performance in Purkinje cell degeneration (pcd) mutant mice. *Behav Brain Res* 47:129–141.
- Graf W, Simpson JJ, Leonard CS (1988) Spatial organization of visual messages of the rabbit’s cerebellar flocculus. II. Complex and simple spike responses of Purkinje cells. *J Neurophysiol* 60:2091–2121.
- Granit R, Phillips CG (1956) Excitatory and inhibitory processes acting upon individual Purkinje cells of the cerebellum in cats. *J Physiol* 133:520–547.
- Grodd W, Hülsmann E, Lotze M, Wildgruber D, Erb M (2001) Sensorimotor mapping of the human cerebellum: fMRI evidence of somatotopic organization. *Hum Brain Mapp* 13:55–73.
- Groenewegen HJ, Voogd J (1977) The parasagittal zonation within the olivocerebellar projection. I. Climbing fiber distribution in the vermis of cat cerebellum. *J Comp Neurol* 174:417–488.
- Groenewegen HJ, Voogd J, Freedman SL (1979) The parasagittal zonation within the olivocerebellar projection. II. Climbing fiber distribution in the intermediate and hemispheric parts of cat cerebellum. *J Comp Neurol* 183:551–601.
- Gruart A, Blázquez P, Pastor AM, Delgado-García JM (1994) Very short-term potentiation of climbing fiber effects on deep cerebellar nuclei neurons by conditioning stimulation of mossy fiber afferents. *Exp Brain Res* 101:173–177.
- Gundappa-Sulur G, De Schutter E, Bower JM (1999) Ascending granule cell axon: an important component of cerebellar cortical circuitry. *J Comp Neurol* 408:580–596.

- H -

- Hallett JS, Thompson JH, Gundappa-Sulur G, Hawkes R, Bjaalie JG, Bower JM (1999) Spatial correspondence between tactile projection patterns and the distribution of the antigenic Purkinje cell markers anti-zebrin I and anti-zebrin II in the cerebellar folium crus IIA of the rat. *Neuroscience* 93:1083–1094.
- Hámori J (1981) Synaptic input to the axon hillock and initial segment of inhibitory interneurons in the cerebellar cortex of the rat. An electron microscopic study. *Cell Tissue Res* 217:553–562.
- Haroian AJ, Massopust LC, Young PA (1981) Cerebellothalamic projections in the rat: an autoradiographic and degeneration study. *J Comp Neurol* 197:217–236.

- Harvey RJ, Napper RM (1988) Quantitative study of granule and Purkinje cells in the cerebellar cortex of the rat. *J Comp Neurol* 274:151–157.
- Harvey RJ, Napper RM (1991) Quantitative studies on the mammalian cerebellum. *Prog Neurobiol* 36:437–463.
- Hashimoto M, Mikoshiba K (2003) Mediolateral compartmentalization of the cerebellum is determined on the “birth date” of Purkinje cells. *J Neurosci* 23:11342–11351.
- Hashimoto T, Tayama M, Murakawa K, Yoshimoto T, Miyazaki M, Harada M, Kuroda Y (1995) Development of the brainstem and cerebellum in autistic patients. *J Autism Dev Disord* 25:1–18.
- Häusser M, Clark BA (1997) Tonic synaptic inhibition modulates neuronal output pattern and spatiotemporal synaptic integration. *Neuron* 19:665–678.
- Häusser M, Raman IM, Otis T, Smith SL, Nelson A, du Lac S, Loewenstein Y, Mahon S, Pennartz C, Cohen I, Yarom Y (2004) The beat goes on: spontaneous firing in mammalian neuronal microcircuits. *J Neurosci* 24:9215–9219.
- Hawkes R (1997) An anatomical model of cerebellar modules. *Prog Brain Res* 114:39–52.
- Hawkes R, Colonnier M, Leclerc N (1985) Monoclonal antibodies reveal sagittal banding in the rodent cerebellar cortex. *Brain Res* 333:359–365.
- Hawkes R, Herrup K (1995) Aldolase C/zebrin II and the regionalization of the cerebellum. *J Mol Neurosci* 6:147–158.
- Hawkes R, Leclerc N (1989) Purkinje cell axon collateral distributions reflect the chemical compartmentation of the rat cerebellar cortex. *Brain Res* 476:279–290.
- Heckroth JA (1994) Quantitative morphological analysis of the cerebellar nuclei in normal and lurcher mutant mice. I. Morphology and cell number. *J Comp Neurol* 343:173–182.
- Heckroth JA, Eisenman LM (1988) Parasagittal organization of mossy fiber collaterals in the cerebellum of the mouse. *J Comp Neurol* 270:385–394.
- Herculano-Houzel S, Collins CE, Wong P, Kaas JH (2007) Cellular scaling rules for primate brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:3562–3567.
- Herrero L, Yu M, Walker F, Armstrong DM, Apps R (2006) Olivo-cortico-nuclear localizations within crus I of the cerebellum. *J Comp Neurol* 497:287–308.
- Herrup K, Kuemerle B (1997) The compartmentalization of the cerebellum. *Annu Rev Neurosci* 20:61–90.
- Hesslow G (1986) Inhibition of inferior olivary transmission by mesencephalic stimulation in the cat. *Neurosci Lett* 63:76–80.
- Hesslow G, Ivarsson M (1996) Inhibition of the inferior olive during conditioned responses in the decerebrate ferret. *Exp Brain Res* 110:36–46.
- Hirono M, Saitow F, Kudo M, Suzuki H, Yanagawa Y, Yamada M, Nagao S, Konishi S, Obata K (2012) Cerebellar globular cells receive monoaminergic excitation and monosynaptic inhibition from Purkinje cells. *PLoS One* 7:e29663.
- Hobbs MJ, Young JZ (1973) A cephalopod cerebellum. *Brain Res* 55:424–430.
- Hoebeek FE, Witter L, Ruigrok TJH, De Zeeuw CI (2010) Differential olivo-cerebellar cortical control of rebound activity in the cerebellar nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:8410–8415.
- Holmes G (1917) The symptoms of acute cerebellar injuries due to gunshot injuries. *Brain* 40:461–535.
- Hoover JE, Strick PL (1999) The organization of cerebellar and basal ganglia outputs to primary motor cortex as revealed by retrograde transneuronal transport of herpes simplex virus type 1. *J Neurosci* 19:1446–1463.
- Houweling AR, Doron G, Voigt BC, Herfst LJ, Brecht M (2010) Nanostimulation: manipulation of single neuron activity by juxtacellular current injection. *J Neurophysiol* 103:1696–1704.
- Huber D, Petreanu L, Ghitani N, Ranade S, Hromádka T, Mainen Z, Svoboda K (2008) Sparse optical microstimulation in barrel cortex drives learned behaviour in freely moving mice. *Nature* 451:61–64.
- Hull C, Regehr WG (2012) Identification of an inhibitory circuit that regulates cerebellar Golgi cell activity. *Neuron* 73:149–158.
- | -
- Isopé P, Barbour B (2002) Properties of unitary granule cell→Purkinje cell synapses in adult rat cerebellar slices. *J Neurosci* 22:9668–9678.

- Ito M (2001) Cerebellar long-term depression: characterization, signal transduction, and functional roles. *Physiol Rev* 81:1143–1195.
- Ito M (2002a) Historical review of the significance of the cerebellum and the role of Purkinje cells in motor learning. *Ann N Y Acad Sci* 978:273–288.
- Ito M (2002b) The molecular organization of cerebellar long-term depression. *Nat Rev Neurosci* 3:896–902.
- Ito M (2008) Control of mental activities by internal models in the cerebellum. *Nat Rev Neurosci* 9:304–313.

- J -

- Jacobson GA, Lev I, Yarom Y, Cohen D (2009) Invariant phase structure of olivo-cerebellar oscillations and its putative role in temporal pattern generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:3579–3584.
- Jasmin L, Courville J (1987) Distribution of external cuneate nucleus afferents to the cerebellum: II. Topographical distribution and zonal pattern--an experimental study with radioactive tracers in the cat. *J Comp Neurol* 261:497–514.
- Ji Z, Hawkes R (1994) Topography of Purkinje cell compartments and mossy fiber terminal fields in lobules II and III of the rat cerebellar cortex: spinocerebellar and cuneocerebellar projections. *Neuroscience* 61:935–954.
- Jörntell H, Ekerot C, Garwicz M, Luo XL (2000) Functional organization of climbing fibre projection to the cerebellar anterior lobe of the rat. *J Physiol* 522 Pt 2:297–309.
- Joseph JW, Shambes GM, Gibson JM, Welker W (1978) Tactile projections to granule cells in caudal vermis of the rat's cerebellum. *Brain Behav Evol* 15:141–149.
- Jueptner M, Weiller C (1998) A review of differences between basal ganglia and cerebellar control of movements as revealed by functional imaging studies. *Brain* 121 (Pt 8):1437–1449.

- K -

- Kanichay RT, Silver RA (2008) Synaptic and cellular properties of the feedforward inhibitory circuit within the input layer of the cerebellar cortex. *J Neurosci* 28:8955–8967.
- Karavanova I, Vasudevan K, Cheng J, Buonanno A (2007) Novel regional and developmental NMDA receptor expression patterns uncovered in NR2C subunit-beta-galactosidase knock-in mice. *Mol Cell Neurosci* 34:468–480.
- Kassel J, Shambes GM, Welker W (1984) Fractured cutaneous projections to the granule cell layer of the posterior cerebellar hemisphere of the domestic cat. *J Comp Neurol* 225:458–468.
- Kawato M (1999) Internal models for motor control and trajectory planning. *Curr Opin Neurobiol* 9:718–727.
- Ke MC, Guo CC, Raymond JL (2009) Elimination of climbing fiber instructive signals during motor learning. *Nat Neurosci* 12:1171–1179.
- Keating JG, Thach WT (1995) Nonclock behavior of inferior olive neurons: interspike interval of Purkinje cell complex spike discharge in the awake behaving monkey is random. *J Neurophysiol* 73:1329–1340.
- Keele SW, Posner MI (1968) Processing of visual feedback in rapid movements. *J Exp Psychol* 77:155–158.
- Kettner RE, Mahamud S, Leung HC, Sitkoff N, Houk JC, Peterson BW, Barto AG (1997) Prediction of complex two-dimensional trajectories by a cerebellar model of smooth pursuit eye movement. *J Neurophysiol* 77:2115–2130.
- Khosrovani S, Van Der Giessen RS, De Zeeuw CI, De Jeu MTG (2007) In vivo mouse inferior olive neurons exhibit heterogeneous subthreshold oscillations and spiking patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:15911–15916.
- Kim JH, Wang JJ, Ebner TJ (1988) Alterations in simple spike activity and locomotor behavior associated with climbing fiber input to Purkinje cells in a decerebrate walking cat. *Neuroscience* 25:475–489.
- Kim JJ, Krupa DJ, Thompson RF (1998) Inhibitory cerebello-olivary projections and blocking effect in classical conditioning. *Science* 279:570–573.
- King JS, Andrezik JA, Falls WM, Martin GF (1976) The synaptic organization of the cerebello-olivary circuit. *Exp Brain Res* 26:159–170.
- King JS, Bishop GA (1982) The synaptic features of horseradish peroxidase-labelled recurrent collaterals in the ganglionic plexus of the cat cerebellar cortex. *J Neurocytol* 11:867–880.
- Kitai ST, Táboríková H, Tsukahara N, Eccles JC (1969) The distribution to the cerebellar anterior lobe of the climbing and mossy fiber inputs from the plantar and palmar cutaneous afferents. *Exp Brain Res* 7:1–10.

- Kitazawa S, Kimura T, Yin PB (1998) Cerebellar complex spikes encode both destinations and errors in arm movements. *Nature* 392:494–497.
- Kooy FH (1916) The inferior olive in vertebrates.
- Korn H, Axelrad H (1980) Electrical inhibition of Purkinje cells in the cerebellum of the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:6244–6247.
- Kyuhou S, Kawaguchi S (1987) Cerebellocerebral projection from the fastigial nucleus onto the frontal eye field and anterior ectosylvian visual area in the cat. *J Comp Neurol* 259:571–590.

- L -

- Lainé J, Axelrad H (1994) The candelabrum cell: a new interneuron in the cerebellar cortex. *J Comp Neurol* 339:159–173.
- Lainé J, Axelrad H (1996) Morphology of the Golgi-impregnated Lugaro cell in the rat cerebellar cortex: a reappraisal with a description of its axon. *J Comp Neurol* 375:618–640.
- Lainé J, Axelrad H (2002) Extending the cerebellar Lugaro cell class. *Neuroscience* 115:363–374.
- Lalonde R (1997) Visuospatial abilities. *Int Rev Neurobiol* 41:191–215.
- Lamp I, Yarom Y (1993) Subthreshold oscillations of the membrane potential: a functional synchronizing and timing device. *J Neurophysiol* 70:2181–2186.
- Lamp I, Yarom Y (1997) Subthreshold oscillations and resonant behavior: two manifestations of the same mechanism. *Neuroscience* 78:325–341.
- Lang EJ, Sugihara I, Llinás R (1996) GABAergic modulation of complex spike activity by the cerebellar nucleoolivary pathway in rat. *J Neurophysiol* 76:255–275.
- Lang EJ, Sugihara I, Welsh JP, Llinás R (1999) Patterns of spontaneous purkinje cell complex spike activity in the awake rat. *J Neurosci* 19:2728–2739.
- Lange W (1975) Cell number and cell density in the cerebellar cortex of man and some other mammals. *Cell Tissue Res* 157:115–124.
- Larsell O (1952) The morphogenesis and adult pattern of the lobules and fissures of the cerebellum of the white rat. *J Comp Neurol* 97:281–356.
- Larson B, Miller S, Oscarsson O (1969) A spinocerebellar climbing fibre path activated by the flexor reflex afferents from all four limbs. *J Physiol* 203:641–649.
- Leclerc N, Doré L, Parent A, Hawkes R (1990) The compartmentalization of the monkey and rat cerebellar cortex: zebrin I and cytochrome oxidase. *Brain Res* 506:70–78.
- LeDoux MS, Hurst DC, Lorden JF (1998) Single-unit activity of cerebellar nuclear cells in the awake genetically dystonic rat. *Neuroscience* 86:533–545.
- Leiner HC, Leiner AL, Dow RS (1993) Cognitive and language functions of the human cerebellum. *Trends Neurosci* 16:444–447.
- Lemkey-Johnston N, Larramendi LM (1968) Types and distribution of synapses upon basket and stellate cells of the mouse cerebellum: an electron microscopic study. *J Comp Neurol* 134:73–112.
- Lev-Ram V, Wong ST, Storm DR, Tsien RY (2002) A new form of cerebellar long-term potentiation is postsynaptic and depends on nitric oxide but not cAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8389–8393.
- Leznik E, Llinás R (2005) Role of gap junctions in synchronized neuronal oscillations in the inferior olive. *J Neurophysiol* 94:2447–2456.
- Lin JY (2011) A user's guide to channelrhodopsin variants: features, limitations and future developments. *Exp Physiol* 96:19–25.
- Llano I, Gerschenfeld HM (1993) Inhibitory synaptic currents in stellate cells of rat cerebellar slices. *J Physiol* 468:177–200.
- Llinas R, Baker R, Sotelo C (1974) Electrotonic coupling between neurons in cat inferior olive. *J Neurophysiol* 37:560–571.
- Llinás R, Mühlethaler M (1988) Electrophysiology of guinea-pig cerebellar nuclear cells in the in vitro brain stem-cerebellar preparation. *J Physiol* 404:241–258.
- Llinás R, Sasaki K (1989) The Functional Organization of the Olivo-Cerebellar System as Examined by Multiple Purkinje Cell Recordings. *Eur J Neurosci* 1:587–602.

- Llinás R, Sugimori M (1980) Electrophysiological properties of in vitro Purkinje cell dendrites in mammalian cerebellar slices. *J Physiol* 305:197–213.
- Llinás R, Volkind RA (1973) The olivo-cerebellar system: functional properties as revealed by harmaline-induced tremor. *Exp Brain Res* 18:69–87.
- Llinás R, Walton K, Hillman DE, Sotelo C (1975) Inferior olive: its role in motor learning. *Science* (80-) 190:1230–1231.
- Llinás R, Yarom Y (1981) Electrophysiology of mammalian inferior olivary neurones in vitro. Different types of voltage-dependent ionic conductances. *J Physiol* 315:549–567.
- Llinás R, Yarom Y (1986) Oscillatory properties of guinea-pig inferior olivary neurones and their pharmacological modulation: an in vitro study. *J Physiol* 376:163–182.
- Llinás RR (2009) Inferior olive oscillation as the temporal basis for motricity and oscillatory reset as the basis for motor error correction. *Neuroscience* 162:797–804.
- Llinás RR (2011) Cerebellar motor learning versus cerebellar motor timing: the climbing fibre story. *J Physiol* 589:3423–3432.
- Long MA, Deans MR, Paul DL, Connors BW (2002) Rhythmicity without synchrony in the electrically uncoupled inferior olive. *J Neurosci* 22:10898–10905.
- Lynch JC, Hoover JE, Strick PL (1994) Input to the primate frontal eye field from the substantia nigra, superior colliculus, and dentate nucleus demonstrated by transneuronal transport. *Exp Brain Res* 100:181–186.
- M -
- Malacarne MVG (1776) Nuova esposizione della vera struttura del cervelletto umano. Torino: Briolo, G. Briolo. Turin.
- Malomo AO, Idowu OE, Osuagwu FC (2006) Lessons from History : Human Anatomy , from the Origin to the Renaissance. *Int J Morphol* 24:99–104.
- Mann-Metzer P, Yarom Y (2000) Electrotonic coupling synchronizes interneuron activity in the cerebellar cortex. *Prog Brain Res* 124:115–122.
- Manor Y, Yarom Y, Chorev E, Devor A (2000) To beat or not to beat: a decision taken at the network level. *J Physiol Paris* 94:375–390.
- Marr D (1969) A theory of cerebellar cortex. *J Physiol* 202:437–470.
- Marshall SP, Lang EJ (2009) Local changes in the excitability of the cerebellar cortex produce spatially restricted changes in complex spike synchrony. *J Neurosci* 29:14352–14362.
- Maruta J, Hensbroek RA, Simpson JI (2007) Intraburst and interburst signaling by climbing fibers. *J Neurosci* 27:11263–11270.
- Mathy A, Ho SSN, Davie JT, Duguid IC, Clark BA, Häusser M (2009) Encoding of oscillations by axonal bursts in inferior olive neurons. *Neuron* 62:388–399.
- Matsuno-Yagi A, Mukohata Y (1977) Two possible roles of bacteriorhodopsin; a comparative study of strains of *Halobacterium halobium* differing in pigmentation. *Biochem Biophys Res Commun* 78:237–243.
- Matsushita M, Yaginuma H (1995) Projections from the central cervical nucleus to the cerebellar nuclei in the rat, studied by anterograde axonal tracing. *J Comp Neurol* 353:234–246.
- Mauk MD, Donegan NH (1997) A model of Pavlovian eyelid conditioning based on the synaptic organization of the cerebellum. *Learn Mem* 4:130–158.
- Mauk MD, Garcia KS, Medina JF, Steele PM (1998) Does cerebellar LTD mediate motor learning? Toward a resolution without a smoking gun. *Neuron* 20:359–362.
- Mauk MD, Medina JF, Nores WL, Ohyama T (2000) Cerebellar function: coordination, learning or timing? *Curr Biol* 10:R522–5.
- Mauk MD, Steinmetz JE, Thompson RF (1986) Classical conditioning using stimulation of the inferior olive as the unconditioned stimulus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:5349–5353.
- May PJ, Hartwich-Young R, Nelson J, Sparks DL, Porter JD (1990) Cerebellotectal pathways in the macaque: implications for collicular generation of saccades. *Neuroscience* 36:305–324.
- McCormick DA, Steinmetz JE, Thompson RF (1985) Lesions of the inferior olivary complex cause extinction of the classically conditioned eyeblink response. *Brain Res* 359:120–130.

- McCormick DA, Thompson RF (1984) Neuronal responses of the rabbit cerebellum during acquisition and performance of a classically conditioned nictitating membrane-eyelid response. *J Neurosci* 4:2811–2822.
- Medina JF, Nores WL, Mauk MD (2002) Inhibition of climbing fibres is a signal for the extinction of conditioned eyelid responses. *Nature* 416:330–333.
- Miale IL, Sidman RL (1961) An autoradiographic analysis of histogenesis in the mouse cerebellum. *Exp Neurol* 4:277–296.
- Miall RC, Keating JG, Malkmus M, Thach WT (1998) Simple spike activity predicts occurrence of complex spikes in cerebellar Purkinje cells. *Nat Neurosci* 1:13–15.
- Miall RC, Weir DJ, Wolpert DM, Stein JF (1993) Is the cerebellum a smith predictor? *J Mot Behav* 25:203–216.
- Middleton FA, Strick PL (2001) Cerebellar projections to the prefrontal cortex of the primate. *J Neurosci* 21:700–712.
- Mihailoff GA (1993) Cerebellar nuclear projections from the basilar pontine nuclei and nucleus reticularis tegmenti pontis as demonstrated with PHA-L tracing in the rat. *J Comp Neurol* 330:130–146.
- Miyashita T, Shao YR, Chung J, Pourzia O, Feldman DE (2013) Long-term channelrhodopsin-2 (ChR2) expression can induce abnormal axonal morphology and targeting in cerebral cortex. *Front Neural Circuits* 7:8.
- Mlonyeni M (1973) The number of Purkinje cells and inferior olivary neurones in the cat. *J Comp Neurol* 147:1–10.
- Monsivais P, Clark BA, Roth A, Häusser M (2005) Determinants of action potential propagation in cerebellar Purkinje cell axons. *J Neurosci* 25:464–472.
- Montarolo PG, Palestini M, Strata P (1982) The inhibitory effect of the olivocerebellar input on the cerebellar Purkinje cells in the rat. *J Physiol* 332:187–202.
- Morissette J, Bower JM (1996) Contribution of somatosensory cortex to responses in the rat cerebellar granule cell layer following peripheral tactile stimulation. *Exp Brain Res* 109:240–250.
- Mugnaini E, Sekerková G, Martina M (2011) The unipolar brush cell: a remarkable neuron finally receiving deserved attention. *Brain Res Rev* 66:220–245.
- Mukamel EA, Nimmerjahn A, Schnitzer MJ (2009) Automated analysis of cellular signals from large-scale calcium imaging data. *Neuron* 63:747–760.

- N -

- Nagel G, Ollig D, Fuhrmann M, Kateriya S, Musti AM, Bamberg E, Hegemann P (2002) Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science* 296:2395–2398.
- Napper RM, Harvey RJ (1988a) Number of parallel fiber synapses on an individual Purkinje cell in the cerebellum of the rat. *J Comp Neurol* 274:168–177.
- Napper RM, Harvey RJ (1988b) Quantitative study of the Purkinje cell dendritic spines in the rat cerebellum. *J Comp Neurol* 274:158–167.
- Nicolson RI, Fawcett AJ, Dean P (2001) Developmental dyslexia: the cerebellar deficit hypothesis. *Trends Neurosci* 24:508–511.
- Nieuwenhuys R, Donkelaar HJ, Nicholson C (1998) The central nervous system of vertebrates. Springer.
- Nishiyama H, Linden DJ (2004) Differential maturation of climbing fiber innervation in cerebellar vermis. *J Neurosci* 24:3926–3932.
- Nunzi MG, Birnstiel S, Bhattacharyya BJ, Slater NT, Mugnaini E (2001) Unipolar brush cells form a glutamatergic projection system within the mouse cerebellar cortex. *J Comp Neurol* 434:329–341.
- Nunzi M-G, Shigemoto R, Mugnaini E (2002) Differential expression of calretinin and metabotropic glutamate receptor mGluR1alpha defines subsets of unipolar brush cells in mouse cerebellum. *J Comp Neurol* 451:189–199.

- O -

- O'Donoghue DL, King JS, Bishop GA (1989) Physiological and anatomical studies of the interactions between Purkinje cells and basket cells in the cat's cerebellar cortex: evidence for a unitary relationship. *J Neurosci* 9:2141–2150.
- Oberdick J, Baader SL, Schilling K (1998) From zebra stripes to postal zones: deciphering patterns of gene expression in the cerebellum. *Trends Neurosci* 21:383–390.

- Odeh F, Ackerley R, Bjaalie JG, Apps R (2005) Pontine maps linking somatosensory and cerebellar cortices are in register with climbing fiber somatotopy. *J Neurosci* 25:5680–5690.
- Oesterhelt D, Stoeckenius W (1971) Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nat New Biol* 233:149–152.
- Oostland M, van Hooft JA (2013) The role of serotonin in cerebellar development. *Neuroscience* 248C:201–212.
- Orduz D, Llano I (2007) Recurrent axon collaterals underlie facilitating synapses between cerebellar Purkinje cells. *Proc Natl Acad Sci* 104:17831–17836.
- Orioli PJ, Strick PL (1989) Cerebellar connections with the motor cortex and the arcuate premotor area: an analysis employing retrograde transneuronal transport of WGA-HRP. *J Comp Neurol* 288:612–626.
- Oscarsson O (1965) Functional organization of the spino- and cuneocerebellar tracts. *Physiol Rev* 45:495–522.
- Oscarsson O (1968) Termination and functional organization of the ventral spino-olivocerebellar path. *J Physiol* 196:453–478.
- Oscarsson O (1979) Functional units of the cerebellum - sagittal zones and microzones. *Trends Neurosci* 2:143–145.
- Ottersen OP, Davanger S, Storm-Mathisen J (1987) Glycine-like immunoreactivity in the cerebellum of rat and Senegalese baboon, *Papio papio*: a comparison with the distribution of GABA-like immunoreactivity and with [3H]glycine and [3H]GABA uptake. *Exp Brain Res* 66:211–221.
- Ozden I, Lee HM, Sullivan MR, Wang SS-H (2008) Identification and clustering of event patterns from in vivo multiphoton optical recordings of neuronal ensembles. *J Neurophysiol* 100:495–503.
- Ozden I, Sullivan MR, Lee HM, Wang SS-H (2009) Reliable coding emerges from coactivation of climbing fibers in microbands of cerebellar Purkinje neurons. *J Neurosci* 29:10463–10473.

- P -

- Palay SL, Chan-Palay V (1974) *Cerebellar cortex: cytology and organization*. Springer.
- Palkovits M, Mezey E, Hámori J, Szentágothai J (1977) Quantitative histological analysis of the cerebellar nuclei in the cat. I. Numerical data on cells and on synapses. *Exp brain Res* 28:189–209.
- Pedroarena CM, Schwarz C (2003) Efficacy and short-term plasticity at GABAergic synapses between Purkinje and cerebellar nuclei neurons. *J Neurophysiol* 89:704–715.
- Person AL, Raman IM (2012a) Synchrony and neural coding in cerebellar circuits. *Front Neural Circuits* 6:97.
- Person AL, Raman IM (2012b) Purkinje neuron synchrony elicits time-locked spiking in the cerebellar nuclei. *Nature* 481:502–505.
- Petrosini L, Leggio MG, Molinari M (1998) The cerebellum in the spatial problem solving: a co-star or a guest star? *Prog Neurobiol* 56:191–210.
- Pichitpornchai C, Rawson JA, Rees S (1994) Morphology of parallel fibres in the cerebellar cortex of the rat: an experimental light and electron microscopic study with biocytin. *J Comp Neurol* 342:206–220.
- Pijpers A, Apps R, Pardoe J, Voogd J, Ruigrok TJH (2006) Precise spatial relationships between mossy fibers and climbing fibers in rat cerebellar cortical zones. *J Neurosci* 26:12067–12080.
- Pijpers A, Voogd J, Ruigrok TJH (2005) Topography of olivo-cortico-nuclear modules in the intermediate cerebellum of the rat. *J Comp Neurol* 492:193–213.
- Pinault D (1996) A novel single-cell staining procedure performed in vivo under electrophysiological control: morpho-functional features of juxtacellularly labeled thalamic cells and other central neurons with biocytin or Neurobiotin. *J Neurosci Methods* 65:113–136.
- Porrill J, Dean P, Stone J V (2004) Recurrent cerebellar architecture solves the motor-error problem. *Proceedings Biol Sci* 271:789–796.
- Pugh JR, Raman IM (2008) Mechanisms of potentiation of mossy fiber EPSCs in the cerebellar nuclei by coincident synaptic excitation and inhibition. *J Neurosci* 28:10549–10560.
- Pugh JR, Raman IM (2009) Nothing can be coincidence: synaptic inhibition and plasticity in the cerebellar nuclei. *Trends Neurosci* 32:170–177.

- Q -

Qiu D, Knöpfel T (2009) Presynaptically expressed long-term depression at cerebellar parallel fiber synapses. *Pflugers Arch* 457:865–875.

Quy PN, Fujita H, Sakamoto Y, Na J, Sugihara I (2011) Projection patterns of single mossy fiber axons originating from the dorsal column nuclei mapped on the aldolase C compartments in the rat cerebellar cortex. *J Comp Neurol* 519:874–899.

- R -

Raman IM, Bean BP (1999) Ionic currents underlying spontaneous action potentials in isolated cerebellar Purkinje neurons. *J Neurosci* 19:1663–1674.

Raman IM, Gustafson AE, Padgett D (2000) Ionic currents and spontaneous firing in neurons isolated from the cerebellar nuclei. *J Neurosci* 20:9004–9016.

Ramon y Cajal SF (1911) *Histology of the nervous system of man and vertebrate*, maloine. Paris.

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

Rasmussen A, Jirenhed D-A, Hesslow G (2008) Simple and complex spike firing patterns in Purkinje cells during classical conditioning. *Cerebellum* 7:563–566.

Rawson JA, Tilokskulchai K (1981) Suppression of simple spike discharges of cerebellar Purkinje cells by impulses in climbing fibre afferents. *Neurosci Lett* 25:125–130.

Raymond JL, Lisberger SG, Mauk MD (1996) The cerebellum: a neuronal learning machine? *Science* 272:1126–1131.

Rondi-Reig L, Burguière E (2005) Is the cerebellum ready for navigation? *Prog Brain Res* 148:199–212.

Rondi-Reig L, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J, Caston J (1997) Role of the inferior olivary complex in motor skills and motor learning in the adult rat. *Neuroscience* 77:955–963.

Rowland NC, Jaeger D (2005) Coding of tactile response properties in the rat deep cerebellar nuclei. *J Neurophysiol* 94:1236–1251.

Ruigrok TJ (1997) Cerebellar nuclei: the olivary connection. *Prog Brain Res* 114:167–192.

Ruigrok TJ, Osse RJ, Voogd J (1992) Organization of inferior olivary projections to the flocculus and ventral paraflocculus of the rat cerebellum. *J Comp Neurol* 316:129–150.

Ruigrok TJ, Voogd J (1990) Cerebellar nucleo-olivary projections in the rat: an anterograde tracing study with Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin (PHA-L). *J Comp Neurol* 298:315–333.

Ruigrok TJ, Voogd J (1995) Cerebellar influence on olivary excitability in the cat. *Eur J Neurosci* 7:679–693.

Ruigrok TJH (2004) Precerebellar nuclei and red nucleus - in Paxinos G: *The rat nervous system*, 3rd editio. San Diego: Elsevier Academic Press.

- S -

Safo P, Regehr WG (2008) Timing dependence of the induction of cerebellar LTD. *Neuropharmacology* 54:213–218.

Salin PA, Malenka RC, Nicoll RA (1996) Cyclic AMP mediates a presynaptic form of LTP at cerebellar parallel fiber synapses. *Neuron* 16:797–803.

Sánchez-Campusano R, Gruart A, Delgado-García JM (2009) Dynamic associations in the cerebellar-motoneuron network during motor learning. *J Neurosci* 29:10750–10763.

Sarko DK, Catania KC, Leitch DB, Kaas JH, Herculano-Houzel S (2009) Cellular scaling rules of insectivore brains. *Front Neuroanat* 3:8.

Sasaki K, Bower JM, Llinás R (1989) Multiple Purkinje Cell Recording in Rodent Cerebellar Cortex. *Eur J Neurosci* 1:572–586.

Sato Y, Miura A, Fushiki H, Kawasaki T (1992) Short-term modulation of cerebellar Purkinje cell activity after spontaneous climbing fiber input. *J Neurophysiol* 68:2051–2062.

Savio T, Tempia F (1985) On the Purkinje cell activity increase induced by suppression of inferior olive activity. *Exp Brain Res* 57:456–463.

- Schild RF (1970) On the inferior olive of the albino rat. *J Comp Neurol* 140:255–260.
- 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.
- Schlerf JE, Verstynen TD, Ivry RB, Spencer RMC (2010) Evidence of a novel somatotopic map in the human neocerebellum during complex actions. *J Neurophysiol* 103:3330–3336.
- Schmahmann JD, Caplan D (2006) Cognition, emotion and the cerebellum. *Brain* 129:290–292.
- Schmahmann JD, Pandya DN (1997) Anatomic organization of the basilar pontine projections from prefrontal cortices in rhesus monkey. *J Neurosci* 17:438–458.
- Schmahmann JD, Sherman JC (1998) The cerebellar cognitive affective syndrome. *Brain* 121 (Pt 4):561–579.
- Schonewille M, Luo C, Ruigrok TJH, Voogd J, Schmolesky MT, Rutteman M, Hoebeek FE, De Jeu MTG, De Zeeuw CI (2006) Zonal organization of the mouse flocculus: physiology, input, and output. *J Comp Neurol* 497:670–682.
- Schweighofer N, Doya K, Kuroda S (2004) Cerebellar aminergic neuromodulation: towards a functional understanding. *Brain Res Brain Res Rev* 44:103–116.
- Scott TG (1963) A unique pattern of localization within the cerebellum. *Nature* 200:793.
- Sears LL, Steinmetz JE (1991) Dorsal accessory inferior olive activity diminishes during acquisition of the rabbit classically conditioned eyelid response. *Brain Res* 545:114–122.
- Serapide MF, Pantó MR, Parenti R, Zappalá A, Cicirata F (2001) Multiple zonal projections of the basilar pontine nuclei to the cerebellar cortex of the rat. *J Comp Neurol* 430:471–484.
- Shambes GM, Beermann DH, Welker W (1978a) Multiple tactile areas in cerebellar cortex: another patchy cutaneous projection to granule cell columns in rats. *Brain Res* 157:123–128.
- Shambes GM, Gibson JM, Welker W (1978b) Fractured somatotopy in granule cell tactile areas of rat cerebellar hemispheres revealed by micromapping. *Brain Behav Evol* 15:94–140.
- Shin S-L, Hoebeek FE, Schonewille M, De Zeeuw CI, Aertsen A, De Schutter E (2007a) Regular patterns in cerebellar Purkinje cell simple spike trains. *PLoS One* 2:e485.
- Shin S-L, Rotter S, Aertsen A, De Schutter E (2007b) Stochastic description of complex and simple spike firing in cerebellar Purkinje cells. *Eur J Neurosci* 25:785–794.
- Sillitoe R V, Chung S-H, Fritschy J-M, Hoy M, Hawkes R (2008) Golgi cell dendrites are restricted by Purkinje cell stripe boundaries in the adult mouse cerebellar cortex. *J Neurosci* 28:2820–2826.
- Sillitoe R V., Marzban H, Larouche M, Zahedi S, Affanni J, Hawkes R (2005) Conservation of the architecture of the anterior lobe vermis of the cerebellum across mammalian species. *Prog Brain Res* 148:283–297.
- Simat M, Parpan F, Fritschy J-M (2007) Heterogeneity of glycinergic and gabaergic interneurons in the granule cell layer of mouse cerebellum. *J Comp Neurol* 500:71–83.
- Snider R, Eldred E (1951) Electro-anatomical studies on cerebro-cerebellar connections in the cat. *J Comp Neurol* 95:1–16.
- Snider RS, Stowell A (1944) A. Receiving areas of the tactile, auditory and visual systems in the cerebellum. *J Neurophysiol* 7:331–357.
- Somogyi P, Hámori J (1976) A quantitative electron microscopic study of the Purkinje cell axon initial segment. *Neuroscience* 1:361–365.
- Sotelo C, Chédotal A (2005) Development of the olivocerebellar system: migration and formation of cerebellar maps. *Prog Brain Res* 148:1–20.
- Sotelo C, Gotow T, Wassef M (1986) Localization of glutamic-acid-decarboxylase-immunoreactive axon terminals in the inferior olive of the rat, with special emphasis on anatomical relations between GABAergic synapses and dendrodendritic gap junctions. *J Comp Neurol* 252:32–50.
- Sotelo C, Llinas R, Baker R (1974) Structural study of inferior olivary nucleus of the cat: morphological correlates of electrotonic coupling. *J Neurophysiol* 37:541–559.
- Sotelo C, Wassef M (1991) Cerebellar development: afferent organization and Purkinje cell heterogeneity. *Philos Trans R Soc London* 331:307–313.
- Sperry RW (1950) Neural basis of the spontaneous optokinetic response produced by visual inversion. *J Comp Physiol Psychol* 43:482–489.
- Spira ME, Bennett M V (1972) Synaptic control of electrotonic coupling between neurons. *Brain Res* 37:294–300.

- Stein JF, Glickstein M (1992) Role of the cerebellum in visual guidance of movement. *Physiol Rev* 72:967–1017.
- Sugihara I, Fujita H, Na J, Quy PN, Li B-Y, Ikeda D (2009) Projection of reconstructed single Purkinje cell axons in relation to the cortical and nuclear aldolase C compartments of the rat cerebellum. *J Comp Neurol* 512:282–304.
- Sugihara I, Lang EJ, Llinás R (1993) Uniform olivocerebellar conduction time underlies Purkinje cell complex spike synchronicity in the rat cerebellum. *J Physiol* 470:243–271.
- Sugihara I, Marshall SP, Lang EJ (2007) Relationship of complex spike synchrony bands and climbing fiber projection determined by reference to aldolase C compartments in crus IIa of the rat cerebellar cortex. *J Comp Neurol* 501:13–29.
- Sugihara I, Shinoda Y (2004) Molecular, topographic, and functional organization of the cerebellar cortex: a study with combined aldolase C and olivocerebellar labeling. *J Neurosci* 24:8771–8785.
- Sugihara I, Shinoda Y (2007) Molecular, topographic, and functional organization of the cerebellar nuclei: analysis by three-dimensional mapping of the olivonuclear projection and aldolase C labeling. *J Neurosci* 27:9696–9710.
- Sugihara I, Wu H, Shinoda Y (1999) Morphology of single olivocerebellar axons labeled with biotinylated dextran amine in the rat. *J Comp Neurol* 414:131–148.
- Sugihara I, Wu HS, Shinoda Y (2001) The entire trajectories of single olivocerebellar axons in the cerebellar cortex and their contribution to Cerebellar compartmentalization. *J Neurosci* 21:7715–7723.
- 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.
- Sultan F, Braitenberg V (1993) Shapes and sizes of different mammalian cerebella. A study in quantitative comparative neuroanatomy. *J Hirnforsch* 34:79–92.
- Svensson P, Bengtsson F, Hesslow G (2006) Cerebellar inhibition of inferior olivary transmission in the decerebrate ferret. *Exp Brain Res* 168:241–253.
- Szapiro G, Barbour B (2007) Multiple climbing fibers signal to molecular layer interneurons exclusively via glutamate spillover. *Nat Neurosci* 10:735–742.
- Szentagothai J, Rajovits K (1959) Über den Ursprung der kletterfasern des Kleinhirns. *Zeitschrift für Anat und Entwicklungsgeschichte* 121:130–141.
- T -
- Tadayonnejad R, Anderson D, Molineux ML, Mehaffey WH, Jayasuriya K, Turner RW (2010) Rebound discharge in deep cerebellar nuclear neurons in vitro. *Cerebellum* 9:352–374.
- Tan J, Gerrits NM, Nanhoe R, Simpson JI, Voogd J (1995) Zonal organization of the climbing fiber projection to the flocculus and nodulus of the rabbit: a combined axonal tracing and acetylcholinesterase histochemical study. *J Comp Neurol* 356:23–50.
- Telgkamp P, Raman IM (2002) Depression of inhibitory synaptic transmission between Purkinje cells and neurons of the cerebellar nuclei. *J Neurosci* 22:8447–8457.
- Teune TM, van der Burg J, van der Moer J, Voogd J, Ruigrok TJ (2000) Topography of cerebellar nuclear projections to the brain stem in the rat. *Prog Brain Res* 124:141–172.
- Thach WT (1968) Discharge of Purkinje and cerebellar nuclear neurons during rapidly alternating arm movements in the monkey. *J Neurophysiol* 31:785–797.
- Thach WT, Goodkin HP, Keating JG (1992) The cerebellum and the adaptive coordination of movement. *Annu Rev Neurosci* 15:403–442.
- Trott JR, Apps R, Armstrong DM (1998a) Zonal organization of cortico-nuclear and nucleo-cortical projections of the paramedian lobule of the cat cerebellum. 2. the C2 zone. *Exp Brain Res* 118:316–330.
- Trott JR, Apps R, Armstrong DM (1998b) Zonal organization of cortico-nuclear and nucleo-cortical projections of the paramedian lobule of the cat cerebellum. 1. the C1 zone. *Exp Brain Res* 118:298–315.
- Trott JR, Armstrong DM (1987) The cerebellar corticonuclear projection from lobule Vb/c of the cat anterior lobe: a combined electrophysiological and autoradiographic study. II. Projections from the vermis. *Exp Brain Res* 68:339–354.
- Tsubota T, Ohashi Y, Tamura K (2013) Optogenetics in the cerebellum: Purkinje cell-specific approaches for understanding local cerebellar functions. *Behav Brain Res* 255:26–34.

- U -

- Uusisaari M, Knöpfel T (2008) GABAergic synaptic communication in the GABAergic and non-GABAergic cells in the deep cerebellar nuclei. *Neuroscience* 156:537–549.
- Uusisaari M, Knöpfel T (2011) Functional classification of neurons in the mouse lateral cerebellar nuclei. *Cerebellum* 10:637–646.
- Uusisaari M, Obata K, Knöpfel T (2007) Morphological and electrophysiological properties of GABAergic and non-GABAergic cells in the deep cerebellar nuclei. *J Neurophysiol* 97:901–911.

- V -

- Van Der Giessen RS, Koekkoek SK, van Dorp S, De Gruijl JR, Cupido A, Khosrovani S, Dortland B, Wellershaus K, Degen J, Deuchars J, Fuchs EC, Monyer H, Willecke K, De Jeu MTG, De Zeeuw CI (2008) Role of olivary electrical coupling in cerebellar motor learning. *Neuron* 58:599–612.
- Van der Want JJ, Wiklund L, Guegan M, Ruigrok T, Voogd J (1989) Anterograde tracing of the rat olivocerebellar system with *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin (PHA-L). Demonstration of climbing fiber collateral innervation of the cerebellar nuclei. *J Comp Neurol* 288:1–18.
- Van Ham JJ, Yeo CH (1992) Somatosensory Trigeminal Projections to the Inferior Olive, Cerebellum and other Precerebellar Nuclei in Rabbits. *Eur J Neurosci* 4:302–317.
- Van Kan PL, Houk JC, Gibson AR (1993) Output organization of intermediate cerebellum of the monkey. *J Neurophysiol* 69:57–73.
- Von Holst E (1954) Relations between the central nervous system and the peripheral organs. *Br J Anim Behav* 2:89–94.
- Voogd J (1964) The cerebellum of the cat: structure and fiber connexions.
- Voogd J (1967) Comparative aspects of the structure and fibre connexions of the mammalian cerebellum. *Prog Brain Res* 25:94–134.
- Voogd J, Gerrits NM, Ruigrok TJ (1996) Organization of the vestibulocerebellum. *Ann N Y Acad Sci* 781:553–579.
- Voogd J, Glickstein M (1998) The anatomy of the cerebellum. *Trends Neurosci* 21:370–375.
- 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.
- Voogd J, Ruigrok TJ (1997) Transverse and longitudinal patterns in the mammalian cerebellum. *Prog Brain Res* 114:21–37.
- Voogd J, Ruigrok TJH (2004) The organization of the corticonuclear and olivocerebellar climbing fiber projections to the rat cerebellar vermis: the congruence of projection zones and the zebrin pattern. *J Neurocytol* 33:5–21.

- W -

- Wang SS, Denk W, Häusser M (2000) Coincidence detection in single dendritic spines mediated by calcium release. *Nat Neurosci* 3:1266–1273.
- Watanabe M, Kano M (2011) Climbing fiber synapse elimination in cerebellar Purkinje cells. *Eur J Neurosci* 34:1697–1710.
- Welker W, Shambes GM (1985) Tactile cutaneous representation in cerebellar granule cell layer of the opossum, *Didelphis virginiana*. *Brain Behav Evol* 27:57–79.
- Welsh JP (1998) Systemic harmaline blocks associative and motor learning by the actions of the inferior olive. *Eur J Neurosci* 10:3307–3320.
- Welsh JP, Harvey JA (1998) Acute inactivation of the inferior olive blocks associative learning. *Eur J Neurosci* 10:3321–3332.
- Welsh JP, Lang EJ, Suglhara I, Llinás R (1995) Dynamic organization of motor control within the olivocerebellar system. *Nature* 374:453–457.
- Welsh JP, Llinás R (1997) Some organizing principles for the control of movement based on olivocerebellar physiology. *Prog Brain Res* 114:449–461.
- Wiesendanger R, Wiesendanger M (1985) Cerebello-cortical linkage in the monkey as revealed by transcellular labeling with the lectin wheat germ agglutinin conjugated to the marker horseradish peroxidase. *Exp Brain Res* 59:105–117.

- Wilkin GP, Csillag A, Balázs R, Kingsbury AE, Wilson JE, Johnson AL (1981) Localization of high affinity [3H]glycine transport sites in the cerebellar cortex. *Brain Res* 216:11–33.
- Wolpert DM, Miall RC, Kawato M (1998) Internal models in the cerebellum. *Trends Cogn Sci* 2:338–347.
- Woolston DC, La Londe JR, Gibson JM (1982) Comparison of response properties of cerebellar- and thalamic-projecting interpolaris neurons. *J Neurophysiol* 48:160–173.
- Wu HS, Sugihara I, Shinoda Y (1999) Projection patterns of single mossy fibers originating from the lateral reticular nucleus in the rat cerebellar cortex and nuclei. *J Comp Neurol* 411:97–118.
- Wu YI, Frey D, Lungu OI, Jaehrig A, Schlichting I, Kuhlman B, Hahn KM (2009) A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells. *Nature* 461:104–108.

- Y -

- Yaginuma H, Matsushita M (1986) Spinocerebellar projection fields in the horizontal plane of lobules of the cerebellar anterior lobe in the cat: an anterograde wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase study. *Brain Res* 365:345–349.
- Yakhnitsa V, Barmack NH (2006) Antiphasic Purkinje cell responses in mouse uvula-nodulus are sensitive to static roll-tilt and topographically organized. *Neuroscience* 143:615–626.
- Yarom Y, Cohen D (2002) The olivocerebellar system as a generator of temporal patterns. *Ann N Y Acad Sci* 978:122–134.

- Z -

- Zemelman B V, Lee GA, Ng M, Miesenböck G (2002) Selective photostimulation of genetically chARGed neurons. *Neuron* 33:15–22.
- Zhang F, Gradinaru V, Adamantidis AR, Durand R, Airan RD, de Lecea L, Deisseroth K (2010) Optogenetic interrogation of neural circuits: technology for probing mammalian brain structures. *Nat Protoc* 5:439–456.
- Zhao S, Ting JT, Atallah HE, Qiu L, Tan J, Gloss B, Augustine GJ, Deisseroth K, Luo M, Graybiel AM, Feng G (2011) Cell type-specific channelrhodopsin-2 transgenic mice for optogenetic dissection of neural circuitry function. *Nat Methods* 8:745–752.

ANNEXES

LISTE DES PUBLICATIONS

Joseph Chaumont, Nicolas Guyon, Antoine M. Valera, Guillaume P. Dugué, Daniela Popa, Paikan Marcaggi, Vanessa Gautheron, Sophie Reibel-Foisset, Stéphane Dieudonné, Aline Stephan, Michel Barrot, Jean-Christophe Cassel, Jean-Luc Dupont, Frédéric Doussau, Bernard Poulain, Fekrije Selimi, Clément Léna, and Philippe Isope (2013) Clusters of cerebellar Purkinje cells control their afferent climbing fiber discharge. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(40):16223-8

Romain Goutagny, Michael Loureiro, Jesse Jackson, **Joseph Chaumont**, Sylvain Williams, Philippe Isope, Christian Kelche, Jean-Christophe Cassel and Lucas Lecourtier (2013) Interactions between the Lateral Habenula and the Hippocampus: Implication for Spatial Memory Processes. *Neuropharmacology* 38(12):2418-26

Tahir Hakami, Nigel C. Jones, Elena A. Tolmacheva, Julien Gaudias, **Joseph Chaumont**, Michael Salzberg, Terence J. O'Brien, Didier Pinault (2009) NMDA Receptor Hypofunction Leads to Generalized and Persistent Aberrant γ Oscillations Independent of Hyperlocomotion and the State of Consciousness. *PLoS One* 4(8):e6755

COMMUNICATION ORALE ET POSTER

J'ai participé aux congrès de la Fédération des Neurosciences Française à Marseille en juin 2011 et à Lyon en juin 2013, au congrès de la Fédération Européenne des Neurosciences (FENS) à Barcelone en juillet 2012, ainsi qu'à une école d'été organisée par la FENS-IBRO en mai 2013 et durant lesquels j'ai systématiquement présenté mes travaux sous forme de posters et d'une communication orale. J'ai également présenté mes travaux à 2 reprises aux meeting annuels de Neurex en 2012 (à Strasbourg) et en 2013 (à Bâle).

Les auteurs sont les mêmes (dans le même ordre) pour les posters présentés à : Société française des neurosciences 2011 ; Société française des neurosciences 2013 ; Société européenne des neurosciences 2012 ; summer school FENS-IBRO 2013 ; Neurex Meeting 2012 et Neurex Meeting 2013.

Liste des auteurs : **Joseph Chaumont**, Nicolas Guyon, Antoine M. Valera, Guillaume P. Dugué, Daniela Popa, Paikan Marcaggi, Vanessa Gautheron, Sophie Reibel-Foisset, Stéphane Dieudonné, Aline Stephan, Michel Barrot, Jean-Christophe Cassel, Jean-Luc Dupont, Frédéric Doussau, Bernard Poulain, Fekrije Selimi, Clément Léna, and Philippe Isope

GENOTYPAGE DE LA LIGNE U 126 (YFP – CHR2)

1^{ère} étape :

- Digestion :
- * Ajout de 100 µL de NaOH 25 mM dans les Eppendorfs contenant les fragments de queue
- * Incubation 1h / 1h15 à 98° dans un bain marie à sec (marche aussi avec bain marie classique)
 - ➔ Attention, si les Eppendorfs sont de mauvaise qualité, il est préférable de percer un petit trou afin d'éviter que les bouchons ne sautent sous la pression.
- Arrêt de la digestion :
- * Ajout de 100 µL de Tris-HCl 40 mM dans les Eppendorfs
- * Vortexez puis centrifugez à 13000 tour/min pendant 10 min à température ambiante.

2^{ème} étape : amplification de la séquence d'intérêt

- ➔ Utilisation des amorces Chr2 U123 / U 126 (L7Ven-F / Chr2-RI ou pBAC108L-RI / pBAC108L-F)
- ➔ *Taq DNA Polymérase* provenant de "invitrogen" Cat no. 18038-042
- ➔ *100 mM dNTP Set* provenant de "invitrogen" Cat no. 10297-018
- ➔ Toutes les opérations concernant le Mix avant le début de la PCR doivent se faire dans un bac de glace. Les dNTP et la Taq sont sensible à la chaleur.
- ➔ Aliquoter les dNTP par 10 ou 20 µL (ça supporte mal les décongélation/recongélation)
- ➔ Pour les primers (séquences, aliquotage, etc.) cf feuille "invitrogen" en PJ du mail.

Préparation du Mix pour PCR

Mix	Volume en µL					
	1 tube	10 tubes	20 tubes	25 tubes	30 tubes	46 tubes
Tampon 10X	2,5	25	50	62,5	75	115
dNTP	0,5	5	10	12,5	15	23
primer 5' - 3'	0,5	5	10	12,5	15	23
primer 3' - 5'	0,5	5	10	12,5	15	23
MgCl2 (50mM)	1,5	15	30	37,5	45	69
H2O Sigma	17,3	173	346	432,5	519	795,8
Taq	0,2	2	4	5	6	9,2
Total	23	230	460	575	690	1058

* Remplir les puits de PCR avec : 23 µL du Mix puis 3 µL d'ADN (respecter cet ordre, c'est plus simple pour déposer l'ADN et ça permet de remplir tous les puits de Mix avec une seule pointe ➔ attention de bien changer de pointe à chaque fois pour tout ce qui touche l'ADN.

* Nous utilisons les tubes : *PCR tube Strips 0,2 mL* de chez Eppendorf

* Mettre les puits dans le thermocycleur (chez nous = Eppendorf : Mastercycler gradient)

* Lancer le programme suivant :

1. T = 94° - 5 min (une fois)
2. T = 94° - 30 s
3. T = 60° - 30 s
4. T = 72° - 30 s
5. Répéter 30 fois le cycle 2. - 3. - 4.
6. T = 72° - 10 min (une fois)
7. fin du protocole : T = 4° - durée infinie

Rq : Il est indiqué avant le début du programme de la machine LID = 98°. Je ne sais pas encore à quoi cela correspond. Je vous tiens au courant dès que je sais.

3^{ème} étape : Migration

- Préparation du Gel d'agarose 0.8 - 1 % :

* dilution de l'agarose (UltraPure Agarose Cat no. 16500-500 "invitrogen") dans du TAE 1X

→ La recette du TAE est en pièce jointe du mail.

* Dilution de l'agarose dans le TAE en chauffant la solution au micro-onde

* Ajouter le SYBR Safe DNA gel stain ("invitrogen" S33102) au 1/5000^{ème}

Rq : ça marche aussi bien (voir mieux) avec du BET au 1/20000^{ème}

Rq2 : Refroidir un peu la solution avant d'y mélanger le SYBR et/ou le BET

* adaptez la quantité de gel en fonction du volume des cuves.

* attendre que ça ai refroidi pour enlever les peignes.

- Migration des échantillons :

* déposez 3-6 µL de matériel génétique (en fonction de la taille des puits) en y ajoutant préalablement du loading buffer (je n'ai pas les références de celui qu'on utilise et je ne sais pas à combien il est dilué... mais à priori, ça n'a que peu d'importance).

* faire migrer à 75 V pendant 15 à 20 min (ma cuve étant relativement basique, je n'ai pas l'intensité qui est indiquée). A ce niveau, c'est relativement simple de trouver ses propres réglages.

* par précaution nous utilisons un DNA ladder pour voir si les bandes observés sont bien les amplifications des séquences d'intérêt et pas les résidus des primers. *New England BioLab : 2-Log DNA Ladder (1µg/lane)*

* faire une photo du GEL sous lampe UV

Remarques générales :

- Pensez, de temps en temps, à aliquoter des témoins positifs et négatifs en prélevant les échantillons directement après l'arrêt de la digestion (stockage à -20°)

- De manière générale, prendre les précautions nécessaire afin d'éviter toutes contaminations d'un échantillon par un autre (surtout avant la PCR).

- Etant donné que l'intercalant (SYBR ou BET) migre dans le sens inverse de l'ADN, il ne faut pas faire migrer trop longtemps au risque de ne plus voir le marquage, alors qu'on voit encore une bonne parti du DNA ladder (surtout que dans notre cas, la séquence multipliée est petite)

RESUME

Le cervelet joue un rôle fondamental dans la coordination, l'ajustement, la planification et l'automatisation des mouvements, dans la modulation des réflexes ou encore dans certaines fonctions cognitives. Pour ce faire, il va collecter des informations motrices et sensorielles provenant aussi bien du cortex cérébral que du reste du corps. Ces informations sont relayées vers le cortex et les noyaux cérébelleux via les fibres grimpantes et les fibres moussues.

Les fibres grimpantes, projetant depuis l'olive inférieure, convoient des signaux sensori-moteurs impliqués dans certains apprentissages et dans la régulation temporelle des activités cérébelleuses. Ces processus jouent un rôle modulateur de la décharge et des plasticités des cellules de Purkinje cérébelleuses. Ces dernières ciblent les noyaux cérébelleux qui représentent l'unique sortie du cervelet. Les afférences de ces noyaux cérébelleux incluent une projection GABAergique dirigée sur l'olive inférieure. Ainsi, les connexions entre l'olive inférieure et le cervelet constituent potentiellement une boucle fermée olivo-cortico-nucléaire.

Sur la base de ce constat anatomique, nous avons fait l'hypothèse qu'un regroupement de cellules de Purkinje puisse contrôler la décharge de ses propres afférences grimpantes. Pour cette étude, en utilisant des enregistrements électrophysiologiques *in vitro* et *in vivo*, nous avons décrit un modèle de souris génétiquement modifiées qui permet un contrôle spécifique de la décharge des cellules de Purkinje par l'utilisation de l'optogénétique. Des enregistrements des noyaux cérébelleux par l'emploi de tétrodes ont permis de démontrer que, lors de stimulations focales des cellules de Purkinje, une inhibition restreinte spatialement pouvait être observée pour un groupe de neurones des noyaux cérébelleux. Étonnamment, de telles stimulations entraînent également l'émission d'un signal des fibres grimpantes au niveau des cellules de Purkinje stimulées suivant un délai d'environ 100 ms.

Finalement, nos résultats démontrent que les cellules de Purkinje contrôlent de manière phasique leurs afférences olivaires et que ce processus pourrait participer à la régulation des apprentissages moteurs cérébelleux.

Mots clefs : cervelet ; boucle olivo-cortico-nucléaire ; optogénétique ; cellules de Purkinje ; contrôle moteur ; apprentissages ; potentiel d'action complexe ; potentiel d'action simple.

Organisation fonctionnelle de la boucle olivo-cortico-nucléaire :

Influence de l'activité des cellules de Purkinje

Résumé (Français)

Le cervelet joue un rôle fondamental dans la coordination, l'ajustement, la planification et l'automatisation des mouvements, dans la modulation des réflexes ou encore dans certaines fonctions cognitives. Pour ce faire, il va collecter des informations motrices et sensorielles provenant aussi bien du cortex cérébral que du reste du corps. Ces informations sont relayées vers le cortex et les noyaux cérébelleux via les fibres grimpantes et les fibres moussues. Les fibres grimpantes, projetant depuis l'olive inférieure, convoient des signaux sensori-moteurs impliqués dans certains apprentissages et dans la régulation temporelle des activités cérébelleuses. Ces processus jouent un rôle modulateur de la décharge et des plasticités des cellules de Purkinje. Ces dernières ciblent les noyaux cérébelleux qui représentent l'unique sortie du cervelet. Les efférences de ces noyaux cérébelleux incluent une projection GABAergique dirigée sur l'olive inférieure. Ainsi, les connexions entre l'olive inférieure et le cervelet constituent potentiellement une boucle fermée olivo-cortico-nucléaire. Nos études se basent sur les enregistrements électrophysiologiques *in vitro* et *in vivo* de ces trois structures effectués sur un modèle de souris génétiquement modifiées qui permet un contrôle spécifique de la décharge des cellules de Purkinje par l'utilisation de l'optogénétique. La stimulation lumineuse du cortex cérébelleux de ces souris transgéniques active les cellules de Purkinje ainsi que la boucle olivo-cortico-nucléaire sur un délai total d'environ 100 ms. Ces résultats démontrent pour la première fois que les cellules de Purkinje contrôlent de manière phasique leurs afférences olivaires et que ce processus pourrait participer à la régulation des apprentissages moteurs cérébelleux.

Mots clefs : cervelet ; boucle olivo-cortico-nucléaire ; optogénétique ; cellules de Purkinje ; contrôle moteur ; apprentissages ; potentiel d'action complexe ; potentiel d'action simple.

Résumé (Anglais)

The cerebellum plays a fundamental role in coordination, adjustment, planning and automation of movements, in the modulation of reflexes and in some cognitive functions. To do this, it will collect motor and sensory information from both the cerebral cortex and the rest of the body. These information are relayed to the cortex and cerebellar nuclei via climbing fibers and mossy fibers. Climbing fibers, the projections from the inferior olive to the cerebellar cortex, carry sensorimotor error and clock signals that trigger motor learning by controlling cerebellar Purkinje cell synaptic plasticity and discharge. Purkinje cells target the deep cerebellar nuclei, which are the output of the cerebellum and include an inhibitory GABAergic projection to the inferior olive. This pathway identifies a potential closed loop in the olivo-cortico-nuclear network. Therefore, sets of Purkinje cells may phasically control their own climbing fiber afferents. Here, using *in vitro* and *in vivo* recordings, we describe a genetically modified mouse model that allows the specific optogenetic control of Purkinje cell discharge. Tetrode recordings in the cerebellar nuclei demonstrate that focal stimulations of Purkinje cells strongly inhibit spatially restricted sets of cerebellar nuclear neurons. Strikingly, such stimulations trigger delayed climbing-fiber input signals in the stimulated Purkinje cells. Therefore, our results demonstrate that Purkinje cells phasically control the discharge of their own olivary afferents and thus might participate in the regulation of cerebellar motor learning.