



HAL
open science

Récepteur présynaptique métabotrope du Glutamate de type 4 (mGluR4) : fonctions synaptiques et mécanismes d'action dans le cervelet

Thomas Bessiron

► **To cite this version:**

Thomas Bessiron. Récepteur présynaptique métabotrope du Glutamate de type 4 (mGluR4) : fonctions synaptiques et mécanismes d'action dans le cervelet. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA11T005 . tel-01448759

HAL Id: tel-01448759

<https://theses.hal.science/tel-01448759>

Submitted on 29 Jan 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE : SIGNALISATIONS ET RÉSEAUX INTÉGRATIFS EN BIOLOGIE
Laboratoire de Pharmacologie et biochimie de la synapse

DISCIPLINE : Neurosciences

THÈSE DE DOCTORAT SUR TRAVAUX

soutenue le 28/01/2014

par

Thomas BESSIRON

Récepteur présynaptique métabotrope du
Glutamate de type 4 (mGluR4) : Fonctions
synaptiques et mécanismes d'action dans le
Cervelet

Directeur de thèse :
Co-directeur de thèse :

Hervé Daniel
Heather McLean

Professeur d'Université (Orsay)
Maître de conférences (Orsay)

Composition du jury :

Président du jury :
Rapporteurs :

Marc Le Maire
Laurent Fagni
Thibault Collin
Jean-Vianney Barnier
Pierre Vincent

Professeur d'Université (Orsay)
Directeur de Recherches CNRS (Montpellier)
Professeur d'Université (Paris)
Directeur de Recherches CNRS (Orsay)
Chargé de Recherches (Paris)

Examineurs :

« Ah ! Non ! C'est un peu court, jeune homme ! » Cyrano de Bergerac

Remerciements

Paradoxalement, c'est peut-être la page la moins évidente à rédiger de tout ce « bon gros pavé », ceux qui me connaissent bien savent d'autant plus que je m'exprime bien mieux à travers une guitare (une basse, des synthés ou même une batterie !) qu'avec des mots. Mais assez divagué, c'est parti pour les remerciements !

Je tiens tout d'abord à remercier l'intégralité des membres du Jury, Marc Le Maire, Laurent Fagni, Thibault Collin, Jean-Vianney Barnier et Pierre Vincent, d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse, et ce malgré des délais « plutôt restreints ».

Un grand merci également à Hervé et Heather, pour m'avoir accueilli, formé (ou déformé...difficile à dire !) durant toutes ces années, ainsi que pour votre présence, soutien, et j'en passe, dans des conditions pas toujours idéales et tout cela malgré un emploi du temps bien chargé ! Merci à Mica pour sa bonne humeur omniprésente et ses conseils (qu'ils aient été scientifiques ou pédagogiques), à Romain « les gros bras » (la légende est en marche !) qui je suis sûr terminera sa thèse sans trop de difficultés (en tout cas je te le souhaite !), ainsi qu'à Catherine notamment pour ses conseils lors de l'écriture de cette thèse.

Merci également à la formidable équipe enseignante de Physiologie animale que j'ai eu la chance d'intégrer pendant deux ans en tant que moniteur, c'est-à-dire Heather, Mica et Hervé évidemment, Laurence, et tous les autres moniteurs (Yannick, Cathy, Gaëlle, Fabien, L'imperturbable Quentin, Pierre-Louis (ou Pilou), Steeve (courage, tu pourras bientôt abandonner la coupe afro ! si ce n'est déjà fait à l'heure où j'écris...), Alexandra, Amina, Rémi, et Romain (mais si je commence à citer en double, on ne s'en sortira plus !).

Un gros merci pour les « collègues » comme on dit dans le sud-est (avec une forte accentuation sur le « è » et le « e » final...), ceux et celles qui m'ont supporté depuis le Master (Florence, Claire, Cynthia, Amel (Mémel pour les intimes) et Jéréme notamment), ou en Licence à Marseille (Licia, Camille, Mélanie, Delphine, Damien, Wala), avec qui j'ai passé de supers bons moments et à qui je souhaite bon courage pour la suite (je sais, ça fait « bon sur ce, je me casse, ciao ! » mais ce n'est pas le cas !).

Merci aussi aux docs/post-docs de l'institut, ainsi qu'au « petit groupe » des chimistes, avec qui j'ai passé de bons moments, ceux déjà partis (comme Marion, Samia, Pierre-Christian, et plein d'autres ! Oui j'avoue j'ai un peu la flemme de faire la liste... et d'en oublier certains !) et ceux encore présents (avec une mention spéciale « bon courage ! » (je sais ce n'est pas très original mais j'ai rien de mieux pour le moment...) pour Anne).

Un gros merci également à ma famille pour leur soutien, surtout mes parents, mon frère, et les Génovéfains (j'ai un doute sur l'écriture...) qui m'ont généreusement offert un toit lors de mes premiers mois à la fac d'Orsay ! Merci également à la « maison des Chouettes » pour

ces chouettes (oui ce n'est pas drôle...mais quand même !) moments passés en montagne, à Fontainebleau, ou à Toulouse, musicalement ou non !

Et puis je ne remerciais jamais assez Mathieu & Margaux, et leur inoubliable mariage à New York City (digne de n'importe quel grand film Hollywoodien !), de même que Lauren (Lolotte pour les intimes) et son grain de folie omniprésent.

Si je m'écoutais, je remerciais également la musique... mais remercier quelque chose d'immatériel peut sembler étrange pour la plupart ! Pourtant ceux qui me fréquentent depuis longtemps savent que la musique représente beaucoup pour le musicien que je suis (impossible de passer une journée sans musique dans les oreilles !). Alors je vais remercier tous ceux avec qui j'ai pu partager des moments musicaux (faire un « jam » ou un « bœuf » comme on dit !) qui se reconnaîtront !

Enfin, the last but not the least, un ultra-merci (en fait il n'y a pas de mots assez forts pour ça dans mon vocabulaire... Après tout « Toto, connecting neurones » n'est-ce pas ?!) à Yann, le meilleur osthéo-pathe de Marseille (bientôt de Montréal ?), et Céline, la demoiselle qui murmurait à l'oreille des serpents et autres bizarreries de la nature, pour... pour tant de choses ! C'est juste impossible de nommer tous ces moments passés ensemble, tous ces délires, ces challenges gastronomiques (notamment la fameuse raclette pour 4 personnes... à 2 !), qui durent depuis le lycée et qui ne sont pas près de s'arrêter, peu importe où le vent nous portera (que ce soit à Montréal, à Tokyo, ou à Nouméa !).

Allez hop, trêve de bavardages, c'est parti pour les choses sérieuses !

Table des matières

Index des illustrations	6
Index des tableaux	7
Liste des abréviations	8
Introduction	11
I - Introduction générale.....	11
II - Le cortex cérébelleux	14
1. Le cervelet comme modèle d'étude des récepteurs mGluR4	14
1.1. Architecture globale du cervelet	14
1.2. Afférences et Efférences	15
1.2.1. Afférences du cervelet	15
1.2.2. Efférences du cervelet	16
2. Organisation Anatomo-fonctionnelle du cortex cérébelleux	17
3. Les différentes connexions au sein du cortex cérébelleux	20
3.1. Les synapses excitatrices	20
3.1.1. Les Fibres Grimpantes	20
3.1.2. Les Fibres Moussues	21
3.1.3. Les Fibres Parallèles	21
3.1.3.1. Les récepteurs ionotropiques au glutamate présents dans les boutons synaptiques des fibres parallèles	22
3.1.3.2. La régulation de la transmission glutamatergique par des récepteurs métabotropiques au sein des boutons synaptiques des fibres parallèles	23
a) Les récepteurs CB ₁	23
b) Les récepteurs A ₁	24
c) Les récepteurs GABA	24
d) Les mGluRs du groupe III	24
3.2. Les synapses inhibitrices	25
III - Les cellules de Purkinje	25
1. Morphologie.....	26
2. Les réponses glutamatergiques	26
2.1. Les réponses complexes	26
2.2. Les réponses simples	27
IV - Les interneurons de la couche moléculaire (ICM)	27
1. Développement	28
2. Morphologie	28
3. Les courants glutamatergiques dans les ICM	29
4. Activité physiologique	30
5. La plasticité à la synapse fibre parallèle – Interneurone de la couche Moléculaire	31
V - L'exocytose	31
1. Les différents types d'exocytose	31
2. Les microdomaines et nanodomaines calciques	32
3. Les différentes protéines impliquées	34
4. Dynamique de l'exocytose	37

VI - Les récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluRs)	39
1. Classification des mGluRs	39
2. Localisation et fonctions synaptiques des mGluRs	39
2.1. Les mGluRs du groupe I	39
2.2. Les mGluRs du groupe II	40
2.3. Les mGluRs du groupe III	40
VII - Les récepteurs mGluR ₄	43
1. Structure	43
2. Pharmacologie	44
3. Partenaires protéiques	46
4. Rôles fonctionnels connus	51
5. Hypothèses de travail	52
Matériels et Méthodes	55
I - Animaux.....	55
II - Préparation des tranches	55
1. Solutions extracellulaires utilisées	55
2. Réalisation des tranches	56
III - Patch-Clamp	57
1. Technique utilisée	57
2. Stimulation extracellulaire des Fibres Parallèles pour l'obtention de réponses évoquées au sein des cellules de Purkinje et des ICM	60
3. La Facilitation appariée (Paired-Pulse Facilitation, PPF)	61
4. Propriétés des réponses évoquées enregistrées aux synapses Fibre parallèle – cellule de Purkinje et Fibre parallèle - ICM	63
5. Mesure des Courants PostSynaptiques Excitateurs miniatures (mEPSCs)	64
6. Analyse des données électrophysiologiques	65
IV - Les peptides TAT	66
V - Fluorométrie Calcique	68
1. Technique utilisée	68
2. Analyse des données Optiques	71
Résultats	75
I - Caractérisation pharmacologique de nouveaux agonistes orthostériques des récepteurs mGluR ₄	75
1. Introduction	75
2. Identification de nouveaux agonistes potentiellement sélectifs des récepteurs mGluR ₄	75
2.1. Le LSP1-2111, un candidat prometteur ?	76
2.2. Activité pharmacologique du LSP1-2111	76
2.3. Le LSP4-2022.....	127
2.3.1. Affinité du LSP4-2022 pour les récepteurs mGluR ₄	127
2.3.2. Identification du site de fixation du LSP4-2022 sur les récepteurs mGluR ₄	127
2.3.3. Enregistrements par Patch-Clamp des réponses excitatrices des cellules de Purkinje évoquées par stimulation des fibres parallèles	128
2.3.4. Étude de l'activité <i>in vivo</i> du LSP4-2022 à l'aide d'un modèle murin pour la maladie de Parkinson	128

II - Identification des mécanismes moléculaires sous-tendant l'effet inhibiteur des récepteurs mGluR ₄ sur les influx calciques présynaptiques à la synapse fibre parallèle – cellule de Purkinje	142
1. Introduction	142
2. Pour une inhibition directe ou indirecte des canaux calciques ?	142
2.1. Implication des canaux potassiques	142
2.2. Implication des canaux calciques	143
3. Implication d'une voie G _{i/o} / PKA dépendante ?	144
4. Implication des MAPKinases et /ou de la PI ₃ Kinase ?	145
5. La voie PLC/PKC, une voie « non canonique »	145
III - Étude des mécanismes d'action des récepteurs mGluR ₄ à la synapse fibre parallèle – ICM ...	165
1. Introduction	165
2. Confirmation de la présence de récepteurs mGluR ₄ fonctionnels à la synapse fibre parallèle – interneurone de la couche moléculaire	165
3. Etude de l'implication potentielle d'une voie Gq/PLC-dépendante	167
4. Influence de l'activation des récepteurs mGluR ₄ sur le taux d'échecs à la neurotransmission	167
5. Influence du Calcium sur les mécanismes d'action des récepteurs mGluR ₄	168
6. Effet du blocage des interactions putatives entre les récepteurs mGluR ₄ et ses différents partenaires protéiques	169
Discussion	196
I - Importance du développement de nouveaux outils pharmacologiques sélectifs pour les récepteurs mGluR ₄	196
II - Les récepteurs mGluR ₄ du cortex cérébelleux : des mécanismes de transduction non canoniques au sein des boutons synaptiques des fibres parallèles	197
III - Implications fonctionnelles des interactions entre mGluR ₄ et ses divers partenaires protéiques	200
IV - L'exocytose : importance des lipides membranaires et influence potentielle des récepteurs mGluR ₄	202
V - Le rôle des récepteurs mGluR ₄ dans le réseau neuronal du cortex cérébelleux.....	204
VI - Conclusion générale	205

Index des illustrations

Figure 1. Expression des récepteurs mGluR ₄ au sein de différentes structures du système nerveux central	14
Figure 2. Afférences et efférences cérébelleuses chez le rat	15
Figure 3. Représentation schématique simplifiée du cortex cérébelleux	17
Figure 4. Représentation schématique des microzones cérébelleuses	18
Figure 5. Le Module cérébelleux, unité fonctionnelle du cervelet	19
Figure 6. Représentation schématique des synapses « en passant » dans le cortex cérébelleux	22
Figure 7. Représentation schématique simplifiée des différents récepteurs métabotropiques connus pour diminuer la libération de glutamate au niveau des « boutons synaptiques » des fibres parallèles	23
Figure 8. Photographie d'une cellule de Purkinje marquée à la GFP en microscopie confocale	26
Figure 9. Photographies d'une cellule en panier et d'une cellule étoilée après marquage à la neurobiotine	28
Figure 10. Représentation schématique du nano-environnement protéique des canaux calciques Ca _v 2 au niveau de la présynapse	33
Figure 11. La structure tridimensionnelle du complexe SNARE	35
Figure 12. Mécanismes d'action de Munc18-1 sur le complexe SNARE	36
Figure 13. Représentation schématique des différentes étapes de l'exocytose	38
Figure 14. Immunomarquage des récepteurs mGluR ₄ au sein de la couche moléculaire du cortex cérébelleux	40
Figure 15. modélisation du domaine VFT des récepteurs mGluR ₄ à partir de la structure de protéines bactériennes	43
Figure 16. Structure cristallographique des récepteurs mGluR ₇ sous forme homodimérique	44
Figure 17. les principaux partenaires protéiques des récepteurs mGluR ₄ impliqués dans les processus d'exocytose et de trafficking, identifiés par co-immunoprécipitation avec utilisation d'anticorps dirigés contre mGluR ₄	50
Figure 18. Dynamique de l'interaction calcium-dépendante mGluR ₄ /Munc18-1	51
Figure 19. La technique de Patch-Clamp (passage en configuration « Cellule-entière »)	58
Figure 20. Dispositif expérimental utilisé lors des enregistrements électrophysiologiques	60
Figure 21. Représentation schématique de la technique de patch-clamp appliquée à des préparations in vitro de cervelet (tranches)	61
Figure 22. La facilitation appariée (PPF)	62
Figure 23. Exemples de réponses évoquées aux synapses Fibre Parallèle – Interneurones de la Couche Moléculaire et Fibre Parallèle – Cellule de Purkinje, et illustration du phénomène d'échecs à la neurotransmission	64
Figure 24. Les peptides TAT utilisés pour bloquer les interactions mGluR ₄ /protéines impliquées dans les processus d'exocytose	67
Figure 25. Principe de la dé-estérification des fluorochromes-AM	68
Figure 26. Marquage des Fibres Parallèles par le Fluo-4FF-AM	69
Figure 27. Montage expérimental utilisé lors des enregistrements optiques par fluorométrie	71
Figure 28. Conséquence de l'activation pharmacologique des récepteurs mGluR ₄ aux synapses fibres parallèles – interneurones de la couche moléculaire sur l'amplitude des réponses postsynaptiques, la PPF, et sur le taux d'échecs à la neurotransmission.	166

Figure 29. Cascade de signalisation hypothétique menant à l'inhibition des canaux calciques voltage-dépendants présynaptiques par les récepteurs mGluR ₄	199
Figure 30. Influence des lipides dans les processus d'exocytose	203
Figure 31. Représentation schématique de la dynamique de l'interaction hypothétique entre les récepteurs mGluR ₄ et la Phospholipase D1.....	204

Index des tableaux

Table 1. Les différents types de canaux calciques impliqués dans les processus d'exocytose au sein du Système Nerveux Central	33
Table 2. Liste non exhaustive des principales protéines impliquées dans les processus d'exocytose .	34
Table 3. Tableau non exhaustif récapitulatif de la localisation synaptique, des effecteurs principaux ainsi que du rôle fonctionnel des différents groupes de mGluR	42
Table 4. Tableau non exhaustif récapitulatif des outils pharmacologiques relatifs aux différents mGluRs	46
Table 5. Liste des partenaires protéiques des récepteurs mGluR ₄ connus à ce jour	48
Table 6. Composition du Ringer	56
Table 7. Affinité du LSP4-2022 pour les différents sous-types de mGluRs du groupe III après couplage à des protéines Gq chimériques (cellules HEK293) ou des protéines Gi/o endogènes (cellules tsA-201).....	127

Liste des abréviations

AMPc : Adénosine Mono-Phosphate cyclique

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

BRET : Bioluminescence Resonance Energy Transfer

CP : Cellule de Purkinje

DAG : diacylglycérol

D-APV : D-2-Amino-5-PhosphoValerate

EPSC : Courant postsynaptique excitateur

FP : Fibre Parallèle

FRET : Förster/Fluorescence Resonance Energy Transfer

GABA : Acide gamma-aminobutyrique

Canal **GIRK** : Canal potassique à rectification entrante couplé aux protéines G

GTP : Guanosine Tri-Phosphate

ICM : Interneurone de la couche moléculaire

IP₃ : Inositol 1,4,5-trisphosphate

L-AP4 : Acide L-(+)-2-Amino-4-phosphonobutyrique

LCRA : Liquide céphalorachidien artificiel

MAP Kinase : Mitogen-Activated Protein Kinase

mEPSC : Courant postsynaptique excitateur miniature

MSOP : (*RS*)- α -Methylserine-*O*-phosphate

NCX : Échangeur Sodium-Calcium

PAM : Modulateur allostérique positif

PHCCC : *N*-Phenyl-7-(hydroxyimino)cyclopropa[*b*]chromen-1a-carboxamide

PI₃Kinase : Phosphoinositide 3-Kinase

PIP₂ : Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate

PIP₃ : Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate

PKA : Protéine Kinase A

PKC : Protéine Kinase C

PLA : Proximity Ligation Assay

PLC : Phospholipase C

PPF : Facilitation appariée (Paired-Pulse Facilitation)

PPR : Paired-Pulse Ratio

PTX : Toxine pertussique

SEM : Erreur standard à la moyenne

SNARE : Soluble NSF Attachment protein REceptor

TAT (Peptide): Peptide Trans-Activateur de Transcription

TEA : Tetraéthylammonium

TTX : Tétrodotoxine

VFT (Domaine) : Domaine « Venus Fly Trap »

Introduction

I - Introduction générale

Le glutamate, neurotransmetteur majoritaire du système nerveux central des mammifères, est un acteur important de la communication neuronale, et par extension du fonctionnement cérébral. Au sein du système nerveux, les différents systèmes de neurotransmission, qui interagissent entre eux, subissent des changements constants tout au long de la vie. On parle alors de plasticité. Ces changements transitoires, à court ou à long terme, sont nécessaires au maintien d'un équilibre requis pour optimiser le fonctionnement de ces systèmes selon l'environnement, qui évolue constamment. La perte de cet équilibre est à l'origine de nombreuses pathologies, justifiant alors l'existence d'un grand nombre de mécanismes de régulation différents. La compréhension de ces derniers apporte donc non seulement de meilleures connaissances quant au fonctionnement du cerveau sain, mais joue également un rôle crucial dans le traitement des pathologies associées.

Le glutamate peut être libéré dans la fente synaptique par exocytose (on parle de libération orthograde) suite à l'arrivée de potentiels d'action dans les terminaisons présynaptiques (ainsi appelée exocytose évoquée), ou même indépendamment de la genèse de potentiels d'action (dans le cas d'une libération dite spontanée), mais il peut également être libéré à partir des dendrites des neurones postsynaptiques (on parle alors de libération rétrograde). Une fois présent dans la fente synaptique, il peut agir sur des récepteurs situés sur le versant postsynaptique, à savoir les épines dendritiques de la cellule réceptrice, mais également sur le versant présynaptique, à savoir les terminaisons axonales de la cellule émettrice.

Il existe 2 types de récepteurs généralement associés à deux aspects différents de la neurotransmission : les récepteurs ionotropiques et métabotropiques. Les récepteurs ionotropiques (ou récepteurs canaux) au glutamate sont majoritairement postsynaptiques. L'activation de ceux-ci permet la genèse de réponses excitatrices (essentiellement dues à une entrée d'ions sodium, et/ou de calcium pour certains d'entre eux) dans la cellule cible, ce qui les rend en grande partie responsables de la transmission du message neuronal, dénommée neurotransmission rapide. Bien qu'étant plutôt associés à la régulation de cette neurotransmission rapide de façon positive (augmentation de l'efficacité synaptique) ou négative (diminution de la libération de glutamate), les rôles des récepteurs métabotropiques au glutamate sont multiples (Nicoletti *et al.*, 2011).

Les récepteurs métabotropiques au glutamate, comprenant huit membres (mGluR1-8) répartis en trois groupes (mGluR₁ et mGluR₅ composant le groupe I, mGluR₂ et mGluR₃ le groupe II, mGluR₄ ainsi que les mGluR₆ à mGluR₈ composant le groupe III), peuvent être localisés sur le versant présynaptique ou postsynaptique. Ils ne sont activés, pour les auto-récepteurs présynaptiques, que dans des conditions particulières, comme par exemple lors d'une forte augmentation de la concentration en glutamate dans la fente synaptique, phénomène rencontré lors d'une libération massive de glutamate entraînant une saturation des systèmes de recapture de ce glutamate ambiant (Scanziani *et al.*, 1997). Par ailleurs, les

récepteurs métabotropiques au glutamate, contrairement aux récepteurs ionotropiques, peuvent être retrouvés dans des synapses autres que glutamatergiques, telles les synapses inhibitrices GABAergiques, qui sont ainsi influencées par le glutamate qui a pu diffuser hors de sa synapse d'origine, suite à une activation prolongée de celle-ci (Glitsch *et al.*, 1996 ; Morishita *et al.*, 1998 ; Doi *et al.*, 2002).

Au sein du laboratoire, nous étudions les mécanismes mis en jeu lors de l'activation des récepteurs présynaptiques métabotropiques au glutamate du groupe III, et plus précisément des récepteurs mGluR₄, dans le cadre du contrôle présynaptique de la neurotransmission glutamatergique au sein du cortex cérébelleux.

Définir le rôle du cervelet n'est pas chose aisée. En effet, si le rôle du cervelet dans des processus moteurs est reconnu depuis plusieurs décennies (Ito, 1984 ; Kheradmand & Zee, 2011), nombre d'études récentes lui associent également des fonctions cognitives (Strick *et al.*, 2009 ; Ide & Li, 2011). La palette de processus moteurs réalisés au sein du cervelet est très variée : coordination des mouvements (c'est-à-dire la capacité à corriger les mouvements pendant leur réalisation pour correspondre au mieux à la séquence motrice planifiée au sein du cortex pré-moteur) (Thach *et al.*, 1992), maintien de la posture corporelle, apprentissage moteur (Llinas & Welsh, 1993). Par ailleurs, le cervelet afférente également certaines régions des cortex préfrontal et pariétal (Schahmann & Pandya, 1995 ; Clower *et al.*, 2001 ; Middleton & Strick, 2001), ainsi, l'activité cérébelleuse pourrait influencer divers processus cognitifs tels que le langage (De Smet *et al.*, 2013), la mémoire de travail (Chen & Desmond, 2005), les processus émotionnels, ou même l'attention (Pour revue, voir Strick *et al.*, 2009).

Ces différents rôles nécessitent des modifications plus ou moins durables de l'efficacité synaptique d'une partie du réseau neuronal cérébelleux (Ito, 2005).

Le cortex cérébelleux a été le siège de nombreuses études portant sur différents récepteurs métabotropiques dont les récepteurs A₁ à l'adénosine (Kocsis *et al.*, 1984), CB₁ aux endocannabinoïdes (Lévénez *et al.*, 1998), et les récepteurs au glutamate (mGluRs). Il a notamment été montré, grâce à des techniques électrophysiologiques, que l'activation de la plupart de ces récepteurs, à savoir les mGluRs du groupe II (c'est-à-dire mGluR₂ et mGluR₃, présents au niveau de la synapse fibre grimpante – cellule de Purkinje (Hashimoto & Kano, 1998)) et du groupe III (Neale *et al.*, 2001) (les récepteurs mGluR₄ étant les seuls mGluRs du groupe III fonctionnels sur les terminaisons des fibres parallèles (Abitbol *et al.*, 2008)), déprime les réponses postsynaptiques excitatrices glutamatergiques en diminuant la libération de glutamate. En ce qui concerne les mGluRs du groupe III, cette diminution de libération de glutamate résulte en partie de l'inhibition des influx calciques présynaptiques (Dittman & Regehr, 1996 ; Daniel & Crepel, 2001), requis lors de l'initiation des processus d'exocytose.

Lorsque j'ai débuté ma thèse, le seul agoniste pharmacologique dont nous disposions pour activer ces récepteurs était un agoniste à large spectre des mGluRs du groupe III : le L-AP4 (acide L-2-amino-4-phosphonobutanoïque). Dans le cadre d'une collaboration avec les groupes de Jean-Philippe Pin (Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier) et de Francine Acher (Laboratoire de Chimie et Biologie Pharmacologiques et Toxicologiques, Université Paris Descartes, Paris), j'ai tout d'abord cherché à caractériser pharmacologiquement 2 nouveaux agonistes orthostériques (c'est-à-dire se fixant sur le même site que le ligand endogène, à savoir le glutamate) potentiellement plus spécifiques pour les récepteurs mGluR4 : le LSP1-2111 (Selvam *et al.*, en révision) et le LSP4-2022 (Goudet *et al.*, 2012).

Ces études princeps de mon travail de thèse ont été principalement menées à la synapse Fibre Parallèle – Cellule de Purkinje (cellule principale du cortex cérébelleux), mais les fibres parallèles forment également des synapses avec les interneurons situés dans la couche la plus externe du cortex cérébelleux : la couche moléculaire. Ces interneurons inhibiteurs permettent de réguler très finement l'activité des cellules de Purkinje, dont l'axone constitue la seule voie de sortie du cortex cérébelleux. Nous nous sommes donc demandé si les récepteurs mGluR₄ étaient également présents aux synapses Fibre Parallèle – Interneurones de la Couche Moléculaire. Pour ce faire, j'ai mené une étude fonctionnelle à l'aide des nouveaux outils pharmacologiques, et à l'aide des agonistes déjà largement validés.

Je me suis ensuite plus particulièrement intéressé aux mécanismes moléculaires mis en jeu dans la présynapse fibre parallèle – interneurone de la couche moléculaire lors de l'activation des récepteurs mGluR₄. En s'intéressant aux propriétés singulières de ces synapses, nous avons émis l'hypothèse que les mécanismes présynaptiques mGluR₄-dépendants, inhibiteurs de la neurotransmission pourraient mettre en jeu des interactions entre les protéines présynaptiques, indépendamment de la dépression des influx calciques dans les présynapses (Daniel & Crepel, 2001 ; Abitbol *et al.*, 2008). En effet, les études protéomiques menées au sein du laboratoire, portant sur le « réceptosome » de ces récepteurs, ont permis de révéler un grand nombre des partenaires protéiques des mGluR₄. Parmi ceux-ci, nombre de protéines présynaptiques impliquées dans les processus d'exocytose (Munc 18-1, Synapsine 1, SNAP-25,...), ont été identifiées (Ramos *et al.*, 2012). La majeure partie de mon travail de thèse a été consacrée à la recherche de l'existence d'une interaction fonctionnelle putative entre les parties intracellulaires des récepteurs mGluR₄ natifs et des protéines de la présynapse. Nous avons fait l'hypothèse que ces interactions, en parallèle des mécanismes présynaptiques dépendants du calcium, pourraient rendre compte de l'action inhibitrice des récepteurs mGluR₄ aux synapses Fibres parallèles – Interneurones de la couche Moléculaire.

II – Le cortex cérébelleux

1. Le cervelet comme modèle d'étude des récepteurs mGluR₄

Les récepteurs mGluR₄ ont une distribution ubiquiste dans de nombreuses structures du système nerveux central. Cependant, l'une d'entre elle se distingue de toutes les autres de par son haut niveau d'expression de ces récepteurs : il s'agit du Cervelet (Corti et *al.*, 2002 ; Figure 1). Nous avons donc décidé d'utiliser le cervelet comme modèle d'étude des récepteurs mGluR₄ natifs, et plus particulièrement le cortex cérébelleux.

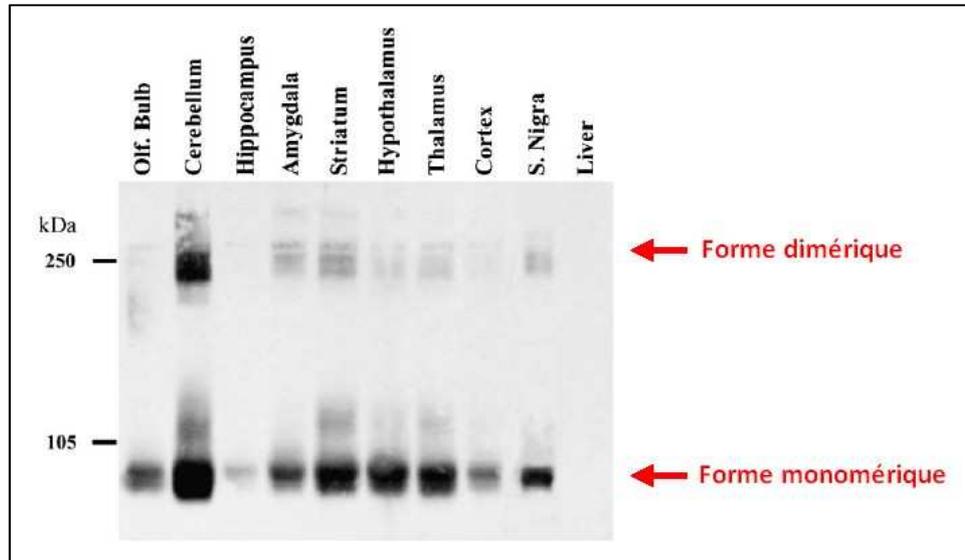


Figure 1. D'après Corti et *al.*, 2002 : Expression des récepteurs mGluR₄ au sein de différentes structures du système nerveux central.

1.1. Architecture globale du cervelet

Le Cervelet présente une organisation architectonique très structurée : zone corticale supérieure superficielle recouvrant un ensemble de noyaux profonds (Dentelés, Interposés, et Fastigiaux). D'un point de vue phylogénétique on peut distinguer un archéocervelet (le lobe flocculo-nodulaire), un paléocervelet (le vermis) et un néocervelet (les hémisphères cérébelleux latéraux). Les pédoncules cérébelleux constituent les seules voies de communication entre le cervelet et le reste du système nerveux central. Les pédoncules supérieur, moyen et inférieur sont reliés respectivement au mésencéphale, au pont de Varole, et au bulbe rachidien.

1.2. Afférences et Efférences

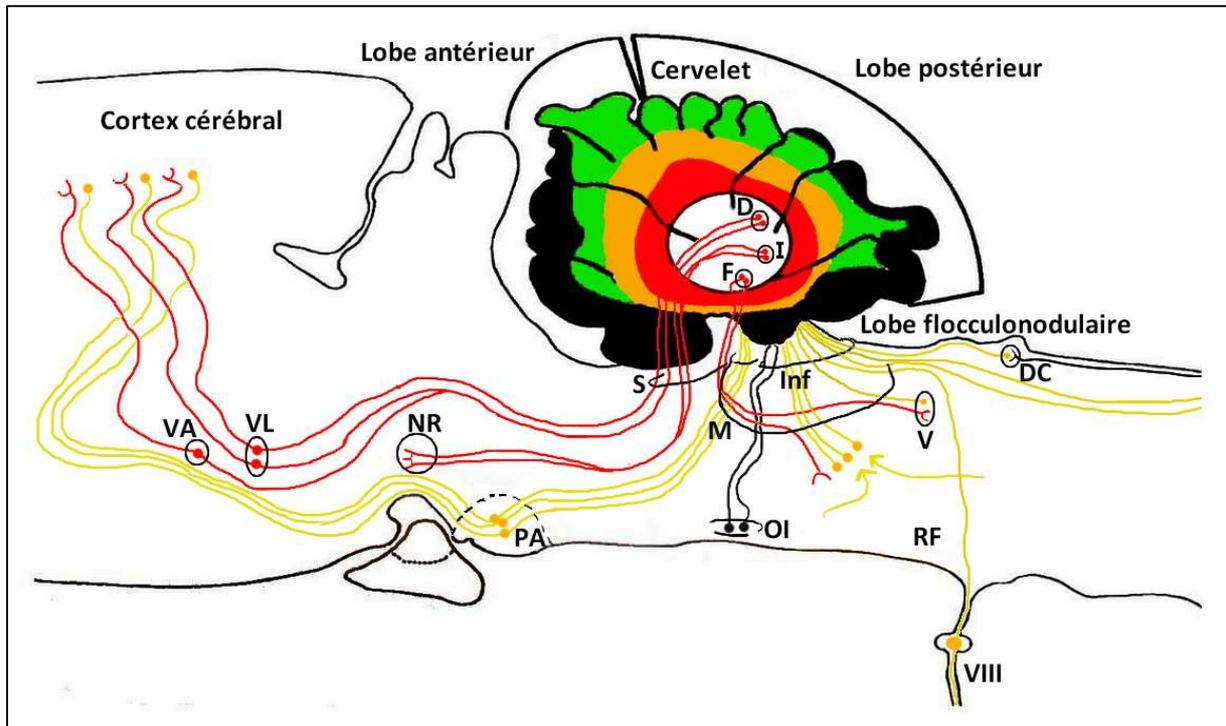


Figure 2. D'après Palay & Chan-Palay, 1974 : Afférences (jaune et gris) et efférences (rouge) cérébelleuses chez le rat.

D : noyau dentelé ; **I :** noyau interposé ; **F :** noyau fastigial ; **Inf :** pédoncule cérébelleux inférieur ; **M :** pédoncule cérébelleux moyen ; **S :** pédoncule cérébelleux supérieur ; **DC :** noyau dorsal de Clarke ; **NR :** noyau rouge ; **PA :** protubérance annulaire (noyaux du pont) ; **OI :** olive inférieure ; **RF :** formation réticulée ; **V :** noyaux vestibulaires ; **VA :** noyau ventro-antérieur du thalamus ; **VL :** noyau ventro-latéral du thalamus. **VIII :** fibres du nerf vestibulocochléaire.

1.2.1. Afférences du cervelet

Les afférences, essentiellement glutamatergiques (représentées en jaune sur la figure 1), proviennent majoritairement du cortex moteur primaire et pré-moteur, des cortex somesthésiques primaire et secondaire ainsi que des aires visuelles secondaires. La plupart d'entre elles établissent un relai dans les noyaux du pont. Il existe également d'autres afférences transportant des informations proprioceptives, en provenance du noyau dorsal de Clarke situé dans la moelle épinière, et des informations sensorielles (fibres du nerf vestibulocochléaire, noyaux vestibulaires). L'ensemble de ces afférences, ainsi que des collatérales en provenance des noyaux cérébelleux profonds, sont regroupées sous le nom de Fibres Moussues, et constituent l'une des deux voies d'entrée du cortex cérébelleux.

La seconde voie projetant au sein du cortex cérébelleux provient de l'olive inférieure du bulbe rachidien : il s'agit des fibres grimpantes (représentées en gris sur la figure 1). Le rôle prépondérant de l'olive inférieure du bulbe rachidien décrit à ce jour, est la détection d'erreurs entre la planification d'un mouvement et sa réalisation. Chaque signal d'erreur

généralisé au sein de ce noyau olivaire inférieur, résultant de l'intégration d'informations en provenance des systèmes sensoriels et moteurs, est envoyé au cortex cérébelleux par le biais des fibres grimpantes (Ito, 2013), afin qu'une commande motrice corrigée de cette erreur soit émise.

Enfin, certaines afférences proviennent également des noyaux du locus coeruleus (Noradrénergique) et du raphé (Sérotoninergique) (Ito, 1984) (non représentés sur la figure 1). Ces afférences permettent de moduler l'activité des cellules de Purkinje de façon indirecte en potentialisant les réponses inhibitrices des interneurons de la couche moléculaire (Mitoma & Konishi, 1999).

Toutes ces afférences pénètrent dans le cervelet par les pédoncules moyen et inférieur.

1.2.2. Efférences du cervelet

La grande majorité des voies efférentes du cervelet (représentées en rouge sur la figure 1) empruntent le pédoncule supérieur, bien que certaines d'entre elles traversent également le pédoncule inférieur. On recense trois voies principales prenant leur origine au niveau de 3 zones distinctes du cortex cérébelleux :

- La première est issue de la partie latérale des hémisphères latéraux. Elle projette au niveau du cortex cérébral, plus précisément au sein du cortex moteur et pré-moteur, après avoir établi un premier relai dans le noyau dentelé, puis un second relai au niveau des noyaux ventro-latéral et ventro-antérieur du thalamus. Cette voie est impliquée dans le contrôle des comportements moteurs volontaires.
- La seconde prend son origine au niveau des zones paravermiennes. Cette voie envoie des projections au niveau du cortex cérébral, de certaines structures médianes du thalamus, des noyaux gris centraux, du noyau rouge, et de la formation réticulée rostrale, après avoir établi un premier relai au sein du noyau interposé, puis un second dans les noyaux ventro-latéral et ventro-antérieur du thalamus. Cette voie serait impliquée dans la coordination de la contraction des muscles distaux (mains et doigts) agonistes et antagonistes.
- Enfin, la dernière voie est issue du vermis, et projette dans les noyaux vestibulaires, les régions bulbaires et la formation réticulée après avoir établi un relai dans le noyau fastigial. Elle est surtout impliquée dans le contrôle de la posture.

2. Organisation Anatomico-fonctionnelle du cortex cérébelleux

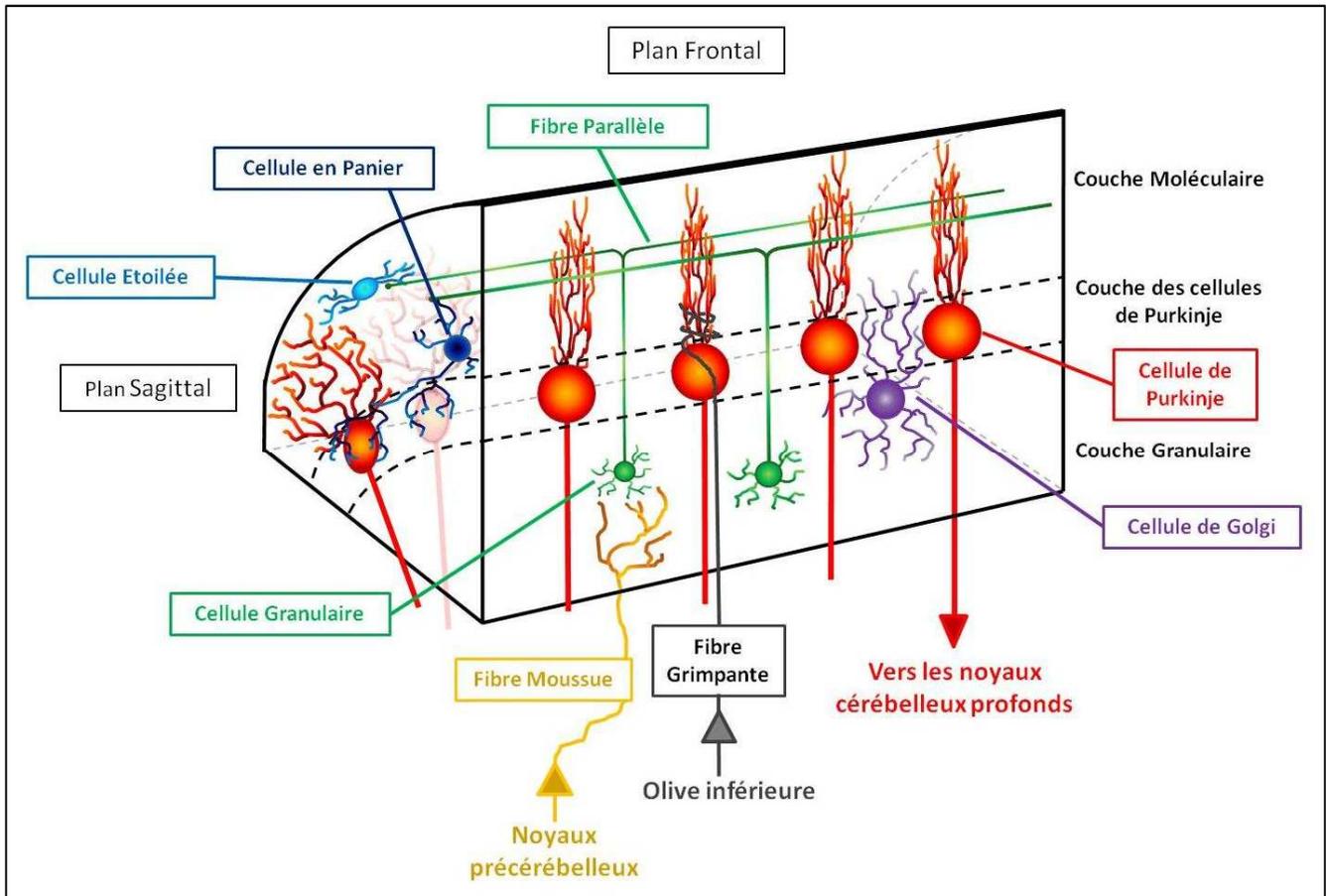


Figure 3. Représentation schématique simplifiée du cortex cérébelleux.

Le cortex cérébelleux (Figure 3) est un archicortex, c'est-à-dire un cortex comportant 3 couches, contrairement au cortex cérébral qui lui est un néocortex comportant 6 couches.

La couche la plus interne, dénommée couche granulaire, doit son nom à la présence de très nombreuses cellules de petite taille : les cellules granulaires, dont le nombre total dépasse le nombre de neurones du cortex cérébral (Napper & Harvey, 1988). Ces cellules possèdent un diamètre de 4 à 6 μm et sont afférentées par les fibres moussues, qui apportent de nombreuses informations sensori-motrices au cortex cérébelleux. Les synapses entre les fibres moussues et cellules granulaires sont entourées par des interneurons inhibiteurs, les cellules de Golgi, et forment des structures appelées glomérules cérébelleux (Castejon & Caraballo, 1980). D'autres types d'interneurones inhibiteurs sont également présents dans la couche granulaire : il s'agit des cellules fusiformes de Lugaro et des cellules unipolaires en brosse. Enfin, on retrouve également au sein de cette couche, les axones des cellules de Purkinje, ainsi que les fibres grimpantes.

La seconde couche du cortex cérébelleux est constituée d'une monocouche composée principalement des corps cellulaires des cellules de Purkinje. L'axone de ces cellules représente l'unique voie de sortie du cortex cérébelleux.

Enfin, la troisième couche, la plus externe, est dénommée couche moléculaire. Elle comprend entre autres, l'arbre dendritique des cellules de Purkinje, les interneurons de la couche moléculaire (ICM), interneurons inhibiteurs GABAergiques, que sont les cellules étoilées et les cellules en panier, ainsi que les axones des cellules granulaires bifurquant pour former les fibres parallèles.

Le cortex cérébelleux est une structure remarquablement « régulière » : les fibres parallèles s'étendent sur plusieurs millimètres de long dans le plan coronal, tandis que l'arbre dendritique des cellules de Purkinje ainsi que des interneurons de la couche moléculaire se développe dans le plan sagittal, et ce à travers l'intégralité de ce cortex.

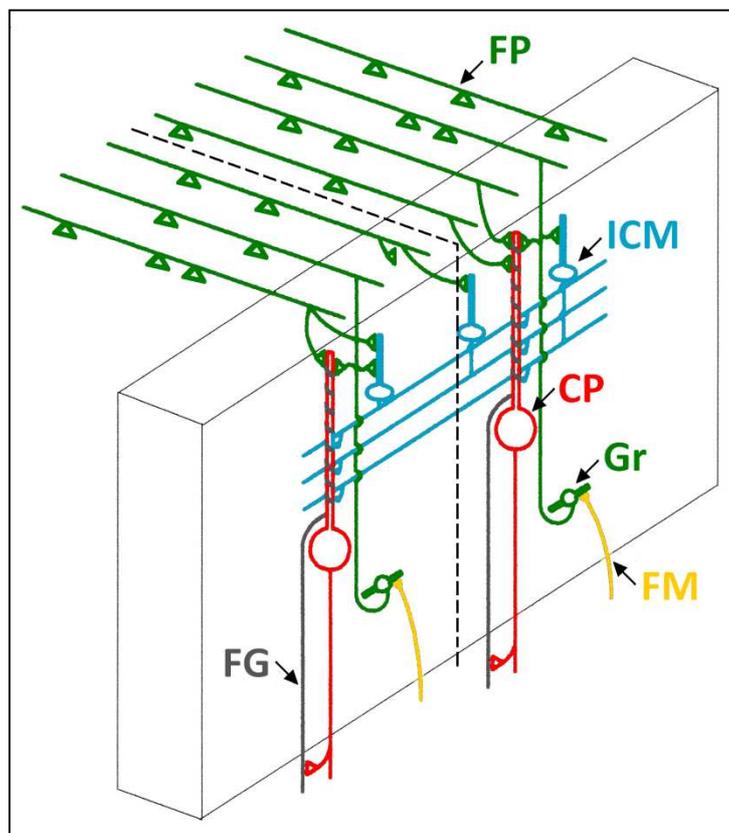


Figure 4. D'après Kenyon, 1997 : Représentation schématique des microzones cérébelleuses.

FP : fibre parallèle ; **ICM :** interneurone de la couche moléculaire ; **CP :** cellule de Purkinje ; **Gr :** cellule granulaire ; **FM :** fibre moussue ; **FG :** fibre grimpante

Cependant, d'un point de vue fonctionnel, ce cortex peut être subdivisé en un grand nombre de régions élémentaires, appelés microzones (Andersson & Oscarsson, 1978 ; Figure 4). Celles-ci consistent en une bande parasagittale de cellules de Purkinje d'environ 200 µm de largeur recevant des afférences de fibres grimpantes provenant de la même région de

l'olive inférieure bulbaire, et projetant sur une même population de neurones au sein des noyaux cérébelleux profonds. Il peut également exister une certaine redondance entre différentes microzones situées à distance, c'est-à-dire que plusieurs d'entre elles peuvent cibler les mêmes populations neuronales et avoir des propriétés similaires.

L'ensemble des neurones d'une microzone corticale, les neurones des noyaux cérébelleux profonds afférents par ces neurones corticaux et les faisceaux des fibres grimpantes et fibres moussues afférents associés, forment un « module cérébelleux », unité fonctionnelle du cervelet (Figure 5). L'implication physiologique de ces modules n'a été que peu étudiée jusqu'à ce jour, mais il a récemment été démontré que la plupart des modules cérébelleux semblent être individuellement affectés au contrôle moteur d'une paire de muscles antagonistes (Ruigrok, 2011).

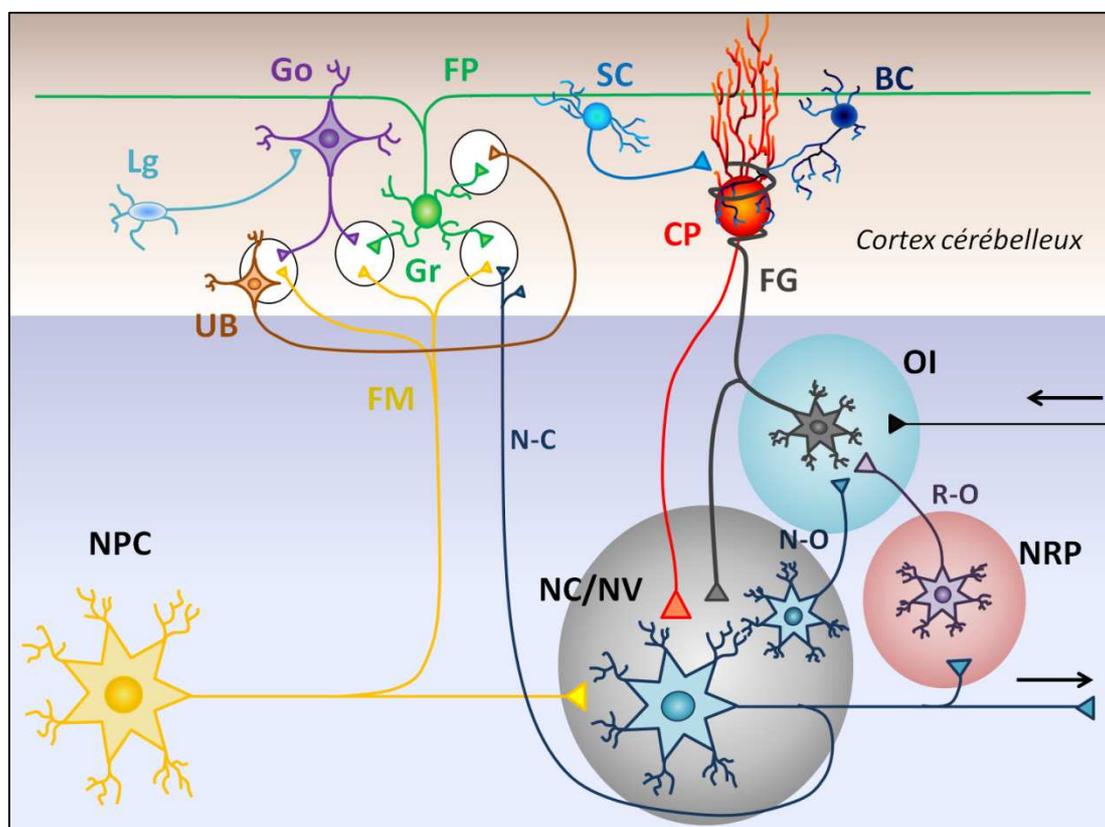


Figure 5. D'après Ito, 2008 : Le Module cérébelleux, unité fonctionnelle du cervelet.

FP : fibre parallèle ; **FG** : fibre grimpante ; **FM** : fibre moussue ; **BC** : cellule en panier ; **Go** : cellule de Golgi ; **Gr** : cellule granulaire ; **CP** : cellule de Purkinje ; **SC** : cellule étoilée ; **UB** : cellule unipolaire en brosse ; **Lg** : cellule de Lugaro ; **OI** : olive inférieure ; **NC/NV** : noyau cérébelleux/vestibulaire ; **PCN** : noyau pré-cérébelleux ; **NRP** : noyau rouge parvocellulaire ; **N-C** : projection nucleo-corticale ; **N-O** : projection nucleo-olivaire ; **R-O** : projection rubro-olivaire

3. Les différentes connexions au sein du cortex cérébelleux

3.1. Les synapses excitatrices

Au sein du cortex cérébelleux, on recense au moins six types de synapses excitatrices, dont le neurotransmetteur est le glutamate.

Les fibres grimpantes en provenance de l'olive inférieure du bulbe rachidien forment de multiples synapses glutamatergiques avec la partie proximale de l'arbre dendritique des cellules de Purkinje.

Les fibres moussues, quant à elles, établissent des synapses excitatrices avec les cellules granulaires d'une part, et les cellules unipolaires en brosse d'autre part.

Enfin, les fibres parallèles forment de nombreuses synapses « en passant » glutamatergiques non seulement avec les cellules de Purkinje, mais également avec les cellules de Golgi, et les interneurons de la couche moléculaire (cellules en panier et cellules étoilées). La majorité des études concernant l'étude des récepteurs mGluR₄ dans le cortex cérébelleux ayant été réalisée à la synapse fibre parallèle - cellule de Purkinje, peu de choses étaient connues sur une éventuelle implication de ces récepteurs à la synapse fibre parallèle - interneurone de la couche moléculaire, lorsque mon travail de thèse a débuté.

3.1.1. Les Fibres Grimpantes

Les fibres grimpantes peuvent contacter jusqu'à 10 cellules de Purkinje différentes, chacune de ces cellules n'étant innervée, chez l'adulte, que par une seule fibre grimpante (Crepel *et al.*, 1976). Ces fibres s'enroulent le long du tronc dendritique primaire des cellules de Purkinje, pour finalement « grimper » le long des dendrites proximales, avec lesquelles elles établissent plusieurs centaines de synapses (Voogd & Glickstein, 1998). Ainsi, compte-tenu du nombre très important de synapses, la stimulation d'une fibre grimpante génère des réponses postsynaptiques de forte amplitude et de type « tout ou rien » dans les cellules de Purkinje.

Ces fibres possèdent une faible fréquence de décharge basale, proche de 1 Hz, pouvant atteindre périodiquement des valeurs avoisinant 10 Hz (Kitazawa & Wolpert, 2005). La signification physiologique de ces pics de fréquence reste toutefois obscure, bien que souvent attribuée à un signal d'erreur issu de l'olive inférieure permettant de corriger les commandes motrices.

On peut également noter que l'activation des fibres grimpantes peut également générer des réponses excitatrices au sein des ICM, de par la large diffusion de glutamate hors de l'espace synaptique fibres grimpantes / cellules de Purkinje (Szapiro & Barbour, 2007).

Enfin, les seuls récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluR) fonctionnels au niveau des terminaisons axonales de ces fibres, sont les mGluRs du groupe II dont

l'activation est connue pour diminuer la libération de glutamate (Hashimoto & Kano, 1998 ; Maejima *et al.*, 2001).

3.1.2. Les Fibres Moussues

Chaque fibre moussue, quant à elle, possède environ 20 à 30 collatérales, chacune de ces collatérales formant des synapses avec plusieurs centaines de cellules granulaires et de cellules unipolaires en brosse différentes. Une cellule granulaire est contactée au maximum par 4 à 5 fibres moussues différentes, compte-tenu du fait que ces cellules ne possèdent que 4 dendrites en moyenne et que chaque fibre moussue ne forme qu'un seul contact par dendrite (Chadderton *et al.*, 2004).

Les cellules unipolaires en brosse ne possèdent, quant à elles, qu'une seule dendrite et ne sont donc contactées que par une seule fibre moussue (Mugnaini *et al.*, 2011). L'axone de ces cellules se projette localement au sein de la couche granulaire du cortex cérébelleux, pour établir des synapses soit avec des cellules granulaires, soit d'autres cellules unipolaires en brosse. Leur rôle serait donc d'amplifier indirectement le signal transmis par une fibre moussue aux cellules de Purkinje qui lui sont associées par l'intermédiaire des fibres parallèles, axones des cellules granulaires, en propageant ce signal aux cellules granulaires voisines.

3.1.3. Les Fibres Parallèles

Les fibres parallèles contactent à la fois les cellules de Purkinje, l'arbre dendritique des cellules de Golgi, et les ICM. Elles ne possèdent pas de terminaisons synaptiques à proprement parler, du fait qu'elles forment uniquement des synapses dites « en passant » (Figure 6). Ce type de synapse consiste en une multitude de renflements situés le long de l'axone, dénommés « boutons synaptiques », et possédant toute la machinerie nécessaire à l'exocytose de vésicules de neurotransmetteur, évoquée suite à l'arrivée d'un potentiel d'action, ou spontanée.

Chaque fibre parallèle, du fait de leur longueur (voir précédemment), peut contacter plusieurs centaines de cellules de Purkinje et ICM. Chaque cellule de Purkinje, de par son arborisation très développée, est quant à elle contactée par plus d'une centaine de milliers de fibres parallèles (jusqu'à 175.000 fibres) (Napper & Harvey, 1988). Cependant, il semble que seules 15% de ces fibres soient capables de générer des signaux électriques détectables au sein des cellules de Purkinje (Isobe & Barbour, 2002). L'amplitude des réponses générées au sein des cellules de Purkinje postsynaptiques dépend donc du nombre de fibres parallèles présynaptiques recrutées par celles-ci. Plus le nombre de fibres parallèles recruté est élevé, plus l'amplitude de la réponse postsynaptique est élevée, on parle de réponse graduelle.

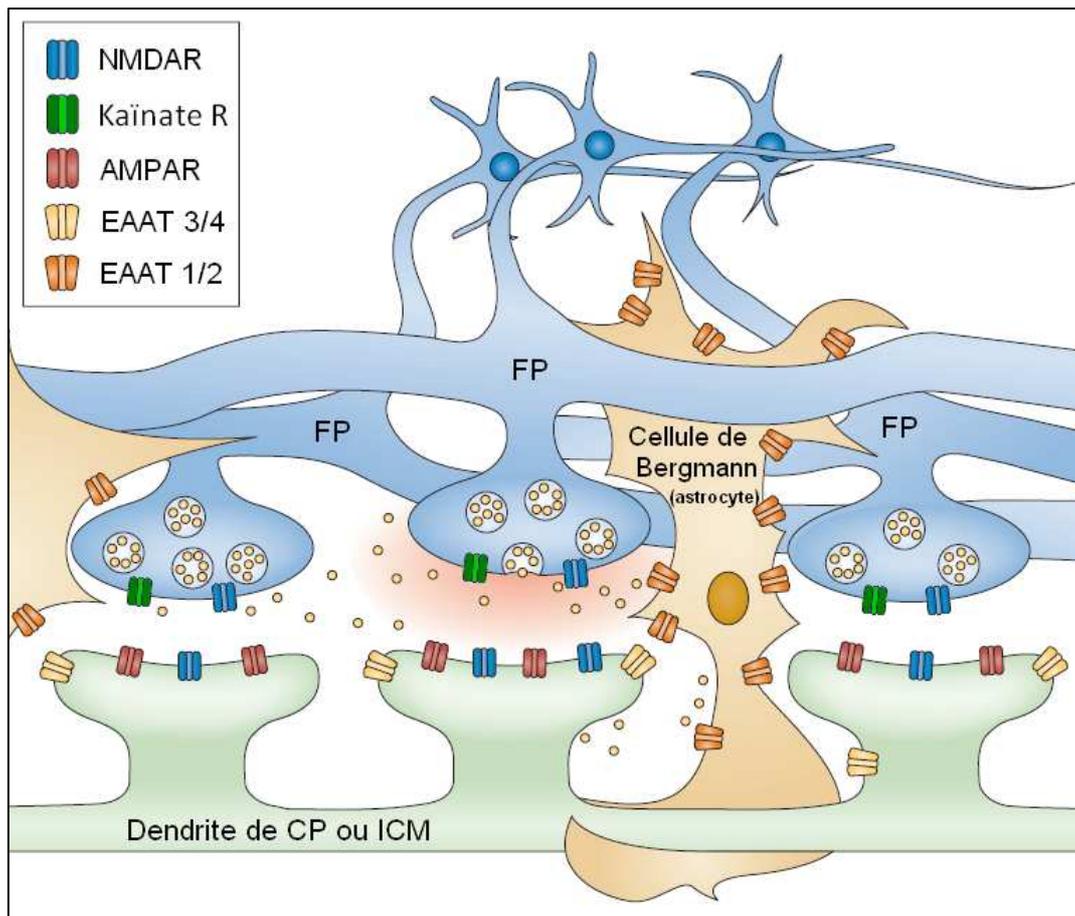


Figure 6. D'après Tzingounis & Wadiche, 2007 : Représentation schématique des synapses « en passant » dans le cortex cérébelleux. **FP** : Fibre Parallèle ; **CP** : Cellule de Purkinje ; **ICM** : Interneurone de la Couche Moléculaire ; **EAAT** : Excitatory AminoAcid Transporter.

On peut également noter que seulement 10% des fibres parallèles contactent les Interneurones de la couche Moléculaire (Zanjani *et al.*, 2006). De plus, ces cellules étant présentes en plus grand nombre que les cellules de Purkinje (Korbo *et al.*, 1993), on peut en déduire que le nombre de fibres parallèles contactant un Interneurone de la couche moléculaire est statistiquement beaucoup plus faible que le nombre de fibres afférentant une cellule de Purkinje.

Les fibres parallèles ont une fréquence de décharge élevée pouvant atteindre 250 Hz (Chadderton *et al.*, 2004).

Les « boutons synaptiques » des fibres parallèles comportent de nombreux récepteurs au glutamate, à la fois ionotropiques et métabotropiques.

3.1.3.1. Les récepteurs ionotropiques au glutamate présents dans les boutons synaptiques des fibres parallèles

Des récepteurs ionotropiques Kainate, comportant les sous-unités KA2 et GluR6, ont été identifiés par immunohistochimie au niveau de ces présynapses (Petralia *et al.*, 1994). Ceux-

ci possèdent, en conséquence de stimulations à basse fréquence des fibres parallèles, un effet potentialisateur sur la neurotransmission glutamatergique aussi bien à la synapse fibre parallèle – cellule de Purkinje qu’à la synapse fibre parallèle – Interneurone de la couche Moléculaire (Delaney & Jahr, 2002). Cependant, suite à des stimulations de haute fréquence de ces mêmes fibres, les récepteurs Kainate présynaptiques jouent un rôle inhibiteur à la synapse fibre parallèle – Interneurone de la couche Moléculaire, tandis qu’ils conservent leur effet potentialisateur à la synapse fibre parallèle – cellule de Purkinje (Delaney & Jahr, 2002). Ces récepteurs Kainate présynaptiques sont également impliqués dans le phénomène de suppression d’excitation induite par dépolarisation (Depolarization-induced Suppression of Excitation, ou DSE), causé dans ce cas par la libération rétrograde de glutamate par les dendrites des cellules de Purkinje, chez les rats adultes (Crepel 2007).

3.1.3.2. La régulation de la transmission glutamatergique par des récepteurs métabotropiques au sein des boutons synaptiques des fibres parallèles

La libération vésiculaire de glutamate au niveau des boutons synaptiques des fibres parallèles peut être régulée par au moins quatre types de récepteurs métabotropiques différents déjà décrits : il s’agit des récepteurs CB₁ aux endocannabinoïdes, A₁ à l’adénosine, des récepteurs GABA_B et des mGluRs du groupe III (Figure 7).

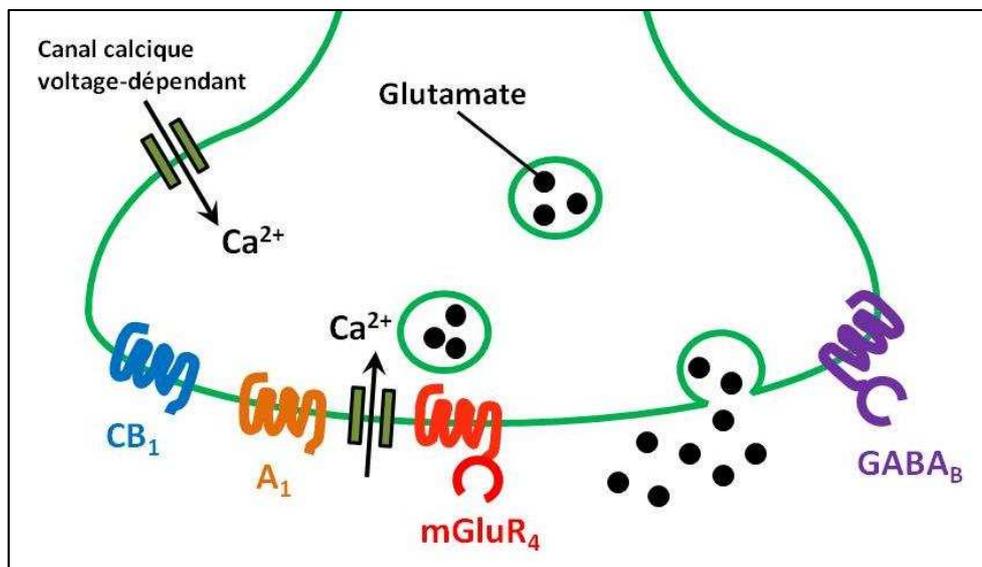


Figure 7. Représentation schématique simplifiée des différents récepteurs métabotropiques connus pour diminuer la libération de glutamate au niveau des « boutons synaptiques » des fibres parallèles.

a) Les récepteurs CB₁

Parmi les différents types de récepteurs métabotropiques connus pour réduire la libération de glutamate au niveau des boutons synaptiques des fibres parallèles se trouvent les récepteurs aux endocannabinoïdes CB₁ (Lévénès *et al.*, 1998 ; Daniel *et al.*, 2004).

Les récepteurs aux endocannabinoïdes comportent deux membres à ce jour : les CB₁ et CB₂ (Matsuda *et al.*, 1990 ; Munro *et al.*, 1993), même si tous les effets des endocannabinoïdes ne peuvent pas s'expliquer qu'avec ces deux seuls sous-types de récepteurs. Les récepteurs CB₁ sont très abondants chez les mammifères, notamment dans le système nerveux central où leur distribution a pu être largement caractérisée (Herkenham *et al.*, 1991 ; Tsou *et al.*, 1998). Dans le cortex cérébelleux, une étude immunohistochimique a pu mettre en évidence une localisation pérисynaptique de ces récepteurs au niveau des boutons synaptiques des fibres parallèles (Kawamura *et al.*, 2006).

Ces récepteurs à sept domaines transmembranaires sont couplés à une protéine G de type G $\alpha_{i/o}$ sensible à la toxine pertussique (PTX) inhibant la voie de l'adénylate cyclase (Caulfield & Brown, 1992 ; Prather *et al.*, 2000 ; Daniel *et al.*, 2004).

b) Les récepteurs A₁

Les récepteurs à l'adénosine sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires répartis en 4 sous-types : A₁, A_{2A}, A_{2B}, et A₃.

Les récepteurs A₁ sont abondamment exprimés au sein du cortex cérébelleux (Goodman & Snyder, 1982). Ces récepteurs sont entre autres exprimés au sein des boutons synaptiques des fibres parallèles où ils diminuent la libération de glutamate (Kocsis *et al.*, 1984), en déprimant les influx calciques présynaptiques (Dittman & Regehr, 1996). Bien que l'ensemble des différents récepteurs à l'adénosine soient potentiellement exprimés au sein des fibres parallèles, seuls les récepteurs A₁ semblent fonctionnels (DeSanty & Dar, 2001). Ces récepteurs ont été peu étudiés au sein du cortex cérébelleux, mais une étude menée dans l'hippocampe de rat leur attribue une localisation essentiellement au niveau des zones actives (Rebola *et al.*, 2003). Au sein des boutons synaptiques des fibres parallèles, ces récepteurs sont connus pour inhiber les canaux calciques voltage-dépendants de type N et P/Q (Dittman & Regehr, 1996).

c) Les récepteurs GABA_B

Le GABA libéré par les ICM de façon spontanée (voir précédemment), peut activer des récepteurs métabotropiques, les récepteurs GABA_B, situés entre autres sur les boutons synaptiques des fibres parallèles, où ils dépriment les influx calciques présynaptiques, diminuant de ce fait la libération de glutamate au niveau de ces boutons (Dittman & Regehr, 1997). Ce blocage des conductances calciques présynaptiques serait la conséquence de l'inhibition de canaux potassiques de type GIRK (Slesinger *et al.*, 1997), et pourrait également impliquer l'inhibition de la voie de l'adénylate cyclase (Wojcik & Neff, 1984).

d) Les mGluRs du groupe III

Parmi l'ensemble des récepteurs métabotropiques au glutamate, seuls ceux du groupe III sont présents au niveau des « boutons synaptiques » des fibres parallèles (Neale *et al.*,

2001), les récepteurs mGluR1 étant exclusivement localisés au niveau postsynaptique. Bien que les ARNm des mGluR4, 7 et 8 (Saugstad *et al.*, 1997 ; Berthele *et al.*, 1999 ; Lafon-Cazal *et al.*, 1999) soient tous exprimés au sein des cellules granulaires du cervelet, une étude menée au sein du laboratoire a démontré que seul les mGluR₄ sont fonctionnels (Abitbol *et al.*, 2008).

3.2. Les synapses inhibitrices

Il existe de très nombreuses synapses inhibitrices au sein du cortex cérébelleux. Dans la grande majorité des cas, le neurotransmetteur inhibiteur libéré à ces synapses est le GABA (Gamma AminoButyric Acid). Cependant, les cellules de Lugaro et de Golgi ont également une action inhibitrice glycinergique (Simat *et al.*, 2007).

Certaines de ces synapses permettent de réguler l'activité des cellules de Purkinje puisque les Interneurones de la couche moléculaire (cellules en panier et cellules étoilées) se projettent sur les cellules de Purkinje (Palay & Chan-Palay, 1974).

Les ICM peuvent également envoyer des collatérales sur d'autres interneurones, toujours dans la couche moléculaire. Ainsi, il semble que 60% des efférences inhibitrices des ICM soient en contact avec les cellules de Purkinje tandis que les 40% restant projettent sur d'autres ICM (Briatore *et al.*, 2010).

Les cellules de Golgi de la couche moléculaire sont des interneurones qui ont pour cible les cellules granulaires. Elles possèdent une activité rythmique (avec une fréquence thêta, de 4,5 à 8 Hz) qui leur permet de contrôler l'activité excitatrice des cellules granulaires dans le temps. Ces cellules modulent ainsi l'intensité des signaux transmis par les cellules granulaires, agissent comme un filtre passe-bas limitant leur fréquence maximale de décharge, et contrôlent les phénomènes de plasticité aux synapses fibre mousue / cellule granulaire (D'angelo *et al.*, 2013).

Les cellules de Lugaro, cellules fusiformes de la partie distale de la couche granulaire, sont des interneurones inhibiteurs assez rares, dont le rôle est assez mal connu à ce jour. On sait cependant que leur long axone projette exclusivement sur des interneurones (cellules de Golgi, et ICM) (Lainé & Axelrad, 1996 ; Lainé & Axelrad, 1998 ; Dieudonné & Dumoulin, 2000), et non sur les cellules de Purkinje.

Enfin, les cellules de Purkinje elles mêmes ont une fonction inhibitrice dans le cortex cérébelleux. Leur axone émet dans sa partie proximale nombre de collatérales contactant d'autres cellules de Purkinje ou d'autres types de cellules (Orduz & Llano, 2007).

III – Les cellules de Purkinje

Les cellules de Purkinje sont de grosses cellules (Figure 8) possédant une remarquable capacité d'intégration des différents signaux, excitateurs et inhibiteurs, émis au sein du cortex cérébelleux. D'un point de vue physiologique, elles alternent en permanence entre

deux états : un état quiescent, dans lequel les cellules de Purkinje sont hyperpolarisées et restent silencieuses, et un état actif (Llinas & Sugimori, 1980 ; Tank *et al.*, 1988). Il faut toutefois noter que l'existence de ces deux états résulte en réalité de l'activité des interneurons avoisinants (Oldfield *et al.*, 2010).

1. Morphologie

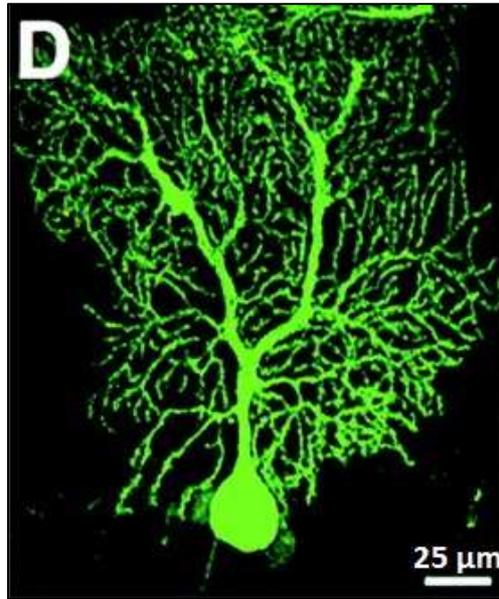


Figure 8. D'après Priller *et al.*, 2001 : Photographie d'une cellule de Purkinje marquée à la GFP (Green Fluorescent Protein) en microscopie confocale.

Ces cellules possèdent un corps cellulaire (ou soma) d'environ 20 à 30 µm de diamètre. La surface de leur arbre dendritique, projetant dans la couche moléculaire sur un plan parasagittal, atteint une valeur supérieure à 50.000 µm² chez le rat adulte (McKay & Turner, 2005).

2. Les réponses glutamatergiques

Les cellules de Purkinje reçoivent deux types d'afférences excitatrices glutamatergiques (voir précédemment), à l'origine de deux formes de réponses très différentes.

2.1. Les réponses complexes

Les fibres grimpantes sont à l'origine de réponses dites « complexes ». Ces dépolarisations complexes sont constituées d'une composante sodique (voire plusieurs), auquel se superposent des composantes calciques. Cependant, ces deux types de composantes sont générées à deux endroits différents de la cellule : les potentiels sodiques sont d'origine somatique (au niveau du segment initial de l'axone), tandis que les potentiels calciques sont générés au sein des dendrites (Campbell & Hesslow, 1985).

Ces dépolarisations sont la conséquence de la libération synchronisée de glutamate d'un très grand nombre de synapses, se fixant alors sur des récepteurs ionotropiques de type AMPA (responsables de la composante sodique), ainsi que des récepteurs métabotropiques postsynaptiques : les mGluR₁. Ces récepteurs (qui seront détaillés de façon plus précise par la suite), sont responsables de la genèse des dépolarisations plutôt calciques observés au niveau dendritique (Dzubay & Otis, 2002), notamment via la libération de calcium des stocks intracellulaires par production d'IP₃ (Nicoletti *et al.*, 2011), et par interaction avec des canaux calciques TRPC3 (Hartmann *et al.*, 2011) et voltage-dépendants de type T, les Ca_v3.1 (Isope *et al.*, 2012).

2.2. Les réponses simples

L'activation des fibres parallèles génère des réponses dites « simples » au sein des cellules de Purkinje. Ces réponses sont dues à l'activation de récepteurs ionotropiques au glutamate de type AMPA, résultant en une dépolarisation majoritairement sodique. Lorsque la somme de ces dépolarisations provenant de l'activation de plusieurs fibres parallèles atteint une valeur seuil, un potentiel d'action peut être généré au niveau du segment initial axonal de la cellule de Purkinje cible.

Les fibres parallèles peuvent également générer des variations de potentiels calciques par activation des récepteurs mGluR₁. Cependant, cette activation nécessite une stimulation à relativement haute fréquence de ces fibres (Batchelor & Garthwaite, 1993 ; Batchelor *et al.*, 1994), ce qui n'est pas le cas des fibres grimpantes qui génèrent ce type d'activité à basse fréquence.

IV – Les interneurons de la couche moléculaire (ICM)

Les ICMs sont composés de deux types cellulaires distingués principalement sur la base de leur localisation : les cellules étoilées sont retrouvées plutôt dans le tiers externe de la couche moléculaire, tandis que les cellules en panier sont retrouvées dans la partie proximale de cette couche (Figure 9). Au sein du cortex cérébelleux, le nombre de ces interneurons a été estimé à environ dix fois celui des cellules de Purkinje (Korbo *et al.*, 1993).

Bien qu'il semble exister des différences entre ces deux types cellulaires au niveau des courants inhibiteurs générés au sein des cellules de Purkinje (Vincent & Marty, 1996), les cellules étoilées et en panier possèdent un grand nombre de caractéristiques communes (Jörntell *et al.*, 2011). À ce titre, ces interneurons sont souvent considérés comme un type cellulaire unique, appelé interneurone de la couche moléculaire.

De ce fait, nous avons travaillé sur ces cellules sans établir de distinction, sans constater de différences fonctionnelle tant au niveau des réponses excitatrices évoquées par stimulation des fibres parallèles que des réponses spontanées.

1. Développement

Les ICMs sont issus d'une même lignée de cellules progénitrices originaire de la zone ventriculaire, située à la base du cervelet (Hallonet *et al.*, 1990 ; Gao & Hatten, 1994), migrant ensuite dans la substance blanche cérébelleuse (Zhang & Goldman, 1996). La différenciation de ces cellules progénitrices en ICM intervient lorsqu'elles atteignent la couche moléculaire, à partir de 4 à 6 jours post-nataux et jusqu'à environ 20 jours post-nataux chez le rat (Zhang & Goldman, 1996).

2. Morphologie

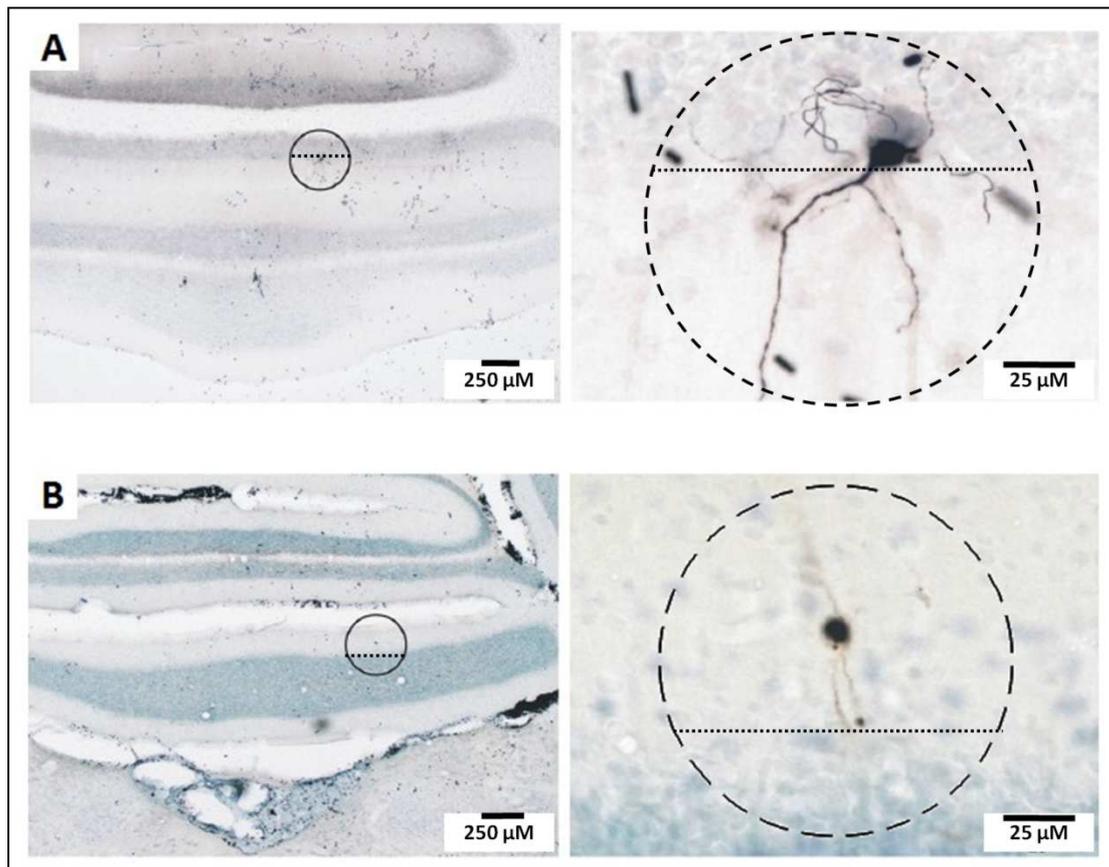


Figure 9. D'après Ruigrok *et al.*, 2011 : Photographies d'une cellule en panier (A) et d'une cellule étoilée (B) à faible (gauche) puis fort (droite) grossissement après marquage à la neurobiotine .

Ces interneurones disposent d'un corps cellulaire de petite taille (d'environ 8 à 12 μm) (Barmack & Yakhnitsa, 2008 ; Ruigrok *et al.*, 2011). Ils possèdent généralement 2 à 5 dendrites, relativement peu ramifiées, mesurant quelques dizaines de micromètres de longueur, et orientées dans le plan parasagittal. Leur axone prend naissance soit au niveau du soma, soit au niveau d'une dendrite proximale, d'où il s'étend, toujours dans le plan parasagittal, sur une distance pouvant atteindre un millimètre (Pouzat & Hestrin, 1997).

L'axone des cellules étoilées et celui des cellules en panier adoptent des configurations spatiales très différentes. L'axone des cellules étoilées possède une trajectoire très variable

d'une cellule à une autre, et cible les dendrites des cellules de Purkinje. À l'inverse, l'axone des cellules en panier suit une trajectoire parallèle à la couche des cellules de Purkinje. Il projette des collatérales perpendiculairement à cet axone, formant une structure appelée « pinceau » qui entoure le soma des cellules de Purkinje. Cette structure est à l'origine du nom de ces cellules en raison de sa morphologie « en panier ». Cet axone peut également contacter d'autres interneurons ainsi que le segment initial de l'axone des cellules de Purkinje.

Enfin, les axones des ICMs peuvent former des synapses avec des dendrites provenant de leur cellule d'origine : on parle alors d'autapses (Pouzat & Marty, 1998).

3. Les courants glutamatergiques dans les ICM

Les épines dendritiques des ICMs en contact avec les fibres parallèles expriment deux types de récepteurs ionotropiques au glutamate : les récepteurs AMPA et NMDA.

Les récepteurs AMPA possèdent une très forte perméabilité aux ions sodium ainsi qu'une plus faible perméabilité aux ions potassium, et existent sous deux formes fonctionnellement distinctes (Ozawa & Lino, 1993 ; Endo & Isa, 2001). Les récepteurs AMPA de type I ont une perméabilité très faible au calcium, et présentent une légère rectification sortante. Les récepteurs AMPA de type II, quant à eux, possèdent une perméabilité non négligeable aux ions calcium, ainsi qu'une rectification entrante. La différence de perméabilité aux ions calcium entre ces deux types de récepteurs est liée à la présence ou l'absence de la sous-unité GluR2. En effet, seuls les récepteurs AMPA ne possédant pas cette sous-unité ont une perméabilité au calcium (Isaac *et al.*, 2007).

Les récepteurs NMDA ont une faible perméabilité pour les ions sodium, potassium, et même césium, mais ils présentent une forte perméabilité aux ions calcium (Mayer & Westbrook, 1987). Ils possèdent également plusieurs sites de fixation pour les ions magnésium dont un situé à l'intérieur du pore du canal, qui du fait de la force électromotrice pour ces ions lorsque la cellule est au repos, bloque l'activité de ces récepteurs. La dépolarisation préalable de la cellule lève ce bloc « magnésium ». De plus, ces récepteurs sont activés en plus du glutamate par un co-agoniste, qui peut être soit la glycine, soit la D-sérine (Johnson & Ascher, 1987 ; Matsui *et al.*, 1995).

Les courants excitateurs enregistrés au sein des ICMs sont entièrement dus à l'activation des récepteurs AMPA de type II (perméables au calcium) lorsque la fréquence ou l'intensité de stimulation des fibres parallèles est faible, les récepteurs NMDA n'étant recrutés que lors de stimulations de forte intensité ou de haute fréquence (Carter & Regehr, 2000 ; Clark & Cull-Candy, 2002).

Cependant, certains récepteurs métabotropiques sont également capables d'induire des réponses excitatrices dans ces cellules. Ainsi, au sein des interneurons de la couche moléculaire, l'activation des récepteurs mGluR1, présents au niveau des dendrites de ces

cellules, génère des dépolarisations de relativement longue durée (d'environ 3 secondes) augmentant la fréquence de décharge de ces interneurons (Karakossian & Otis, 2004). De plus, l'activation prolongée de ces récepteurs est à l'origine d'oscillations calciques dépendantes de la production d'inositol triphosphate (Collin *et al.*, 2009). De la même façon que pour les réponses complexes, possédant également une composante calcique, évoquées dans les cellules de Purkinje par stimulation des fibres grimpantes, ces oscillations calciques semblent notamment conduire à l'inhibition temporaire de l'activité des cellules de Purkinje (Collin *et al.*, 2009).

4. Activité physiologique

Les profils de décharge des cellules étoilées et des cellules en panier sont très similaires (Ruigrok *et al.*, 2011). En absence de stimuli extérieurs, les ICMs génèrent des potentiels d'actions de façon spontanée et régulière. Cependant, les informations qu'ils reçoivent (afférences excitatrices des fibres parallèles et afférences inhibitrices d'autres ICMs) influencent fortement leur activité *in vivo* : il a notamment été démontré que de faibles courants excitateurs générés par l'activation de fibres parallèles augmentent brièvement la fréquence de décharge des ICMs, tandis que de faibles courants inhibiteurs générés par d'autres ICMs dépriment transitoirement leur activité (Carter & Regehr, 2002).

De manière intéressante, les ICMs semblent pouvoir être reliés entre eux par des jonctions communicantes (ou jonctions GAP) (Mann-Metzer & Yarom, 1999). Celles-ci correspondent à la formation d'un canal constitué de deux hémicanaux appelés connexons (eux-mêmes étant des hexamères d'une protéine nommée connexine), qui permet l'échange direct d'ions et de petites molécules (ATP, GTP, Glucose,...) entre deux cellules. La présence de ces jonctions communicantes permettrait ainsi de synchroniser l'activité de ces ICMs pour permettre de réguler de façon plus précise l'activité des cellules de Purkinje (Mann-Metzer & Yarom, 1999).

Les ICMs jouent un rôle important dans le contrôle des sorties du cortex cérébelleux, via le contrôle de l'activité des cellules de Purkinje. Il a notamment été montré que ces cellules ont la capacité de définir des fenêtres temporelles, pendant lesquelles les cellules de Purkinje peuvent émettre des potentiels d'action (Oldfield *et al.*, 2010).

Ces interneurons permettent également d'améliorer la précision temporelle de décharge des cellules de Purkinje, en procédant à une inhibition *feed-forward* puisqu'en effet au sein des cellules de Purkinje, chaque réponse excitatrice provenant des fibres parallèles est immédiatement suivie d'une réponse inhibitrice (Mittmann *et al.*, 2005). Ceci permettrait aux cellules de Purkinje d'obtenir un degré de précision suffisant pour pouvoir agir comme détecteurs de coïncidence.

Enfin, il a également été montré que l'activation d'une fibre parallèle est accompagnée d'une inhibition latérale sur les interneurons afférentés par des fibres parallèles voisines

(Cohen & Yarom, 2008), ce qui permettrait d'améliorer la précision spatiale des afférences cérébelleuses.

5. La plasticité à la synapse fibre parallèle – Interneurone de la couche Moléculaire

Le cortex cérébelleux est une structure dynamique au sein de laquelle le poids de chaque synapse est constamment réévalué. Cette dynamique est nécessaire pour que le cervelet puisse remplir ses fonctions, à la fois motrices et cognitives, la synapse Fibre parallèle – Interneurones de la couche Moléculaire n'y faisant pas exception.

L'efficacité de la neurotransmission glutamatergique à la synapse Fibre parallèle – Interneurone de la couche Moléculaire est fortement influencée par la fréquence de stimulation des fibres parallèles. En effet, il a été démontré que des stimulations à basse fréquence (autour de 2 Hz pour une durée d'au moins une minute) de ces fibres est capable d'induire deux formes de plasticité à long terme : la LTD (dépression à long terme) ou une forme de LTP (potentialisation à long terme) ne nécessitant pas de production de monoxyde d'azote (NO) (Crepel & Rancillac, 2004).

De plus, lorsque la fréquence de stimulation des fibres parallèles atteint une valeur suffisamment élevée pour activer les récepteurs mGluR1 (voir précédemment), des endocannabinoïdes peuvent être libérés au niveau postsynaptique. Ces endocannabinoïdes peuvent alors se fixer sur des récepteurs CB₁ localisés sur les « boutons synaptiques » des fibres parallèles, entraînant alors une diminution transitoire de la libération de glutamate par ces fibres (Rancillac & Barbara, 2005). Ce phénomène, dénommé DSE (Depolarization-induced Suppression of Excitation), peut également être causé par l'activation de récepteurs Kainate présynaptiques suite à une libération rétrograde de glutamate par les dendrites des cellules de Purkinje (Crepel, 2007).

Ces synapses expriment également une forme de plasticité à très court terme se traduisant par une augmentation transitoire de l'efficacité de la transmission synaptique, la facilitation appariée (Paired-Pulse Facilitation ou PPF) (Atluri & Regehr, 1998). Cette forme de plasticité peut être induite par l'utilisation de deux stimulations suffisamment rapprochées dans le temps. Bien que le ratio entre l'amplitude des deux réponses (également appelé PPR ou Paired-Pulse Ratio) dépende du délai entre les deux stimulations, des modifications de ce PPR, dans le cas d'un intervalle inter-stimuli fixe, semblent refléter de manière fiable des phénomènes présynaptiques, qui seront discutés plus en détails dans la section « Matériel & Méthodes ».

V – L'exocytose

1. Les différents types d'exocytose

L'exocytose représente l'ensemble des mécanismes aboutissant à la libération du contenu d'une vésicule par fusion avec la membrane plasmique. Il s'agit d'un processus

complexe et coûteux en énergie. En effet, pour pouvoir atteindre la membrane plasmique et fusionner avec elle, une vésicule doit repousser une partie du cytosol.

Cette exocytose existe sous 3 formes (Catterall & Few, 2008 ; Pang & Südhof, 2010) : une exocytose évoquée dite synchrone (ou phasique), une exocytose évoquée asynchrone (ou tonique), ainsi qu'une exocytose spontanée.

On peut enfin noter que bien que la majorité des neurotransmetteurs soient libérés de façon antérograde (par l'élément présynaptique) certains neurotransmetteurs comme le glutamate peuvent également être libérés de façon rétrograde (Glitsch *et al.*, 1996 ; Daniel & Crepel, 2007 ; Crepel *et al.*, 2011). Cependant, peu de choses sont connues sur les processus aboutissant à cette libération rétrograde par les dendrites des cellules postsynaptiques. Néanmoins, les transporteurs vésiculaires au glutamate VGLUT3 semblent jouer un rôle important dans ce phénomène (Crepel *et al.*, 2011). Ceci laisse penser qu'il pourrait alors exister une forme de libération postsynaptique.

2. Les microdomaines et nanodomaines calciques

L'exocytose synchrone est déclenchée par l'augmentation transitoire et localisée de la concentration calcique cytosolique (Südhof, 2004). Celle-ci est provoquée par l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants (voir table 1) localisés sur la terminaison présynaptique, à proximité des vésicules arrimées à la membrane plasmique. Cette proximité est en effet nécessaire, afin de permettre d'atteindre localement des concentrations calciques d'au moins 10 μM , requises pour l'initiation de cette exocytose (Schneppenburger and Neher, 2005). La distance séparant ces canaux calciques voltage-dépendants des « senseurs » calciques (c'est-à-dire des protéines pouvant lier le calcium) impliqués dans ce phénomène, peut varier de quelques dizaines à plusieurs centaines de nanomètres. À ce titre, on parlera de nanodomaines lorsque cette distance est inférieure à 100 nanomètres (Figure 10), ou dans le cas contraire, de microdomaines calciques (Neher, 1998 ; Augustine *et al.*, 2003).

Cette organisation en micro- ou nanodomaines calciques a une forte influence sur l'intensité et la vitesse des signaux calciques générés, ce qui impacte directement l'efficacité de la transmission synaptique (Neher, 1998 ; Meinrenken *et al.*, 2002 ; Bucurenciu *et al.*, 2008). En effet, au sein de nanodomaines calciques, un seul canal peut suffire à élever, à proximité des « senseurs » calciques, la concentration en calcium intracellulaire de plusieurs dizaines de μM , et ce au bout de seulement quelques microsecondes (Neher, 1998 ; Meinrenken *et al.*, 2002). Au contraire, au sein de microdomaines calciques, il faut plusieurs canaux calciques voltage-dépendants pour atteindre une concentration, également au voisinage des « senseurs » calciques, de quelques μM , et ce au bout de quelques millisecondes (Neher, 1998 ; Meinrenken *et al.*, 2002).

Dénomination	Courant Calcique	Antagoniste principal	Distribution	Présence sur les Fibres Parallèles
Ca _v 1.4	L (<i>Long lasting</i>)	Dihydropyridines	Rétine (Xu <i>et al.</i> , 2002)	
Ca _v 2.1	P (<i>Purkinje</i>)/Q	ω-agatoxine	Neurones (type P principalement cérébelleux ; Starr <i>et al.</i> , 1991)	Mintz <i>et al.</i> , 1995 Daniel & Crepel, 2001
Ca _v 2.2	N (<i>Neuronal</i>)	ω-conotoxine	Neurones (Ubiquitaire) (Takahashi & Momiyama, 1993)	Mintz <i>et al.</i> , 1995 Daniel & Crepel, 2001
Ca _v 2.3	R SNX482 sensibles	SNX 482	Neurones et Astrocytes (Ubiquitaire) (Dunlap <i>et al.</i> , 1995 ; D'Ascenzo <i>et al.</i> , 2004)	Brown <i>et al.</i> , 2004 Daniel <i>et al.</i> , 2004

Table 1. Les différents types de canaux calciques impliqués dans les processus d'exocytose au sein du Système Nerveux Central.

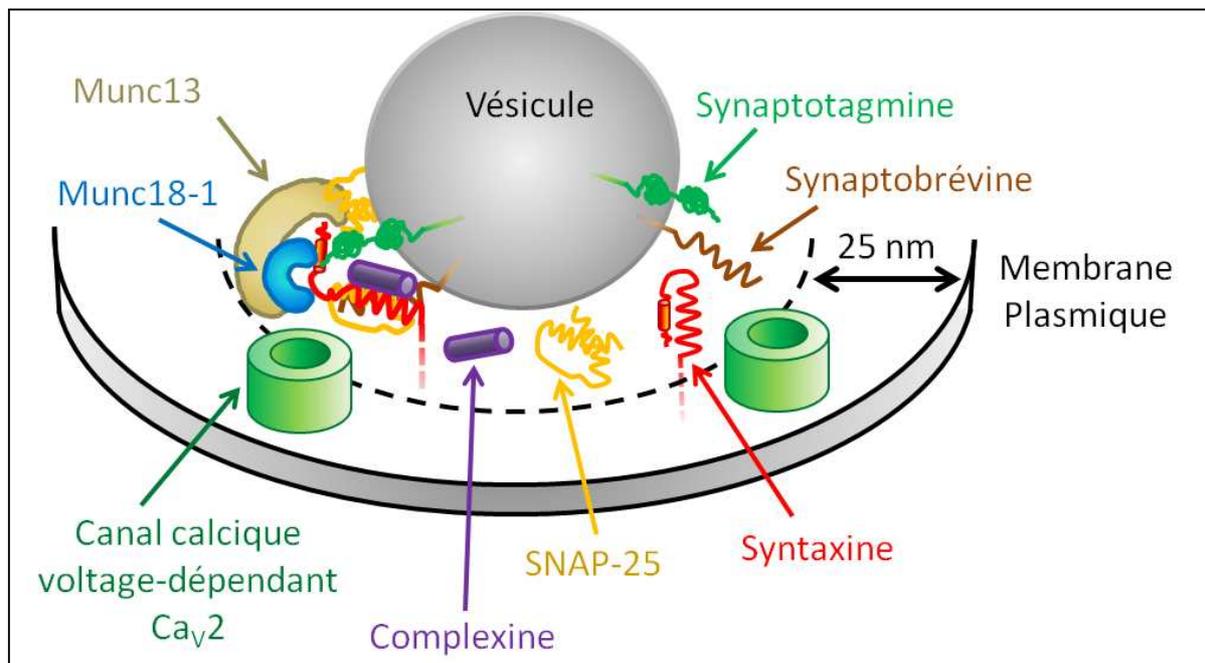


Figure 10. D'après Müller *et al.*, 2010 : Représentation schématique du nano-environnement protéique des canaux calciques Ca_v2 au niveau de la présynapse.

3. Les différentes protéines impliquées

De nombreuses protéines sont impliquées dans les différents processus d'exocytose. Parmi celles-ci se retrouvent le NSF (N-ethylmaleimide Sensitive Factor), les SNAPs (Soluble NSF Adaptor Protein), les SNAREs (Soluble NSF Attachment protein REceptor), les protéines SM (Sec1/Munc18-like), ainsi que des protéines G monomériques de la famille Rab3 (Table 2).

Il existe 2 types de classifications pour les SNAREs (Ungar & Hughson, 2003). Elles peuvent tout d'abord être classées en 2 catégories selon leur localisation : les t-SNAREs (pour « target » SNAREs) ancrées sur la membrane plasmique, et les v-SNAREs (pour « vesicular » SNAREs), associées à la membrane des vésicules de neurotransmetteur. Le second type de classification se réfère à leur composition biochimique : on parle alors de Q-SNAREs (riches en glutamine) et de R-SNAREs (riches en arginine) (Fasshauer *et al.*, 1998).

Protéine	Catégorie	Fonctions physiologiques
Syntaxine-1	t-SNARE	Arrimage des vésicules à la membrane plasmique par la formation d'un complexe Syntaxine/Synaptobrevine
Synaptobrevine (VAMP)	v-SNARE	
SNAP-25	t-SNARE	Stabilisation du complexe SNARE
Munc18-1	Protéine SM	Activation de la Syntaxine nécessaire pour la formation du complexe SNARE
Munc13	Protéine SM	Facilitation du recrutement des vésicules à la membrane plasmique Facilitation de l'activation de la Syntaxine par Munc18-1
Complexine		Activation puis blocage de l'assemblage complet du complexe SNARE.
Synaptotagmine	v-SNARE	Déclenchement du processus de fusion des vésicules à la membrane plasmique par dissociation calcium-dépendante du complexe SNAREs/complexine
Doc2		Remplace la Synaptotagmine dans le cas d'une exocytose asynchrone ou spontanée
NSF	ATPase	Dissociation du complexe SNARE

α -SNAP β -SNAP γ -SNAP		Recrutement du NSF à la membrane plasmique
Rab3	Protéine G monomérique	Recrutement des vésicules à la membrane plasmique.

Table 2. D'après Pang & Südhof, 2010 ; Rizo & Südhof, 2012 : Liste non exhaustive des principales protéines impliquées dans les processus d'exocytose.

La famille des SNAREs comporte de nombreux membres, dont les plus connus sont les Synaptotagmines, les Syntaxines, SNAP-25 (« Synaptosomal Novel Associated Protein of 25 kDa »), et les Synaptobrévines (ou VAMP pour « Vesicle-Associated Membrane Protein »). Elles possèdent toutes au moins une séquence de 60 à 70 acides aminés, possédant une structure en hélice alpha (Weimbs *et al.*, 1997). Ces séquences permettent à SNAP-25, une isoforme de la Syntaxine, ainsi qu'une isoforme de la Synaptobrévine de s'assembler en un faisceau d'hélices (structure « coiled-coil ») (Figure 11). Ce complexe, appelé complexe *trans*-SNARE, est responsable de l'arrimage des vésicules à la membrane plasmique et de leur fusion suite à sa transformation en complexe *cis*-SNARE.

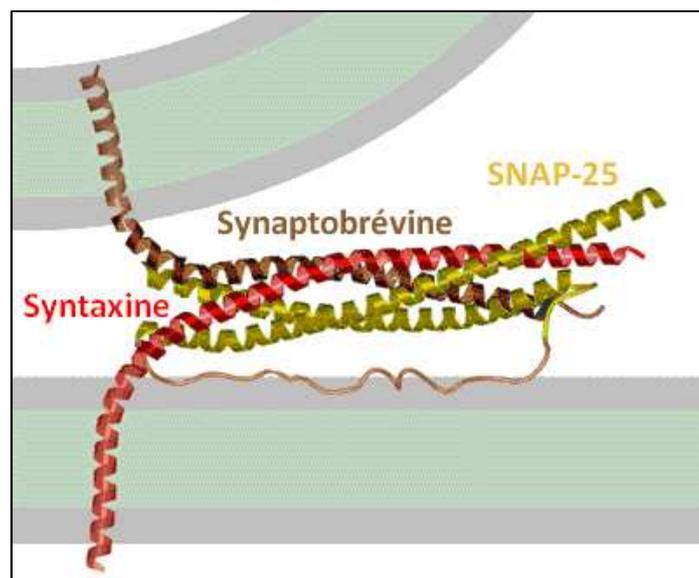


Figure 11. D'après Sutton *et al.*, 1998 : La structure tridimensionnelle du complexe SNARE.

Toutes ces protéines jouent un rôle très important. Par exemple, la synaptotagmine 1 est un « senseur » calcique qui joue un rôle crucial dans l'initiation du processus d'exocytose synchrone (Geppert *et al.*, 1994). Cette fonction est assurée par Doc2 lors d'une exocytose asynchrone voire spontanée (Yao *et al.*, 2011). On peut également noter qu'il existe une isoforme de la synaptotagmine, la synaptotagmine 12, dont le fonctionnement calcium-indépendant intervient dans les processus d'exocytose spontanée (Maximov *et al.*, 2007).

SNAP-25 et la Syntaxine 1A, de même que la synaptotagmine 1, en plus de leur rôle majeur dans l'arrimage et la fusion des vésicules avec la membrane plasmique, sont également connues pour interagir directement avec les canaux calciques voltage-dépendants, facilitant ainsi la formation de micro- et nanodomains calciques (Sheng *et al.*, 1997 ; Rettig *et al.*, 1996 ; Zhong *et al.*, 1999 ; Atlas, 2001 ; Eggermann *et al.*, 2012). De plus, ces protéines peuvent également réguler le fonctionnement de ces canaux, ce qui pourrait améliorer leur efficacité à initier l'exocytose lorsque ceux-ci sont proches d'une vésicule arrimée (Zhong *et al.*, 1999).

Les complexines, quant à elles, sont des protéines qui se fixent au complexe *trans*-SNARE lorsque celui-ci est au moins assemblé de moitié, et jouent un double rôle d'activation et de synchronisation de la neurotransmission (Brose, 2008 ; Südhof, 2012).

Enfin, Munc18-1 et Munc13 sont des protéines indispensables à la fusion des vésicules avec la membrane plasmique (Toonen, 2003 ; Barclay, 2008 ; Ma *et al.*, 2013). Munc18-1 faciliterait notamment la formation du complexe de SNAREs permettant cette fusion (Parisotto *et al.*, 2012), de par ses interactions avec la partie N-terminale de la Syntaxine 1 (Burkhardt *et al.*, 2008 ; Rodkey *et al.*, 2008 ; Deák *et al.*, 2009; Südhof & Rothman, 2009 ; Smyth *et al.*, 2010 ; Han *et al.*, 2011 ; Rizo & Südhof, 2012), et la synaptobrevine (Xu *et al.*, 2010) (Figure 12).

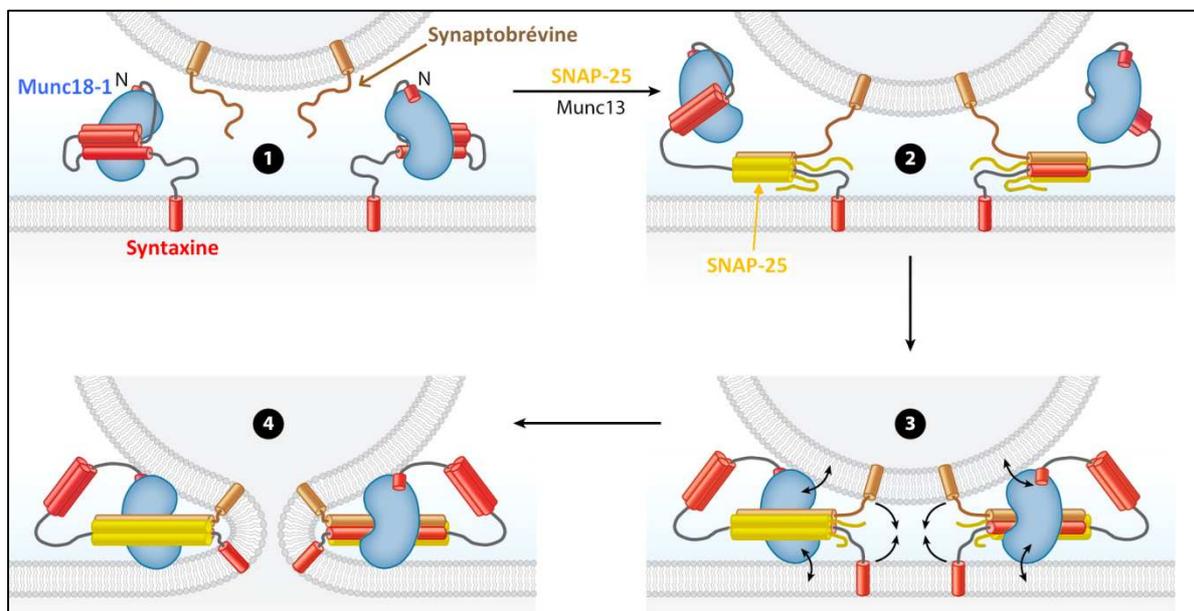


Figure 12. D'après Rizo & Südhof, 2012 : Mécanismes d'action de Munc18-1 sur le complexe SNARE.

Le complexe minimal requis pour l'exocytose comprend 6 protéines : une isoforme de la synaptotagmine, une syntaxine, une complexine, Munc18-1, SNAP-25 et une isoforme de la synaptobrevine (Pang & Südhof, 2010).

4. Dynamique de l'exocytose

L'exocytose se déroule en plusieurs étapes. La première étape consiste à mobiliser les vésicules, préalablement remplies à l'aide de transporteurs vésiculaires, de neurotransmetteur. Les vésicules sont recrutées en partie grâce à l'intervention de petites GTPases de la famille Rab3 (Figure 13-A), formant des complexes tripartites avec des protéines de la famille RIM (Rab3 Interacting Molecule) et Munc13.

Dans un deuxième temps, ces vésicules sont arrimées à la membrane, grâce à la formation du complexe *trans*-SNARE. Munc18-1 permet, par sa fixation à la partie N-terminale de la syntaxine, de démasquer la séquence d'interaction de la syntaxine avec la synaptobrevine. Cette étape, qui semble facilitée par l'intervention de Munc13, est indispensable à la formation du complexe *trans*-SNARE (Figure 13-B). De plus, il a été récemment démontré que la formation du complexe syntaxine/Munc18-1 joue un rôle crucial dans l'initiation du processus de fusion membranaire (Ma *et al.*, 2013).

Une complexine vient alors se fixer sur ce complexe partiellement assemblé, permettant alors à la fois d'initier son activation en complexe *cis*-SNARE, puis de le bloquer dans un état semi-actif, qui lui empêche d'amorcer la fusion des vésicules avec la membrane plasmique (Figure 13-C).

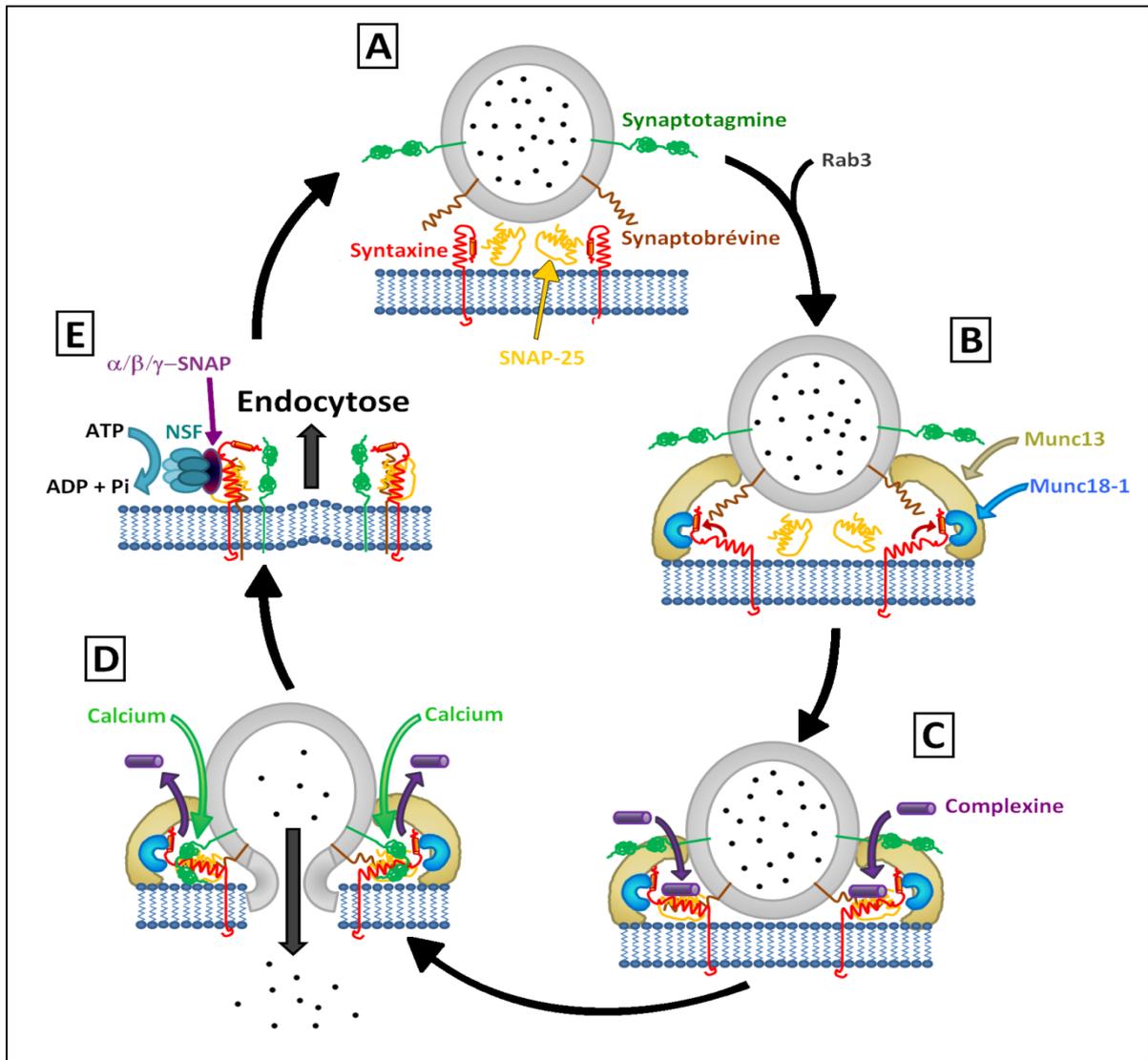


Figure 13. Représentation schématique des différentes étapes de l'exocytose. **A** – Recrutement des vésicules au niveau des zones actives. **B** – Etape primaire d'arrimage des vésicules à la membrane plasmique. **C** – Etape secondaire d'arrimage des vésicules. **D** – Fusion membranaire. **E** – Dissociation du complexe *cis*-SNARE : première étape du recyclage vésiculaire.

Une forte augmentation, transitoire et locale, de calcium permet à la Synaptotagmine de changer de conformation. Celle-ci se fixe alors sur le complexe Syntaxine-Munc18-1, et permet de dissocier la complexine du complexe SNARE, ce qui permet à ce dernier de compléter son activation. Le processus de fusion membranaire est alors amorcé, pour finalement aboutir à la formation d'un pore entre la membrane vésiculaire et la membrane plasmique permettant la libération du contenu de la vésicule dans la fente synaptique (Figure 13-D).

Enfin, les protéines cytosoliques α -SNAP, β -SNAP et/ou γ -SNAP induisent le recrutement de NSF à la membrane plasmique, aboutissant ainsi à la dissociation ATP-dépendante des complexes *cis*-SNAREs, première étape du recyclage vésiculaire (Figure 13-E).

Il faut également noter que ces différentes protéines ne sont pas les seuls éléments nécessaires au bon déroulement des processus d'exocytose. En effet, des études récentes montrent que les lipides membranaires semblent jouer un rôle important à la fois dans les processus d'exocytose et d'endocytose (Puchkov & Haucke, 2013). Certains de ces lipides, comme le cholestérol, auraient principalement un rôle structurel, en limitant par exemple la diffusion latérale des différentes SNAREs hors des zones actives, dont ils contrôlent en partie l'organisation structurelle, d'autres comme le Phosphoinositol 4,5-Biphosphate (PIP₂) pourraient influencer la structure secondaire des SNAREs, participer au recrutement de certaines protéines, ou même jouer un rôle dans l'arrimage des vésicules à la membrane plasmique et fixant les domaines cytosoliques de protéines vésiculaires (notamment la synaptotagmine) (Puchkov & Haucke, 2013). Enfin, la production de certains acides phosphatidiques serait nécessaire pour induire une courbure des membranes vésiculaire et plasmique facilitant le rapprochement de ces deux membranes (Zeniou-Meyer *et al.*, 2007).

VI – Les récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluRs)

1. Classification des mGluRs

Les récepteurs métabotropiques au glutamate sont classés en trois sous-groupes selon leurs propriétés pharmacologiques, leur homologie de séquence et les voies de signalisation qu'ils mettent en jeu (Nicoletti *et al.*, 2011).

Ils comprennent actuellement 8 membres ayant pu être clonés (Masu *et al.*, 1991 ; Houamed *et al.*, 1991 ; Nakajima *et al.*, 1993 ; Saugstad *et al.*, 1997), obtenus pour la plupart d'entre eux par épissage alternatif : les mGluR1 et 5 composent le groupe I, les mGluR2 et 3 forment le groupe II, le groupe III comprend les mGluR4, 6, 7 et 8.

2. Localisation et fonctions synaptiques des mGluRs

2.1. Les mGluRs du groupe I

Les mGluRs du groupe I sont localisés sur le versant postsynaptique, de manière pérисynaptique (Lujan *et al.*, 1996 ; Lujan *et al.*, 1997). Ils sont couplés à la voie de la phospholipase C (PLC) / Protéine Kinase C (PKC) par le biais d'une protéine Gαq (Masu *et al.*, 1991 ; Abe *et al.*, 1992), même si initialement ils ont été décrit comme capable d'activer l'adenylate cyclase vraisemblablement via une protéine Gαs, au moins dans les systèmes d'expression (Aramori & Nakanishi, 1992). Leur activation est essentiellement associée à une potentialisation des réponses induites par la fixation de glutamate sur les récepteurs AMPA/Kaïnate et/ou NMDA, ainsi qu'à une augmentation de l'excitabilité neuronale (Anwyl, 1999).

Les récepteurs mGluR1α présents sur les dendrites des cellules de Purkinje sont également à l'origine de réponses postsynaptiques excitatrices calciques lentes au niveau des synapses fibre parallèle - cellule de Purkinje (Batchelor & Gaithwaite, 1997).

Cependant, ils peuvent également indirectement provoquer la diminution de la libération de glutamate de façon paracrine, via la production d'endocannabinoïdes (Maejima *et al.*, 2001 ; Galante & Diana, 2004), agissant de façon rétrograde sur des récepteurs CB₁ localisés sur les « boutons synaptiques » des fibres parallèles (Lévénès *et al.*, 1998), ou par libération rétrograde de glutamate agissant sur des récepteurs Kainate présynaptiques (Lévénès *et al.*, 2001 ; Crepel, 2007).

De plus, ces récepteurs mGluR1 α sont également nécessaire pour l'induction d'une forme de plasticité à long terme, la LTD (dépression à long terme) (Conquet *et al.*, 1994 ; Aiba *et al.*, 1994), notamment requise lors des phénomènes d'apprentissage moteur.

2.2. Les mGluRs du groupe II

Les mGluRs du groupe II, quant à eux, possèdent une localisation pérисynaptique à la fois pré- et postsynaptique (Ohishi *et al.*, 1993 ; Petralia *et al.*, 1996 ; Shigemoto *et al.*, 1997). Ils sont couplés négativement à l'adenylate cyclase via une protéine G $\alpha_{i/o}$ sensible à la PTX (Tanabe *et al.*, 1992, 1993). Leur activation entraîne également l'ouverture de canaux potassiques de type GIRK, via l'activation des protéines G $\alpha_{i/o}$ couplées à ces récepteurs (Knoflach & Kemp, 1998). Les mGluRs du groupe II peuvent fonctionner à la fois en tant qu'auto-récepteurs, diminuant alors la libération de glutamate (Macek *et al.*, 1996 ; Dietrich *et al.*, 1997), ou en tant qu'hétéro-récepteurs diminuant la libération de divers neurotransmetteurs au niveau de synapses dopaminergiques, sérotoninergiques ou GABAergiques (Cartmell & Schoepp, 2000).

2.3. Les mGluRs du groupe III

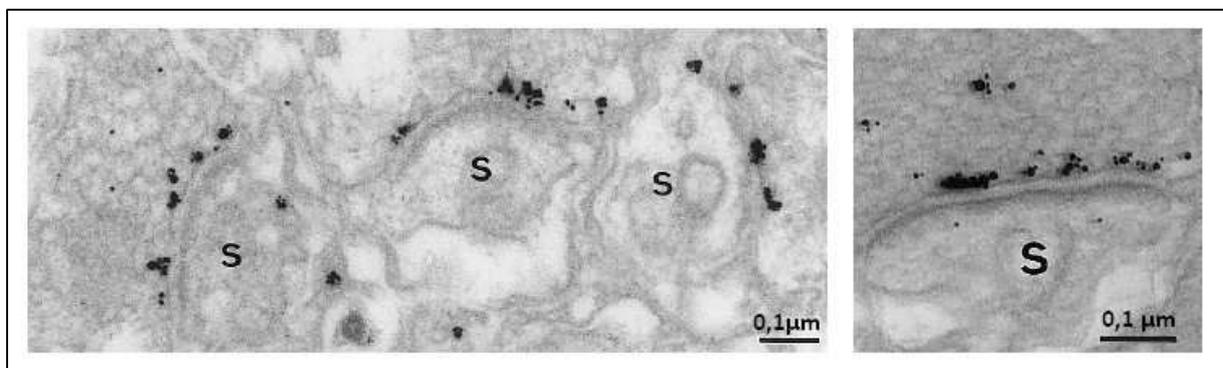


Figure 14. D'après Mateos *et al.*, 1999 : Immunomarquage des récepteurs mGluR₄ au sein de la couche moléculaire du cortex cérébelleux. S : épine dendritique.

À l'exception des récepteurs mGluR₆ retrouvés uniquement au niveau de la rétine sur le versant postsynaptique, les mGluR du groupe III ont une localisation exclusivement présynaptique, au niveau des zones actives (Shigemoto *et al.*, 1997 ; Mateos *et al.*, 1998 ; Corti *et al.*, 2002 ; Ferraguti & Shigemoto, 2006 ; Figure 14).

De même que pour les mGluRs du groupe II, ils ont été initialement décrits comme inhibant les canaux calciques voltage-dépendants de type P/Q, N et L (voir Anwyl, 1999) par couplage négatif à la voie de l'adénylate cyclase via une protéine $G\alpha_{i/o}$ sensible à la PTX dans divers systèmes d'expression et cultures neuronales (Thomsen *et al.*, 1992 ; Tanabe *et al.*, 1993 ; Chavis *et al.*, 1994 ; Neil *et al.*, 1996). D'autres études leur associent une voie impliquant les MAP Kinases Erk et la PI3Kinase (Iacovelli *et al.*, 2002, 2004). Enfin, il semble également que les mGluRs du groupe III activent des canaux potassiques à deux pores (K2P ; Cain *et al.*, 2008).

Cependant, des études menées sur des récepteurs natifs mettent en doute ces données relatives à un couplage des mGluRs du groupe III à une voie de transduction $G\alpha_{i/o}$ - adénylate cyclase. Ainsi, l'étude de récepteurs mGluR₇ natifs dans des cellules granulaires de cervelet en culture a mis en évidence l'implication majeure d'une voie PLC/PKC dépendante (Perroy *et al.*, 2000).

Il a également été montré que ces récepteurs mGluR₇, par l'intermédiaire de l'activation de la PLC, sont capables de recruter la protéine Munc13-1, qui joue un rôle majeur dans la fusion des vésicules de neurotransmetteur à la membrane plasmique (Martín *et al.*, 2010).

Enfin, pour ce qui concerne les récepteurs mGluR₄, des travaux récents du laboratoire, auxquels j'ai contribué, démontrent au sein de la synapse fibre parallèle - cellule de Purkinje que l'activation de ces récepteurs met en jeu une voie PLC/PKC-dépendante, et non un couplage négatif à l'adénylate cyclase (Abitbol *et al.*, 2012).

De plus, parmi l'ensemble des partenaires protéiques des récepteurs mGluR₄ identifiés par une étude biochimique de leur réceptosome menée récemment au sein du laboratoire, aucun membre de la voie Adénylate cyclase / Protéine Kinase A n'a été retrouvé contrairement à divers acteurs de la voie PLC/PKC (Ramos *et al.*, 2012) (voir section « partenaires protéiques » des récepteurs mGluR₄).

Récepteurs	Localisation	Effecteurs Principaux	Effets
mGluRs du groupe I	Postsynaptique (Périsynaptique)	<ul style="list-style-type: none"> • Protéine $G\alpha_q$ • Phospholipase C • Protéine Kinase C • Adenylate Cyclase 	<ul style="list-style-type: none"> • Potentialisation des réponses AMPA et/ou NMDA • Diminution de la transmission glutamatergique (production d'endocannabinoïdes et libération rétrograde de glutamate).
mGluRs du groupe II	Pré- et postsynaptique (Périsynaptique)	<ul style="list-style-type: none"> • Protéine $G\alpha_{i/o}$ • Couplage négatif à l'Adenylate Cyclase • canaux GIRK 	Diminution de la libération de neurotransmetteurs (Auto- et Hétérorécepteurs)
mGluRs du groupe III	Présynaptique (excepté pour les mGluR6, situés sur le versant postsynaptique) (dans les zones actives, au moins pour mGluR ₄)	<ul style="list-style-type: none"> • Protéine $G\alpha_{i/o}$ (systèmes d'expression, neurones en culture) • Couplage négatif à l'Adenylate Cyclase • MAP Kinases Erk • PI3Kinase • Canaux potassiques à 2 pores • Phospholipase C (mGluR7 natifs) • Inhibition des canaux calciques voltage-dépendants de type L, N et P/Q 	Diminution de la libération de neurotransmetteurs (Autorécepteurs)

Table 3. Tableau non exhaustif récapitulatif de la localisation synaptique, des effecteurs principaux ainsi que du rôle fonctionnel des différents groupes de mGluR.

VII – Les récepteurs mGluR₄

1. Structure

Les récepteurs mGluR₄ ont une séquence de 912 acides aminés. De par leur appartenance à la famille des récepteurs couplés aux protéines G de classe C, ils possèdent un large domaine N-terminal, constitué de 590 acides aminés, bilobé appelé domaine « Venus Fly Trap » (VFT) en raison de sa similitude avec la plante carnivore du même nom. Le site de fixation du glutamate sur ces récepteurs se situe au sein de ce domaine VFT.

Ils sont ancrés à la membrane plasmique par sept segments hydrophobes, d'une longueur d'environ 20 acides aminés, reliés entre eux par trois boucles cytosoliques et trois boucles extracellulaires.

Leur domaine C-terminal, quant à lui, est constitué de 65 acides aminés, et possède une séquence de liaison aux domaines PDZ à son extrémité.

Ces récepteurs sont essentiellement fonctionnels en tant qu'homodimères (Knazieff *et al.*, 2011 ; Nicoletti *et al.*, 2011).

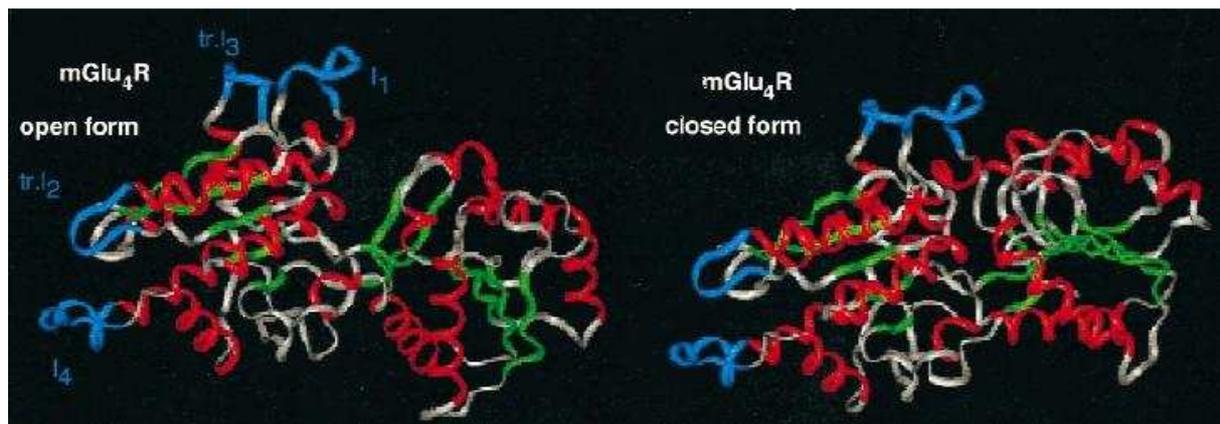


Figure 15. D'après Bessis *et al.*, 2000 : modélisation du domaine VFT des récepteurs mGluR₄ à partir de la structure de protéines bactériennes.

La structure tridimensionnelle exacte des récepteurs mGluR₄ n'a pas été encore résolue à ce jour, comme pour de nombreux autres récepteurs couplés aux protéines G de classe C. Cependant, il a été montré que la partie N-terminale de ces récepteurs présente une forte homologie de séquence avec certaines protéines bactériennes, et notamment la protéine LIVBP (Leucine Isoleucine Valine-Binding Protein), dont la structure tridimensionnelle a été résolue par cristallographie à rayons X (O'Hara *et al.*, 1993). De plus des expériences de mutagenèse dirigée réalisées sur les récepteurs mGluR₄, basées sur la structure de la protéine LIVBP, ont permis de confirmer ces résultats (Hampson *et al.*, 1999), ce qui a ensuite permis de modéliser la région N-terminale de ces récepteurs (Bessis *et al.*, 2000 ; Figure 15).

On peut cependant noter que la structure d'un autre mGluR du groupe III, le récepteur mGluR₇, a pu, quant à elle, être déterminée (à l'exception de sa région C-terminale) par cristallographie à rayons X (Muto *et al.*, 2007 ; Figure 16).

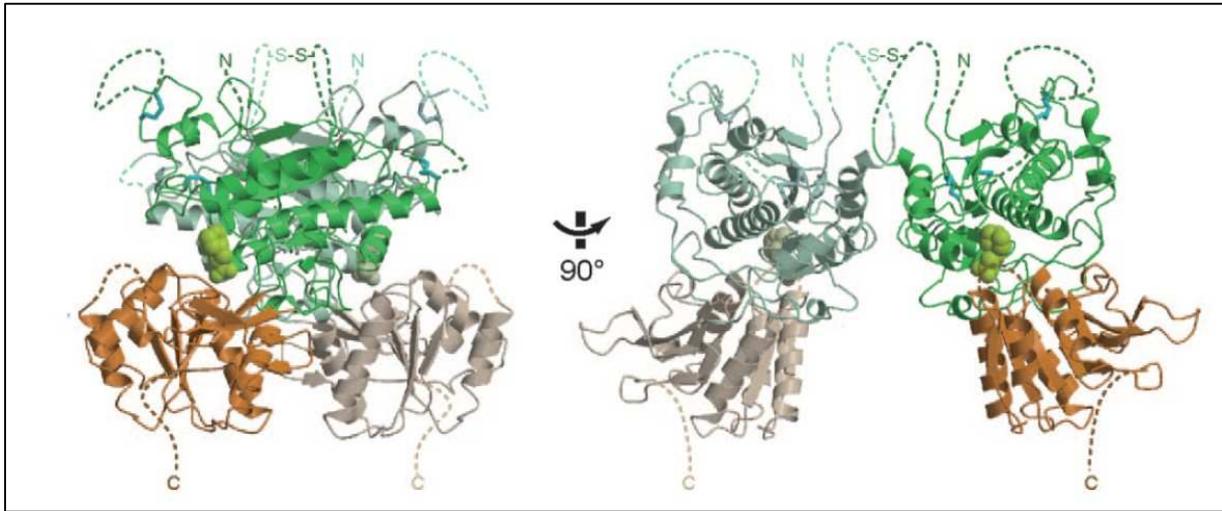


Figure 16. D'après Muto *et al.*, 2007 : Structure cristallographique des récepteurs mGluR₇ sous forme homodimérique.

En outre, des études portant sur la structure et l'organisation des domaines transmembranaires des récepteurs couplés aux protéines G de classe C, et notamment des mGluRs, révèlent une forte similarité avec celles des domaines transmembranaires des récepteurs de classe A tels que la Rhodopsine (Goudet *et al.*, 2004 ; Binet *et al.*, 2007).

Enfin, la partie C-terminale des mGluRs du groupe III, est une longue séquence protéique non-structurée (c'est-à-dire qu'elle ne possède aucune structure secondaire prédéfinie de type hélice α ou feuillet β), sur laquelle se situent de nombreux motifs dénommés SLiMs (Short Linear Motif). Cette partie du récepteur serait responsable de la grande majorité des interactions avec différents partenaires protéiques (Seebahn *et al.*, 2011). Cette séquence protéique C-terminale est également la région présentant le plus de variabilité entre les différents mGluRs (Enz, 2007). Il faut par ailleurs mentionner que les boucles cytosoliques sont également connues pour permettre l'interaction avec des partenaires protéiques (Ramos *et al.*, 2012).

2. Pharmacologie

Le ligand endogène des récepteurs mGluR₄ est le glutamate, mais il existe de nombreux outils pharmacologiques permettant d'étudier ceux-ci, bien que n'étant que rarement sélectifs des seuls mGluR₄ (Table 4).

Ainsi, l'agoniste orthostérique (c'est-à-dire se fixant sur le même site de liaison que le ligand endogène) le plus fréquemment utilisé est le L-AP4 (pour L-2-Amino-4-Phosphobutyric acid), agoniste à large spectre des mGluRs du groupe III.

Il n'existe par ailleurs pas d'antagoniste sélectif et très efficace de ces récepteurs à ce jour. Le MSOP, qui est la molécule la plus utilisée à cet effet, doit par exemple être appliquée à des doses très élevées (sa constante de dissociation, ou K_D , est de $51\mu\text{M}$). L'élaboration d'un nouvel antagoniste plus sélectif des mGluR_4 et efficace est en cours de synthèse par l'équipe de Francine Acher (Université Paris Descartes). Pour l'heure, la production de cet outil pharmacologique n'est pas effective.

Néanmoins, il existe des outils pharmacologiques très sélectifs pour les récepteurs mGluR_4 . Il s'agit de modulateurs allostériques positifs (ou PAM) dont le plus connu est le PHCCC (Phenyl-7-HydroxyiminoCyclopropa[b]Chromen-1a-Carboxamide, également antagoniste des mGluRs du groupe I). Ces molécules se fixent sur un site différent du site de liaison au ligand endogène, et ne possèdent pas d'effet propre. Cependant, elles permettent de potentialiser la réponse induite par l'activation de ces récepteurs.

Il existe également des modulateurs allostériques négatifs (ou NAM), ayant l'effet inverse des PAMs, pour certains autres mGluRs (mGluR_5 , mGluR_7 et mGluRs du groupe II), mais aucun de ces outils n'existe pour les récepteurs mGluR_4 .

Le manque d'agonistes et antagonistes orthostériques ayant une sélectivité élevée pour les récepteurs mGluRs du groupe III s'explique en partie par la forte homologie de séquence entre les différents sous-types de ces récepteurs. De plus, les molécules synthétisées jusqu'à récemment sont principalement issues de la modification de composés existants, caractérisés par leur groupement phosphonate, dont fait partie le L-AP4.

Pour tenter de produire des outils pharmacologiques sélectifs des récepteurs mGluR_4 , deux nouvelles approches majeures ont été mises en place au cours de ces dernières années (pour revue, voir Flor & Acher, 2012) :

- Une technique dite de « virtual screening » qui consiste à tester de façon « virtuelle », sur un modèle tridimensionnel de la protéine d'intérêt, un ensemble de composés (regroupés dans des banques de données) afin d'essayer de démasquer des molécules potentiellement actives.
- Une technique très similaire, ne reposant plus sur l'utilisation d'un modèle virtuel de la protéine d'intérêt, mais sur celle de systèmes d'expression.

Ces approches offrent de nouvelles possibilités quant au développement de nouveaux outils pharmacologiques plus sélectifs, dont le manque actuel représente une limite majeure à l'étude du rôle physiologique des différents sous-types de mGluRs du groupe III. La première partie de mon travail de thèse a contribué à valider de nouvelles molécules issues de ces diverses approches, agonistes des récepteurs mGluR_4 présents au niveau du cortex cérébelleux.

Récepteur	Groupe	Agonistes principaux	Antagonistes	Positive Allosteric Modulators	Negative Allosteric Modulators
mGluR1	I	(S)-3,5-DHPG CHPG (mGluR5)	(S)-MCPG AIDA (mGluR1)	Ro 67-7476 Ro 01-6128	
mGluR5				CDPPB VU 0357121 ADX47273	DMeOB MFZ 10-7 VU0463841
mGluR2	II	DCG-IV LY354740 NAAG (mGluR3)	LY341495 B-NAAG (mGluR3)	LY 487379 BINA	MNI 137
mGluR3					
mGluR4	III	L-AP4 L-SOP (1S,2R)-APCPr (S)-3,4-DCPG (mGluR8) AMN082 (mGluR7)	MSOP M-AP4 CPPG	PHCCC VU 0364439	
mGluR6					
mGluR7					MMPIP ADX71743
mGluR8					

Table 4. Tableau non exhaustif récapitulatif des outils pharmacologiques relatifs aux différents mGluRs

3. Partenaires protéiques

Les récepteurs mGluR₄ interagissent, directement et indirectement, avec un grand nombre de protéines partenaires (Table 5).

Certains partenaires protéiques de ces récepteurs sont des protéines du cytosquelette, telles que la Myosine X, la protéine MAP1B (Microtubule-Associated Protein 1B) (Moritz *et al.*, 2009), ou la tubuline α 1B, β 2, 3 et 4 (Ramos *et al.*, 2012).

Les récepteurs mGluR₄ peuvent également interagir avec d'autres récepteurs. Il a notamment été montré au sein du cortex cérébelleux, et plus précisément au niveau des « boutons synaptiques » des fibres parallèles, que les récepteurs mGluR₄ peuvent interagir avec des récepteurs GABA_A présynaptiques (Antflick & Hampson, 2012). Dans cette étude,

les auteurs montrent également que l'absence de mGluR₄ s'accompagne d'une diminution de l'expression des sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 6$, $\beta 2$ du récepteur GABA_A.

Par ailleurs, parmi les différents partenaires protéiques des récepteurs mGluR₄ impliqués dans la signalisation cellulaire, sont entre autres retrouvées la sous-unité alpha de la protéine Gq, la protéine Rack1 (Receptor for Activated C Kinase 1) et la protéine MARCKS (Myristoylated Alanine-Rich C-Kinase Substrate), toutes deux membres de la voie PLC/PKC dépendante (Ramos *et al.*, 2012). Au contraire, aucun membre de la voie $G\alpha_{i/o}$ – adénylate cyclase n'a été retrouvé.

Famille d'effecteurs	Interacteur	Bibliographie	Système étudié
Trafficking/Exocytose	Munc18-1	Nakajima <i>et al.</i> , 2009	Synaptosomes de cerveaux de souris Cervelets de rats
	NSF	Ramos <i>et al.</i> , 2012	Cervelets de rats
	Rab-1A	Ramos <i>et al.</i> , 2012	
	Rab-3A		
	Rab-5C		
	Rab-6A		
	Rab-10		
	Rab GDI α		
	P21-Rac1		
	Rho GDI-1		
	SNAP-25		
	Synapsine I		
	Synapsine II		
	Glycoprotéine 2A de la vésicule synaptique (SV2A)		
	Synaptotagmine 2		
	Syntaxine-1B		
	α -Synucléine		
	β -Synucléine		
	AP180		
Chaîne lourde de la Clathrine 1			
Dynamine 1			
Cytosquelette	Synténine	Hirbec <i>et al.</i> , 2002	Cellules COS-7
	MAP1B	Moritz <i>et al.</i> , 2009	Cerveau de rat Cerveau de souris
	Spectrine β 2	Moritz <i>et al.</i> , 2009	Cerveau de rat
	Myosine X		
	Filamine-A	Enz, 2002	Levure
	Arp2	Ramos <i>et al.</i> , 2012	Cervelets de rats
	Arpc2		
	Myosine Va		
	Myosine VI		
	Tubuline α 1B		
	Tubuline β 2, 3 et 4		
	Spectrine β		
DRP-2 (Dystrophin Related Protein 2)			

Famille d'effecteurs	Interacteur	Bibliographie	Système étudié
Echafaudage	PICK1	El Far <i>et al.</i> , 2000	Levure
Endocytose	GRK2	Iacovelli <i>et al.</i> , 2004	Cellules HEK293
	Clathrine	Moritz <i>et al.</i> , 2009	Cerveau de rat
	AP-2		
Signalisation	CaBP1	Nakajima, 2011	Milieu acellulaire
	CaM	El Far <i>et al.</i> , 2001	Cellules HEK293, membranes cérébelleuses
	GRIP	Hirbec <i>et al.</i> , 2002	Cellules COS-7
	Pias-1	Tang <i>et al.</i> , 2005	Cellules HEK293
	Gαq	Ramos <i>et al.</i> , 2012	Cervelets de rats
	Protéine 14-3-3 (êta et epsilon)		
	Rack1		
	MARCKS		
Métabolisme	Fructose-bisphosphate aldolase A et C	Ramos <i>et al.</i> , 2012	Cervelets de rats
	6-phosphofructokinase		
	Phosphoglycerate kinase 1		
	Phosphoglycerate mutase 1		
	Pyruvate kinase		
	α/γ –Enolase		
	Malate dehydrogenase		
	Creatine kinase (type B)		
	Citrate synthase		
	Transaminase A		
	ATP synthase (sous-unités α, b, β, O et γ)		
	Aconitate hydratase		
Triosephosphate isomerase			

Table 5. Liste des partenaires protéiques des récepteurs mGluR₄ connus à ce jour.

De plus, les récepteurs interagissent avec de nombreuses enzymes impliquées dans la production d'énergie, notamment par le la voie de la glycolyse (Ramos *et al.*, 2012).

Enfin, ces récepteurs semblent être des partenaires de nombreuses protéines impliquées dans les processus d'exocytose, de mobilisation et de recyclage des vésicules de neurotransmetteur (Ramos *et al.*, 2012 ; Table 5; Figure 17), dont font partie Munc18-1 (Nakajima *et al.*, 2009), la Syntaxine 1B, la Clathrine, ou même plusieurs membres de la famille des protéines G monomériques Rab. De telles interactions putatives soulèvent de façon intéressante la question de l'existence ou non d'un mécanisme de contrôle direct ou indirect des processus d'exocytose par les mGluR₄, en parallèle de l'inhibition des canaux calciques présynaptiques décrite pour ces récepteurs, question à laquelle nous avons tenté de répondre au cours de ce travail de thèse.

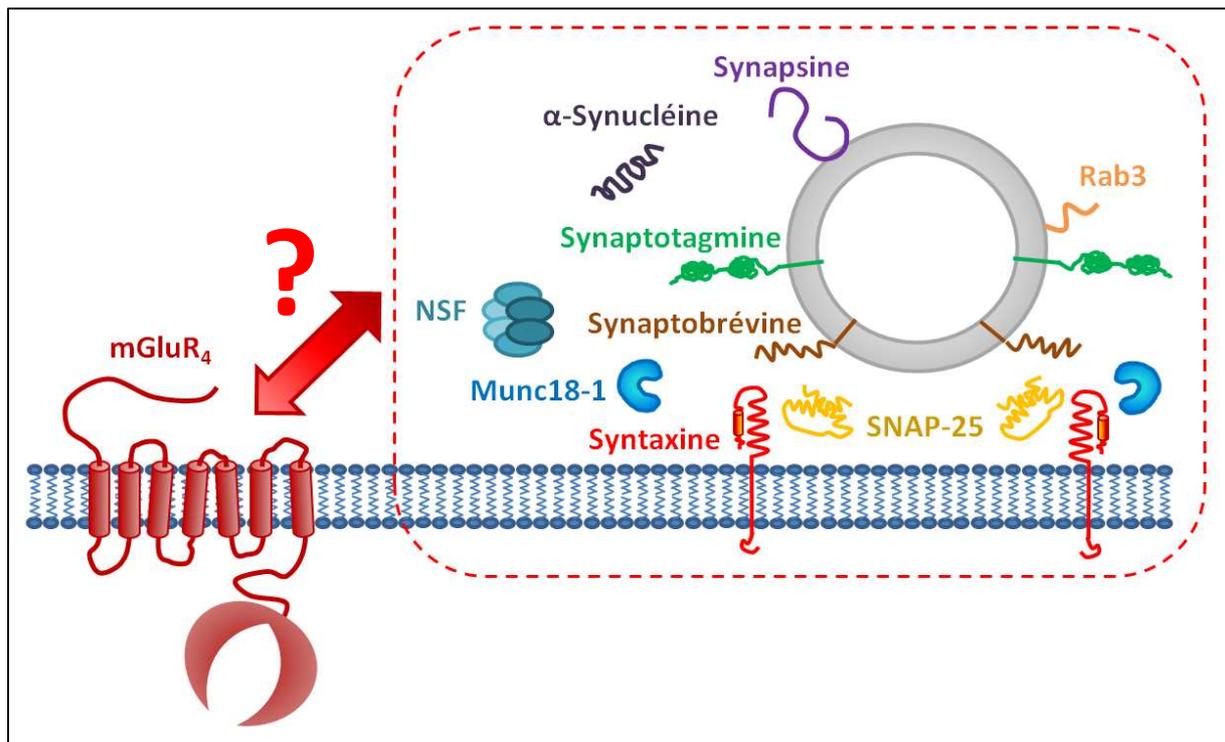


Figure 17. D'après Ramos *et al.*, 2012 : La figure présente les principaux partenaires protéiques des récepteurs mGluR₄ impliqués dans les processus d'exocytose, de mobilisation et de recyclage des vésicules de neurotransmetteur, identifiés par co-immunoprécipitation avec utilisation d'anticorps dirigés contre mGluR₄.

On peut de plus ajouter que ces interactions sont dynamiques : il a en effet été montré que les interactions entre mGluR₄ et Munc18-1 ainsi que celles entre mGluR₄ et la protéine MAP1B sont dépendantes de la concentration calcique cytosolique (Nakajima *et al.*, 2009 ; Moritz *et al.*, 2009 ; Figure 18). Ainsi, si le niveau de calcium s'élève suffisamment par rapport à la concentration basale (ce qui est le cas lors de l'arrivée de potentiels d'action au niveau des « boutons synaptiques » conduisant à l'activation des canaux calciques voltage-dépendants présynaptiques), le taux de calmoduline « active » (de par sa liaison aux ions calcium) devient suffisant pour bloquer efficacement ces interactions. Les interactions entre les mGluRs du groupe III et la calmoduline, ainsi que la protéine CaBP1 (Calcium-Binding Protein 1), peuvent, en outre, être bloquées après phosphorylation de ces récepteurs par la PKC (Nakajima, 2011).

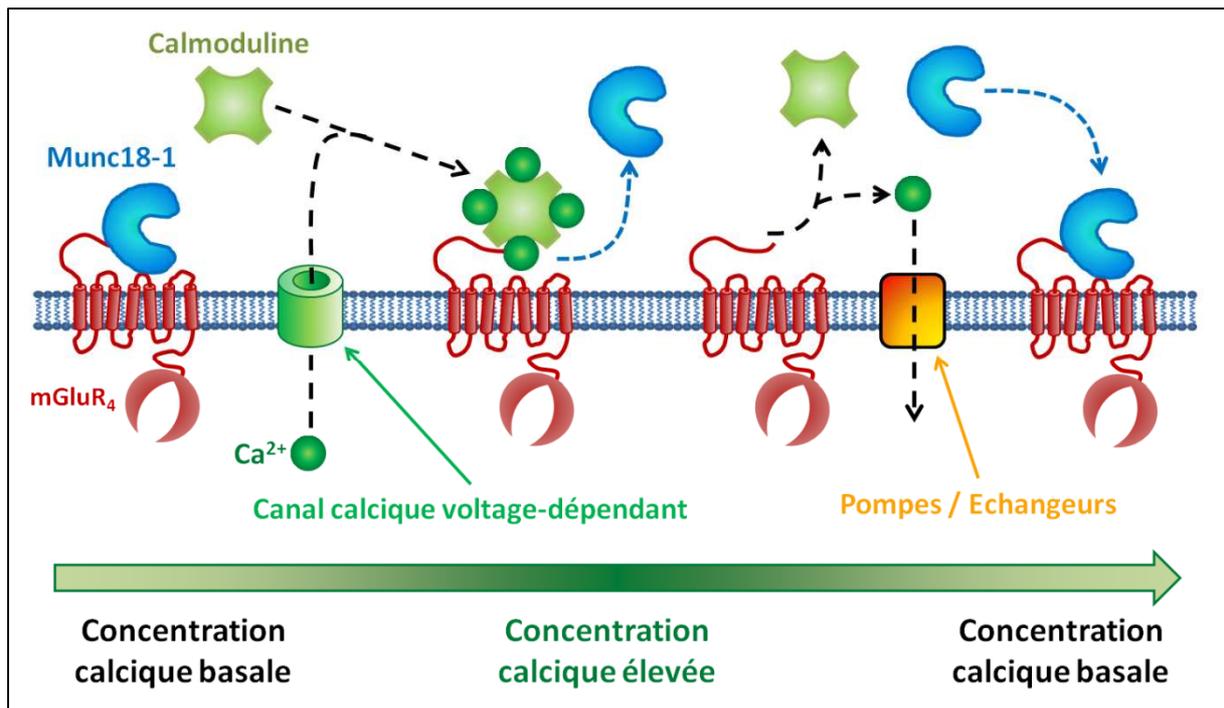


Figure 18. D'après Nakajima *et al.*, 2009 : Dynamique de l'interaction calcium-dépendante mGluR₄/Munc18-1.

4. Rôles fonctionnels connus

Les récepteurs mGluR₄, présents au niveau des zones actives présynaptiques, ont pour rôle principal de réguler négativement la libération antérograde de glutamate. Au sein de l'hippocampe ou du cortex cérébelleux, les mGluRs du groupe III ne sont pas actifs de façon tonique : leur activation nécessite une forte concentration de glutamate dans la fente synaptique, ce qui est le cas lors de stimulations à haute fréquence (supérieure à 10 Hz) des fibres sur lesquels ils sont localisés (Lorez *et al.*, 2003 ; Cosgrove *et al.*, 2010).

Il a également été montré au sein de l'hippocampe que l'activation des récepteurs mGluR₄ et mGluR₈ a pour conséquence, probablement via la diminution de libération vésiculaire de glutamate, d'également retarder la réponse de la cellule postsynaptique à cette libération de glutamate (Cosgrove *et al.*, 2010).

Au sein du cervelet, l'absence de ces récepteurs entraîne la perte, plus ou moins partielle, de certaines formes de plasticité à court terme telles que la facilitation appariée ou la potentialisation post-tétanique (qui se traduit par une augmentation transitoire de l'amplitude des réponses postsynaptiques après stimulation à haute fréquence des afférences présynaptiques) (Pekhletski *et al.*, 1996). Cependant, cette absence ne s'accompagne pas de troubles majeurs de l'activité motrice (Pekhletski *et al.*, 1996).

Les récepteurs mGluR₄ sont également connus pour limiter les phénomènes d'excitotoxicité pouvant conduire à la mort neuronale, phénomène à la base de certaines maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson. L'activation de ces

récepteurs permet en effet de réduire la dégénérescence des neurones de la substance noire (Battaglia *et al.*, 2006), et diminuent de ce fait les symptômes moteurs rencontrés dans la maladie de Parkinson (akinésie, tremblements de repos,...) (Marino *et al.*, 2003 ; Amalric *et al.*, 2013).

De plus, il a été montré qu'une baisse d'expression des récepteurs mGluR₄ contribue au développement de douleurs neuropathiques (Wang *et al.*, 2011), et que l'activation pharmacologique de ces récepteurs constituent un traitement potentiel de celles-ci (Chiechio & Nicoletti, 2012).

Enfin, les récepteurs mGluR₄ constituent également une cible potentielle dans le traitement de l'anxiété (Stachowicz *et al.*, 2004).

5. Hypothèses de travail.

Au cours de ce travail de thèse, je me suis principalement intéressé à l'étude des mécanismes moléculaires mis en jeu par les récepteurs mGluR₄ au sein du cortex cérébelleux, et plus particulièrement dans les boutons synaptiques des fibres parallèles.

Cependant, le manque d'outils pharmacologiques spécifiques des récepteurs mGluR₄ représente un obstacle conséquent quant à l'étude de leur rôle physiologique ainsi que des mécanismes d'action qu'ils mettent en jeu. C'est pourquoi, dans le cadre de collaborations avec les groupes de Francine Acher (Laboratoire de Chimie et Biologie Pharmacologiques et Toxicologiques, Université Paris Descartes, Paris) et de Jean-philippe Pin (Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier), je me suis intéressé dans un premier temps à la caractérisation de nouveaux agonistes orthostériques potentiellement sélectifs de ces récepteurs.

Les fibres parallèles forment des synapses à la fois avec les cellules de Purkinje, cellules principales du cortex cérébelleux, et les interneurons de la couche moléculaire contrôlant l'activité de ces cellules. J'ai ainsi cherché à savoir s'il existait des récepteurs mGluR₄ fonctionnels à la synapse fibre parallèle – interneurone de la couche moléculaire, où si ces récepteurs étaient spécifiquement adressés à la synapse fibre parallèle – cellule de Purkinje.

Enfin, en tirant profit des propriétés singulières de la synapse fibre parallèle – interneurone de la couche moléculaire (notamment le fait qu'une stimulation supraliminaire ne déclenche la libération que d'un faible nombre de vésicules de neurotransmetteur, permettant de démasquer des « échecs à la neurotransmission », qui seront abordés plus en détail dans le chapitre « Matériel et méthodes »), et des données biochimiques et protéomiques publiées conjointement, nous avons exploré les mécanismes de transduction mis en jeu après activation des récepteurs mGluR₄, mécanismes pour une part peu ou pas sensibles au calcium, ceci en complément des cascades de signalisation déjà décrites qui inhibent les influx calciques présynaptiques.

Matériels & Méthodes

I - Animaux

L'ensemble des expériences présentées dans cette thèse a été réalisé sur des préparations *ex-vivo* (tranches) de vermis cérébelleux essentiellement de rats mais également de souris. Les conditions d'élevage et de manipulation de ces animaux respectent les normes françaises (Charte nationale portant sur l'éthique de l'expérimentation animale du 3 avril 2008) et européennes en vigueur (Directives 86/609 du 24 novembre 1986, 6106/10 du 26 Mai 2010 et 2010/63/UE du 22 septembre 2010). Nous avons ainsi veillé à minimiser leurs souffrances ainsi que leur nombre.

Nous avons utilisé des rats mâles de souche Sprague-Dawley (élevage R. Janvier, Laval, France) âgés de 13 à 34 jours post-nataux pour enregistrer d'une part les réponses post-synaptiques des cellules de Purkinje (CP) ainsi que celles des interneurons de la couche moléculaire (ICM), et d'autre part les variations de calcium cytosolique dans les terminaisons des fibres parallèles (FP). Pour ce qui concerne l'étude des réponses post-synaptiques des ICM, seuls des rats âgés de 13 à 18 jours ont été utilisés. En effet, bien que le réseau neuronal cérébelleux ne puisse être considéré comme mature à cet âge là, la fragilité de ces neurones associée à la myélinisation croissante du cervelet, augmentant les tensions exercées sur ce dernier lors de la réalisation des tranches, réduisent considérablement la probabilité de survie des ICM lors de la coupe, chez des rats âgés de plus de 18 jours.

Des souris mâles C57BL/6J (élevage R. Janvier, Laval, France), sv129 (Charles River Laboratoires, L'Arbresle, France, ainsi que des souris mutantes dont le gène codant pour le récepteur mGluR4 a été inactivé (Pekhletski et al., 1996) (fournies par l'équipe de Laurent Fagny, IGF, Montpellier) âgées de 30 à 45 jours post-nataux, ont été également utilisées pour l'enregistrement des réponses post-synaptiques des CP et ICM, ainsi que pour la mesure des variations calciques cytosoliques des FPs.

II - Préparation des tranches

1. Solutions extracellulaires utilisées

Tout au long des expériences présentées, les tranches de cervelet ont été conservées et perfusées dans une solution de Ringer ou LCRA (Liquide CéphaloRachidien Artificiel). Il s'agit d'une solution aqueuse saline comportant du glucose, source d'énergie principale des neurones (après métabolisation en Lactate et Pyruvate par les astrocytes), ainsi que les principaux ions dans des concentrations physiologiques, ceci permettant un bon fonctionnement du réseau neuronal. Cette solution est constamment oxygénée à l'aide d'un mélange de carbogène (95% O₂ - 5% CO₂), ce qui permet également de maintenir son pH autour de 7.35 compte-tenu de la présence de bicarbonates, lorsque cette solution est saturée en carbogène. Enfin, l'osmolarité de cette solution est de 330 milliosmoles, ce qui peut être mesuré aisément à l'aide d'un osmomètre. Le principe de cet instrument repose sur la mesure du delta cryoscopique $\Delta\theta$, qui correspond à la différence entre la température de congélation de l'eau pure et celle de la solution testée, qui sera d'autant plus basse que la

présence de sels et autres molécules osmotiquement actives sera élevée. A l'aide de la loi de Raoult généralisée $\Delta\theta = -K_c \times \text{osmolalité}$ (K_c étant la constante cryoscopique du solvant exprimée en °C.kg/mol, et égale à 1.86 pour l'eau) il est alors possible de déduire l'osmolalité de la solution, et ainsi l'osmolarité de celle-ci, ces 2 propriétés étant égales si le solvant utilisé possède une masse volumique d'1kg par litre, ce qui est le cas de l'eau.

Pour les expériences réalisées dans des conditions de bas ou haut calcium, les modifications d'osmolarité de la solution étaient directement compensées en ajustant la concentration d'un autre cation bivalent, le magnésium.

	Concentration (mM)				
	Conditions « Basales »	Conditions « Bas Calcium »		Conditions « Haut Calcium »	
KCl	3	3	3	3	3
KH ₂ PO ₄	1.15	1.15	1.15	1.15	1.15
MgSO ₄	1.15	1.15	1.15	0.15	0
MgCl ₂	0	1	0.5	0	0
NaCl	138.6	138.6	138.6	138.6	138.6
Glucose	10	10	10	10	10
NaHCO ₃	24	24	24	24	24
CaCl₂	2	1	1.5	2.5	4

Table 6. Composition du Ringer.

Lors de la réalisation des tranches, nous avons utilisé une solution de Ringer « basale » à laquelle nous avons ajouté de la tétradotoxine (TTX) à une concentration de 2µM, afin de bloquer l'activation potentielle des canaux sodiques voltage-dépendant et donc la genèse et la propagation des potentiels d'action, ainsi que du D-APV (antagoniste des récepteurs glutamatergiques ionotropiques NMDA) à une concentration de 50µM, dans le but de limiter les phénomènes d'excitotoxicité suite à la libération de glutamate dans le milieu extracellulaire lors de la préparation des tranches.

2. Réalisation des tranches

Conformément aux recommandations éthiques relatives à l'euthanasie (voir textes ci-dessus), les animaux sont dans un premier temps assommés par un choc modéré au niveau de la tête, puis décapités. Deux incisions sont effectuées de chaque côté de la boîte crânienne afin d'accéder au cervelet, qui est ensuite prélevé délicatement après coupure des pédoncules cérébelleux qui le relie au tronc cérébral. Afin de ne conserver que le vermis (partie centrale du cervelet), les zones paravermiennes sont ensuite éliminées en pratiquant une coupe dans le plan sagittal à l'aide d'une lame de rasoir. Le vermis est collé au support

de coupe dans le plan d'intérêt (sagittal ou coronal selon le type d'expérimentation prévu) à l'aide de cyanolite, placé dans la cuve d'un vibratome (Thermoscientific Microm HM 650V), puis immergé dans la solution de coupe oxygénée avec du carbogène (voir précédemment). La température de cette dernière doit avoisiner zéro degrés Celsius pour permettre de réduire au maximum le métabolisme cellulaire pendant la coupe.

L'arbre dendritique des cellules de Purkinje étant situé dans le plan sagittal ainsi que celui des ICM, nous avons privilégié ce plan de coupe pour l'enregistrement électrophysiologique des réponses évoquées dans ces cellules, par stimulation des fibres parallèles qui, bien que coupées, continuent d'être fonctionnelles et génèrent des potentiels d'action lorsqu'elles sont activées. Par ailleurs, la réalisation de coupes coronales permet de conserver l'intégrité des fibres parallèles, ce qui en fait donc le plan de coupe privilégié lors de la mesure des variations de calcium cytosolique au niveau des multiples boutons synaptiques jalonnant ces fibres (il s'agit de synapses dites « en passant »), suite à leur stimulation.

Des coupes fines de 250µm d'épaisseur sont réalisées. Celles-ci sont transférées à l'aide d'un fin pinceau dans la chambre d'incubation contenant du Ringer oxygéné maintenu à température ambiante. Pour les seules expériences portant sur les ICM les tranches ont subi une pré-incubation pendant une heure à 34°C juste après la coupe, ceci permettant d'éliminer la majorité des cellules moribondes de la tranche.

Après une période « de repos » d'une heure minimum, nécessaire à la restauration de la balance ionique ainsi que des réserves énergétiques, une tranche est ensuite placée dans la chambre d'enregistrement. Celle-ci est maintenue au fond de cette dernière à l'aide de 2 petits barreaux de platine déposés sur chacune de ses extrémités. La chambre d'enregistrement, d'une contenance de 3mL environ, est perfusée en continu avec une solution de Ringer oxygéné et chauffé à 28°C à l'aide d'un thermostat. L'alimentation de la chambre se fait par simple gravité grâce à une pompe péristaltique reliée à seringue. Le débit de perfusion est réglé autour de 2mL par minute. La présence d'une aiguille hypodermique, placée à la surface du bain, reliée à une pompe à vide permet de renouveler constamment le contenu de la chambre tout en régulant le volume de liquide présent.

III - Patch-Clamp

1. Technique utilisée

La technique de Patch-Clamp, qui fut l'objet du prix nobel de médecine/physiologie en 1991, a été mise au point vers la fin des années 1970 par l'équipe d'Erwin Neher et Bert Sakmann (Neher & Sakmann, 1976 ; Hamill et al., 1981). Cette technique permet notamment de mesurer les courants (macroscopiques ou unitaires selon la configuration utilisée) générés dans une cellule. Ainsi, nous avons utilisé cette technique en configuration « cellule-entière » (Figure 1) et en mode voltage imposé, afin d'enregistrer les courants glutamatergiques macroscopiques résultant de l'activation des récepteurs AMPA/Kaïnate

(appelés Courants PostSynaptiques Excitateurs ou EPSCs) des cellules de Purkinje et des ICM, ainsi que les courants spontanés miniatures excitateurs (mEPSCs) plutôt calcium-indépendants des interneurons de la couche moléculaire.

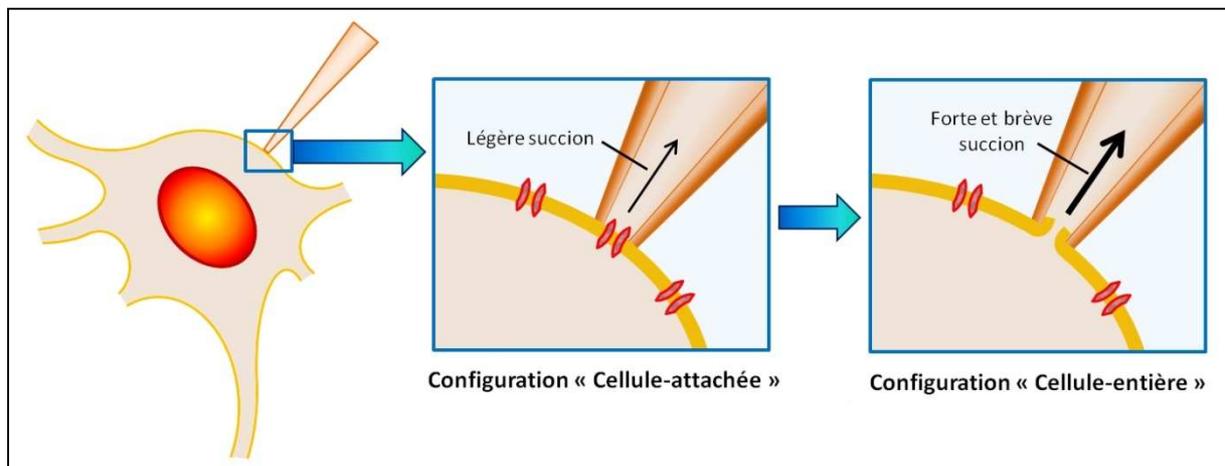


Figure 19. La technique de Patch-Clamp (passage en configuration « Cellule-entière »).

Les microélectrodes utilisées à ces fins sont constituées de pipettes en verre Borosilicate (Harvard Apparatus LTD, Kent, UK) obtenues par double étirement à chaud (d'un tube de verre brut sont issues 2 pipettes), à l'aide d'une étireuse horizontale (Sutter Instrument P-97), remplies d'une solution intracellulaire de composition (en mM) : Cs-gluconate, 140 ; HEPES, 10 ; $MgCl_2$, 4.6 ; GTPNa, 0.4 ; TetraEthylAmmonium, 20 ; $CaCl_2$, 0.1 ; EGTA, 1 ; $ATPNa_2$, 4. Le pH de cette solution est ajusté à 7.3 (à l'aide de CsOH), et son osmolarité est fixée à 300 mOsm/L environ. La pointe des microélectrodes est préalablement polie à l'aide d'une microforge (Modèle MF-830, Narishige, Japan). Ceci permet de ne pas trop endommager la membrane plasmique des cellules avec la pointe de la microélectrode, améliorant ainsi les conditions de scellement.

La microélectrode est placée sur un porte-électrode, et reliée à l'aide d'un fil d'argent chloruré à l'entrée d'un amplificateur AxoPatch-1D (Axon Instrument). Une légère surpression est appliquée au sein de la microélectrode afin d'éviter l'agrégation d'éléments, présents dans le milieu extracellulaire, qui pourrait entraîner un éventuel bouchage de celle-ci, ou empêcher un scellement correct de la cellule cible. Cette microélectrode est ensuite placée dans le bain, ce qui permet alors de mesurer sa résistance (entre 3 et 5 $M\Omega$ pour l'enregistrement des cellules de Purkinje, ou entre 5 et 7 $M\Omega$ pour l'enregistrement des ICM). Du fait de la différence de concentration ionique du milieu intra-pipette par rapport au LCRA circulant dans le bain, il existe une différence de potentiel à l'interface de ces 2 milieux appelée potentiel de jonction. Celle-ci est compensée à l'aide d'un potentiomètre prévu à cet effet, localisé sur l'amplificateur.

La microélectrode est alors amenée au contact de la cellule cible à l'aide d'un micromanipulateur manuel (Burleigh), tout d'abord sous contrôle visuel au travers d'un microscope droit (Axioskop 2, Zeiss) équipé en optique Nomarski, et pourvu de 2 objectifs à

immersion (l'un de grossissement 10x, l'autre de 63x), puis sous contrôle électrique à l'aide de l'oscilloscope. Ainsi, la résistance de la microélectrode de patch est calculée à partir du courant mesuré, suite à l'application d'une différence de potentiel de -10 mV. Lorsque cette résistance augmente, traduisant l'établissement d'un contact entre cette microélectrode et la membrane plasmique de la cellule cible, la pression est relâchée. Ceci entraîne une légère aspiration au niveau de la pointe de la pipette de verre, facilitant la formation d'un scellement avec cette membrane, qui se caractérise électriquement par une résistance d'une valeur supérieure au GigaOhm. Ainsi, le signal visualisé sur l'oscilloscope devient quasiment linéaire, hormis la présence de deux brèves déflexions de sens opposé (l'une présente au début de l'application de la différence de potentiel, l'autre présente à sa fin), correspondant à la charge et la décharge du système capacitif composé de la pipette de patch et de son support. Ces courants capacitifs transitoires sont alors compensés à l'aide d'un groupe de potentiomètres incorporés à l'amplificateur.

Le potentiel de maintien est alors fixé à -70mV pour les cellules de Purkinje ou -60mV pour les ICM (correspondant respectivement à des valeurs proches du potentiel de repos respectif de ces cellules), puis le passage en configuration « cellule-entière » est réalisé à l'aide d'une brève dépression générée au sein de la microélectrode par une légère aspiration. Ceci peut être vérifié électriquement, par l'apparition de courants de charge et de fuite à travers la membrane.

Afin de garantir une résistance Série inchangée, une très légère dépression est conservée au niveau de la pointe de la pipette. Cette résistance est définie comme la somme de la résistance propre à la pipette et de la résistance d'accès (c'est-à-dire la résistance au passage du courant entre l'intérieur de la pipette et l'intérieur de la cellule). La résistance série R_s peut altérer la cinétique des courants enregistrés ainsi que leur amplitude. Dans nos expériences, la R_s a été partiellement compensée (autour de 50-80%, Llano et al., 1991) à l'aide d'un dispositif incorporé à l'amplificateur de patch. L'évolution de celle-ci a été surveillée par la mesure régulière du courant suite à l'application d'un saut hyperpolarisant de -10mV. Si la valeur de la résistance série était trop importante (d'une valeur estimée supérieure à 30 M Ω), les enregistrements étaient arrêtés.

Dans cette configuration, le courant mesuré correspond au courant injecté par l'amplificateur, afin de maintenir la différence de potentiel à la valeur choisie par l'expérimentateur (mesurée entre l'électrode de patch et une électrode de référence située dans le bain).

De plus, afin de n'enregistrer que les événements excitateurs liés à la libération de glutamate au niveau des terminaisons synaptiques des fibres parallèles, nous avons ajouté systématiquement pour chaque expérimentation 10 μ M de Bicuculline Methiodide (antagoniste des récepteurs GABA_A, Tocris Bioscience) au LCRA perfusé dans le bain.

Enfin, il faut noter que le milieu intra-pipette et le milieu intracellulaire étant en contact, il se produit une dialyse du cytoplasme, qui de ce fait altère certains processus cellulaires importants. Pour compenser au moins partiellement cette dialyse et recréer en partie des conditions proches des conditions cytosoliques physiologiques, un ajout d'ATP et de GTP dans la solution intracellulaire a été fait systématiquement pour préserver une activité métabolique suffisante.

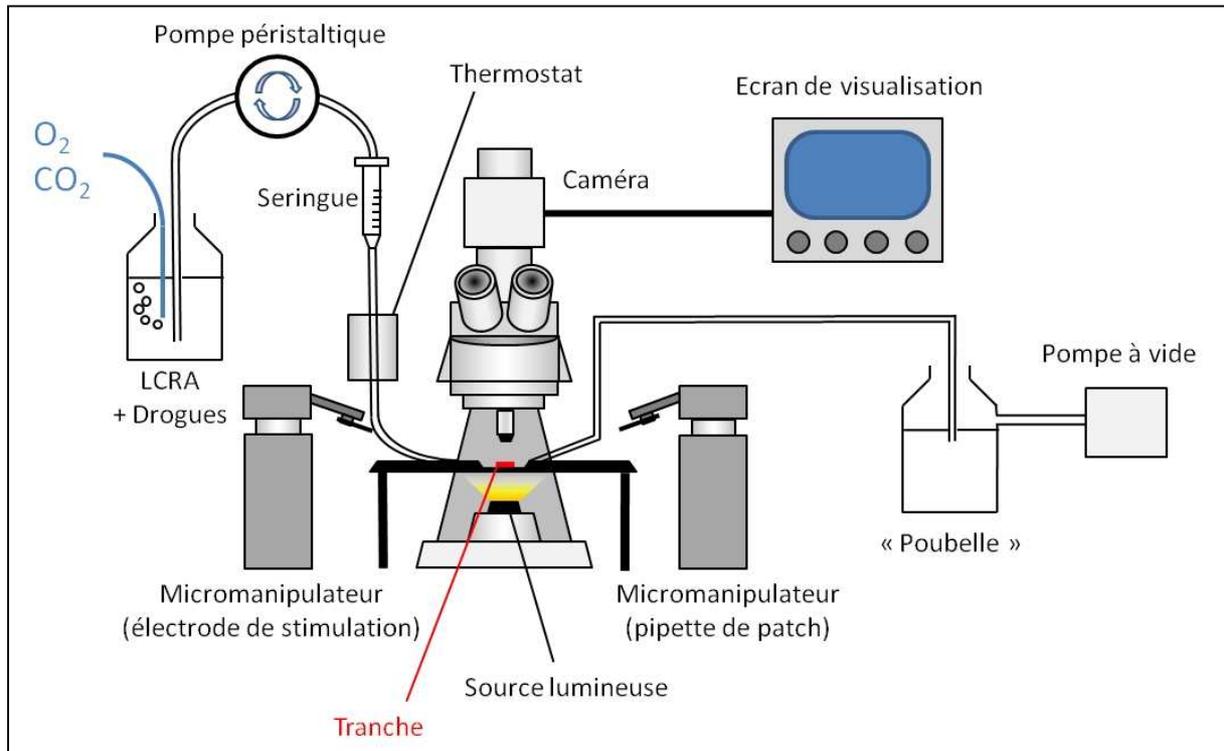


Figure 20. Dispositif expérimental utilisé lors des enregistrements électrophysiologiques.

2. Stimulation extracellulaire des Fibres Parallèles pour l'obtention de réponses évoquées au sein des CP et des ICM

Les EPSCs enregistrés au sein des CP et des ICM sont obtenus par stimulation des fibres parallèles à l'aide d'une électrode monopolaire, composée d'une pipette en verre remplie de LCRA et d'un fil d'argent chloruré. Cette électrode permet de délivrer des chocs électriques, d'une durée de 0.2 ms, entre la pointe de celle-ci et une seconde électrode immergée dans le bain. L'électrode de stimulation, placée au contact de la tranche au niveau de la couche moléculaire du cortex cérébelleux, est reliée à une unité de stimulation qui permet de définir la durée et l'intensité des chocs électriques. La fréquence de ceux-ci est, quant à elle, déterminée au sein du logiciel d'acquisition qui pilote le déclenchement de l'unité de stimulation, via une connexion prévue à cet effet.

Une cellule de Purkinje mature est à la fois afférentée par les fibres parallèles au sein de la couche moléculaire et par une fibre grimpante qui se projette plutôt sur la partie proximale de son arbre dendritique. Afin d'éviter au maximum le parasitage des réponses

évoqués par stimulation de la fibre grimpante (de type « tout ou rien » et d'amplitude supérieure au nanoAmpère) nous avons placé l'électrode de stimulation au milieu de la couche moléculaire, en position latérale par rapport au corps cellulaire de la cellule de Purkinje d'intérêt.

Les ICM, quant à eux, ne sont afférentés que par les fibres parallèles en plus de leurs propres collatérales. Du fait du faible volume de leur arborisation dendritique, l'électrode de stimulation est placée à proximité du corps cellulaire de ceux-ci, c'est-à-dire à une distance d'environ 50µM.

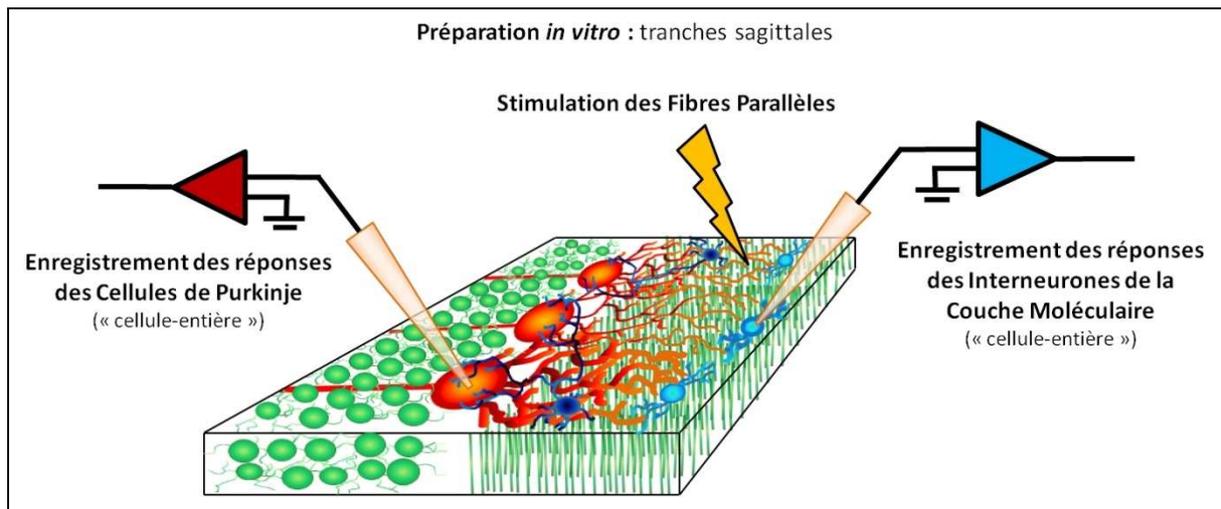


Figure 21. Représentation schématique de la technique de patch-clamp appliquée à des préparations *in vitro* de cervelet (tranches).

Dans notre cas, chaque stimulation est constituée d'un saut hyperpolarisant de -10mV d'une durée de 180ms délivré par l'amplificateur de patch. A ce saut hyperpolarisant s'ajoutent par le biais de l'unité de stimulation, deux décharges électriques dépolarisantes d'une durée de 0.2ms, d'une amplitude réglable de quelques dizaines de Volts, séparés de plusieurs dizaines de millisecondes (20ms en ce qui concerne les ICM, et 40ms pour les cellules de Purkinje en raison de la cinétique plus lente de leurs réponses). Enfin, chaque stimulation est délivrée à une fréquence de 0.167 Hz.

3. La Facilitation appariée (Paired-Pulse Facilitation, PPF)

La Facilitation appariée (ou Paired-Pulse Facilitation, PPF) est une forme de plasticité à court terme typique des synapses à faible probabilité de libération telles que les synapses FP-CP (Atluri & Regehr, 1996) et FP-ICM (Atluri & Regehr, 1998). Cette PPF se traduit, lors de l'utilisation de deux stimulations suffisamment rapprochées (espacées dans notre cas de 20ms en ce qui concerne les ICM ou de 40ms pour les CP), par une augmentation transitoire de l'efficacité synaptique lors de la seconde stimulation (Figure 22.A et B).

La principale hypothèse, à ce jour, tente d'expliquer son origine par deux mécanismes complémentaires. D'une part, la probabilité de libération des synapses concernées doit être

suffisamment faible pour que la quantité de vésicules de neurotransmetteur prête à être libérée lors de la seconde stimulation soit supérieure à celle disponible lors de la première stimulation.

D'autre part, cette facilitation reposerait sur une augmentation transitoire, mais néanmoins prolongée, de la concentration calcique présynaptique (Figure 22.C).

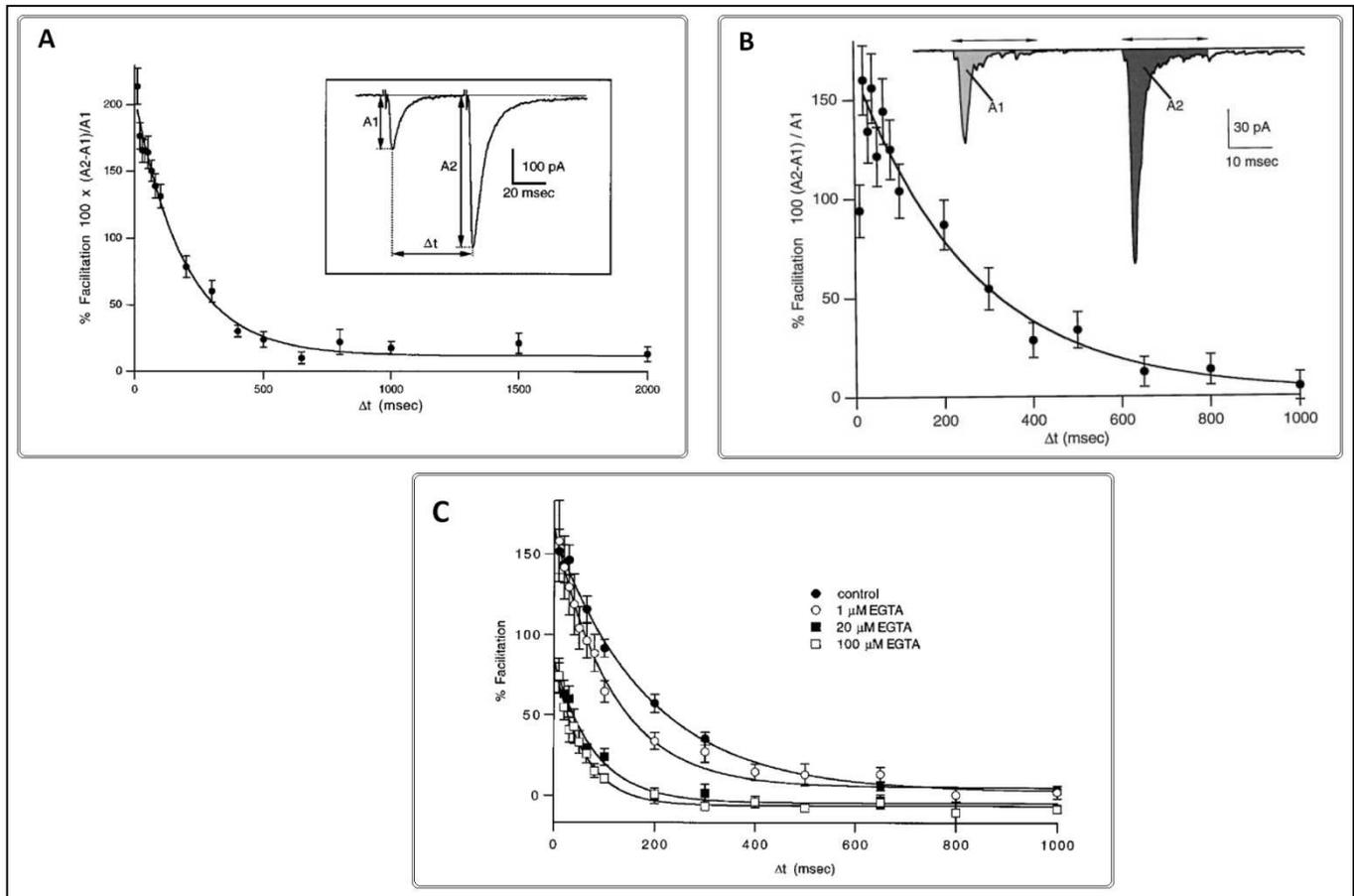


Figure 22. La facilitation appariée (PPF) (D'après Atluri & Regehr, 1996 ; Atluri & Regehr, 1998). **A** – Illustration du phénomène de PPF à la synapse Fibre Parallèle – Cellule de Purkinje. **B** – Illustration du phénomène de PPF à la synapse Fibre Parallèle – Interneurones de la couche moléculaire. **C** – Influence du calcium intracellulaire sur la PPF.

L'arrivée d'un potentiel d'action au niveau des terminaisons présynaptiques permet l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants, entraînant de ce fait une entrée de calcium, nécessaire à l'exocytose des vésicules de neurotransmetteur. Afin de maintenir l'homéostasie calcique, nécessaire au bon fonctionnement des synapses, ce calcium doit être rapidement tamponné dans l'élément présynaptique. Ceci est notamment réalisé à l'aide de pompes présentes au niveau d'organites responsables du stockage intracellulaire du calcium, comme les pompes SERCA (situées sur la membrane du réticulum endoplasmique), et au sein de la membrane plasmique : un échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), qui bien qu'ayant une faible affinité pour le calcium possède une forte capacité d'extraction, ainsi qu'une $\text{Ca}^{2+}/\text{ATPase}$ (PMCA), dont la vitesse d'extraction est au contraire plus lente

malgré une forte affinité pour ces ions. Cependant, il a été montré que des fortes concentrations en calcium entraînent la saturation des NCX (Lee et al., 2007), réduisant ainsi la vitesse d'extraction de celui-ci. Ainsi, lors de l'arrivée d'un second potentiel d'action d'intensité similaire au premier, si celui-ci est suffisamment rapproché, il peut rester du calcium résiduel sous-membranaire (Zucker & Regehr, 2002) qui s'ajoutera alors à une nouvelle entrée de calcium via les canaux calciques sensibles au potentiel (Kreitzer & Regehr, 2000). Il s'ensuit une augmentation de la probabilité de libération de neurotransmetteur lors de l'arrivée du second potentiel d'action, entraînant une libération accrue de vésicules de neurotransmetteur, et par conséquent une augmentation de l'amplitude de la seconde réponse postsynaptique par rapport à la première (Cooper et al., 1996).

Ainsi, la mesure de cette PPF permet en théorie de cibler l'origine, pré ou postsynaptique, d'un mécanisme observé sur le versant postsynaptique.

4. Propriétés des réponses évoquées enregistrées aux synapses Fibre parallèle - cellule de Purkinje et Fibre parallèle - Interneurone de la couche moléculaire

Bien que les réponses post-synaptiques évoquées au sein des ICM ou des cellules de Purkinje aient la même origine, à savoir la stimulation des Fibres Parallèles à l'aide d'une impulsion électrique d'amplitude et de durée fixée grâce à un stimulateur, leurs propriétés sont très différentes (Figure 23).

Ainsi, les EPSCs globaux évoqués enregistrés au sein des cellules de Purkinje sont de grande amplitude, très reproductibles, avec une durée moyenne autour de 30ms. Au contraire, ces mêmes réponses évoquées au sein des ICM ont une plus faible amplitude, sont brèves (autour de 4ms), et très variables aussi bien au niveau de leur délai d'apparition que de leur amplitude (Rancillac & Barbara, 2005).

Ceci peut s'expliquer au moins en partie par la différence d'arborisation dendritique de ces deux types de cellules. En effet, si l'arborisation dendritique des cellules de Purkinje est très développée, ce n'est pas le cas des interneurons de la couche moléculaire, qui seront de ce fait moins afférentés par les fibres parallèles. L'élimination du glutamate ambiant nécessiterait donc plus de temps au sein de l'arbre dendritique d'une cellule de Purkinje, ce qui serait en grande partie responsable de la différence de cinétique entre les EPSCs des cellules de Purkinje et ceux des ICM (Barbour et al., 1994).

De plus, une stimulation supraliminaire peut déclencher la libération de vésicules de glutamate à partir de plusieurs sites de relargage au sein d'une même synapse FP-CP (Foster et al., 2005), tandis qu'une même stimulation supraliminaire ne déclenchera la libération de vésicules de glutamate qu'à partir d'un nombre restreint de sites au sein d'une synapse FP-ICM (Crowley et al., 2007).

Ainsi, le nombre restreint d'afférences des fibres parallèles sur les ICM, associé au mode de libération de vésicules de glutamate à ces synapses, ainsi qu'à leur faible probabilité de

libération de neurotransmetteur, permet de démasquer une propriété particulièrement intéressante : les échecs à la neurotransmission. Ces échecs se traduisent électrophysiologiquement par une absence de réponse postsynaptique à la suite d'une stimulation supraliminaire. On peut également noter que le nombre de ces échecs diminue lorsque la fréquence de stimulation augmente, jusqu'à devenir minimal pour une fréquence de stimulation supérieure à 60Hz (Rancillac & Barbara, 2005).

De ce fait, il existe à ces synapses un certain taux d'échecs à la neurotransmission facilement mesurable. En utilisant une fréquence de stimulation de 0.167Hz dans des conditions calciques physiologiques (c'est-à-dire avec une concentration calcique extracellulaire de 2mM), nous avons mesuré un taux d'échecs en moyenne de $16 \pm 3 \%$ (n=10).

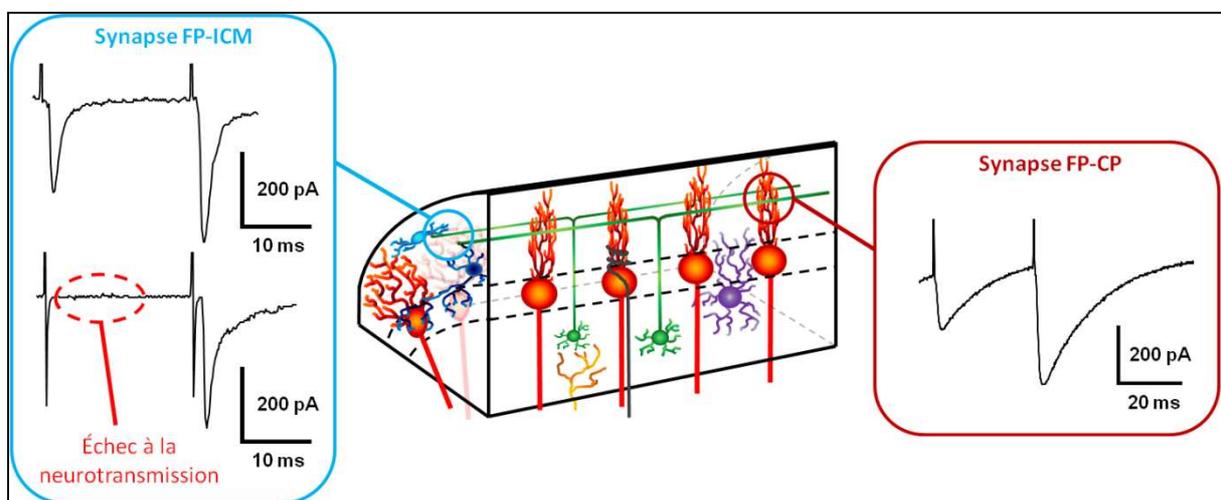


Figure 23. Exemples de réponses évoquées aux synapses Fibre Parallèle – Interneurones de la Couche Moléculaire et Fibre Parallèle – Cellule de Purkinje, et illustration du phénomène d'échecs à la neurotransmission.

5. Mesure des Courants PostSynaptiques Excitateurs miniatures (mEPSCs)

Il est communément admis dans la littérature que l'étude des courants postsynaptiques miniatures, dans notre cas excitateurs (mEPSCs), en termes de variations de fréquence d'apparition et/ou d'amplitude, constitue des éléments solides pour déterminer l'origine pré ou postsynaptique d'un phénomène.

Les mEPSCs sont des événements résultant de la libération de neurotransmetteurs suite à la fusion spontanée de vésicules de neurotransmetteur (Fatt & Katz, 1952). De manière intéressante, les mécanismes sous-tendant ces phénomènes d'exocytose spontanée semblent différer de ceux mis en place lors d'une exocytose évoquée. En effet, les vésicules recrutées lors d'une exocytose spontanée proviennent d'un pool distinct de celles mobilisées après l'arrivée d'un potentiel d'action au niveau des terminaisons synaptiques (Sara et al., 2005). Ce phénomène de libération vésiculaire spontanée a été longuement décrit comme étant en grand partie indépendant des concentrations calciques intra et extracellulaires

(Katz & Miledi, 1963 ; Dale & Kandel, 1990; Scanziani et al., 1992; Dittman & Regehr, 1996), ce qui n'est pas le cas de la libération vésiculaire évoquée.

Des études menées sur des souris dont les gènes codant pour la synaptotagmine 1 (Geppert et al., 1994) ou les complexines I et II (Reim et al., 2001) ont été inactivés, confortent cette hypothèse. Celles-ci démontrent que l'absence de ces protéines, dont l'activité calcium-dépendante est indispensable au déclenchement d'une libération évoquée de vésicules, n'altère aucunement l'exocytose spontanée.

Cependant, si le processus de libération spontanée de vésicules en lui-même semble être plutôt calcium-indépendant, la régulation de celle-ci fait appel à des protéines dont l'action est calcium-dépendante, telles que la Doc2b (Groffen et al., 2010) et la Synaptotagmine-12 (Maximov et al., 2007). De plus, il a récemment été montré au sein de neurones d'hippocampe en culture, que le phénomène d'exocytose spontanée est en partie (environ 50%) dû à l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants essentiellement de type R, même lorsque les cellules sont au repos (Ermolyuk *et al.*, 2013).

D'un point de vue technique, nous avons enregistré ces courants en réalisant des acquisitions continues sur des fenêtres temporelles de 5 minutes, en présence de 0.5µM de tétrodontoxine (TTX) afin de bloquer les canaux sodiques voltage-dépendants, dans le but d'éliminer l'activité potentiel d'action-dépendante, et de 10µM de Bicuculline Methiodide afin de ne conserver que les courants excitateurs.

6. Analyse des données électrophysiologiques

Les réponses postsynaptiques évoquées ont été enregistrées à l'aide du logiciel Acquis1 développé par Gerard Sadoc (Unité de Neurosciences Information et Complexité, CNRS, Gif-sur-Yvette). L'analyse de ces EPSCs, ainsi que le moyennage des traces ont été réalisés à l'aide de ce logiciel à la fois « on- et off-line ». L'amplitude de chaque EPSC, aussi bien pour la réponse à la première stimulation que pour la réponse à la seconde stimulation, a été calculée en mesurant l'amplitude maximale de chaque pic de courant pour chaque trace individuelle brute. Pour une cellule donnée, ces amplitudes ont été ensuite reportées dans un tableau en fonction du temps, permettant d'obtenir la cinétique d'évolution de celles-ci en conditions contrôles et suite à différents traitements. La PPF a été analysée sur chaque trace comme étant le rapport de l'amplitude de la seconde réponse divisée par celle de la première réponse. Chaque expérience a été ensuite répétée plusieurs fois afin d'obtenir des résultats statistiquement représentatifs.

L'analyse des mEPSCs, dont l'enregistrement a été réalisé à l'aide du logiciel Elphy (Gerard Sadoc), a quant à elle été effectuée à l'aide du logiciel Clampfit® (Axon™). La détection des événements a été réalisée à l'aide d'un modèle de réponse typique des ICM, sous contrôle visuel. L'ensemble des caractéristiques de ces réponses (amplitude, durée,...) était stocké dans un tableau. La fréquence des mEPSCs a été enfin déterminée par le rapport du nombre d'événements sur la fenêtre temporelle d'acquisition (en secondes).

Ces données ont été ensuite importées dans le logiciel Excel (Microsoft® Office), à l'aide duquel l'ensemble des données concernant une même série expérimentale a été moyenné, en prenant l'erreur standard à la moyenne (SEM, définie comme l'écart-type divisé par la racine carrée du nombre d'expériences réalisées au sein de la série) comme indice de la variabilité. Ceci nous a ainsi permis de visualiser le comportement global de chaque population de cellules face à un traitement pharmacologique donné.

D'un point de vue statistique, nous avons réalisé des tests de Student (t-test) appariés afin de comparer différentes conditions au sein d'une même série expérimentale, ou non appariés lors de la comparaison de deux séries de données issues de deux populations différentes (par exemple, pour comparer les valeurs obtenues en condition contrôle pour deux séries expérimentales distinctes), après avoir vérifié que ces données étaient bien distribuées selon une loi normale.

IV - Les peptides TAT

Des études biochimiques menées précédemment au sein du laboratoire, portant sur le réceptosome des récepteurs mGluR₄ natifs, ont permis d'identifier de nombreux partenaires protéiques (Ramos et al., 2012), certains étant impliqués dans les processus d'exocytose.

Nous nous sommes donc particulièrement intéressés aux implications de ces interactions, plus ou moins directes, dans les actions régulatrices de la neurotransmission des récepteurs mGluR₄.

Deux séquences peptidiques situées sur la partie intracellulaire de ces récepteurs lui permettent d'interagir avec ses différents partenaires protéiques impliqués dans les mécanismes d'exocytose (Figure 24.A) : il s'agit de la seconde boucle intracellulaire (séquence peptidique NQ-25) et de la partie proximale de la queue C-terminale (séquence peptidique AN-23) (Ramos et al., 2012). Nous avons donc décidé de tenter de bloquer les interactions putatives entre mGluR₄ et ses partenaires protéiques endogènes au niveau de ces deux régions spécifiques par l'addition de deux peptides exogènes correspondant respectivement aux séquences peptidiques de ces deux régions, associés à une séquence peptidique TAT (pour « Trans-Activating Transcriptional activator peptide ») issue du virus de l'immunodéficience humaine VIH. Ces deux séquences exogènes associées à la partie « TAT » peuvent ainsi passer à travers les membranes biologiques dont celles des présynapses où sont présents les mGluR₄, entrant alors en compétition avec ses propres séquences endogènes (Schwarze et al., 1999 ; Ster et al., 2009) (Figure 24.B). Nous avons également utilisé une version « scrambled » de ces peptides (dont les acides aminés étaient positionnés aléatoirement au sein de la séquence) ainsi que la séquence peptidique TAT seule comme contrôles.

Les mécanismes permettant l'internalisation de ces peptides ne sont pas, à l'heure actuelle, complètement élucidés (Heitz et al., 2009). Cependant, il a été montré que le peptide TAT, via la formation d'un complexe avec une protéine « cargo », pourrait

déclencher un processus d'endocytose, processus facilité par l'aggrégation de ces complexes au niveau de microdomaines membranaires via l'interaction des peptides TAT avec certains GlycosAminoGlycanes (GAG) situés à la surface des cellules (Console et al., 2003).

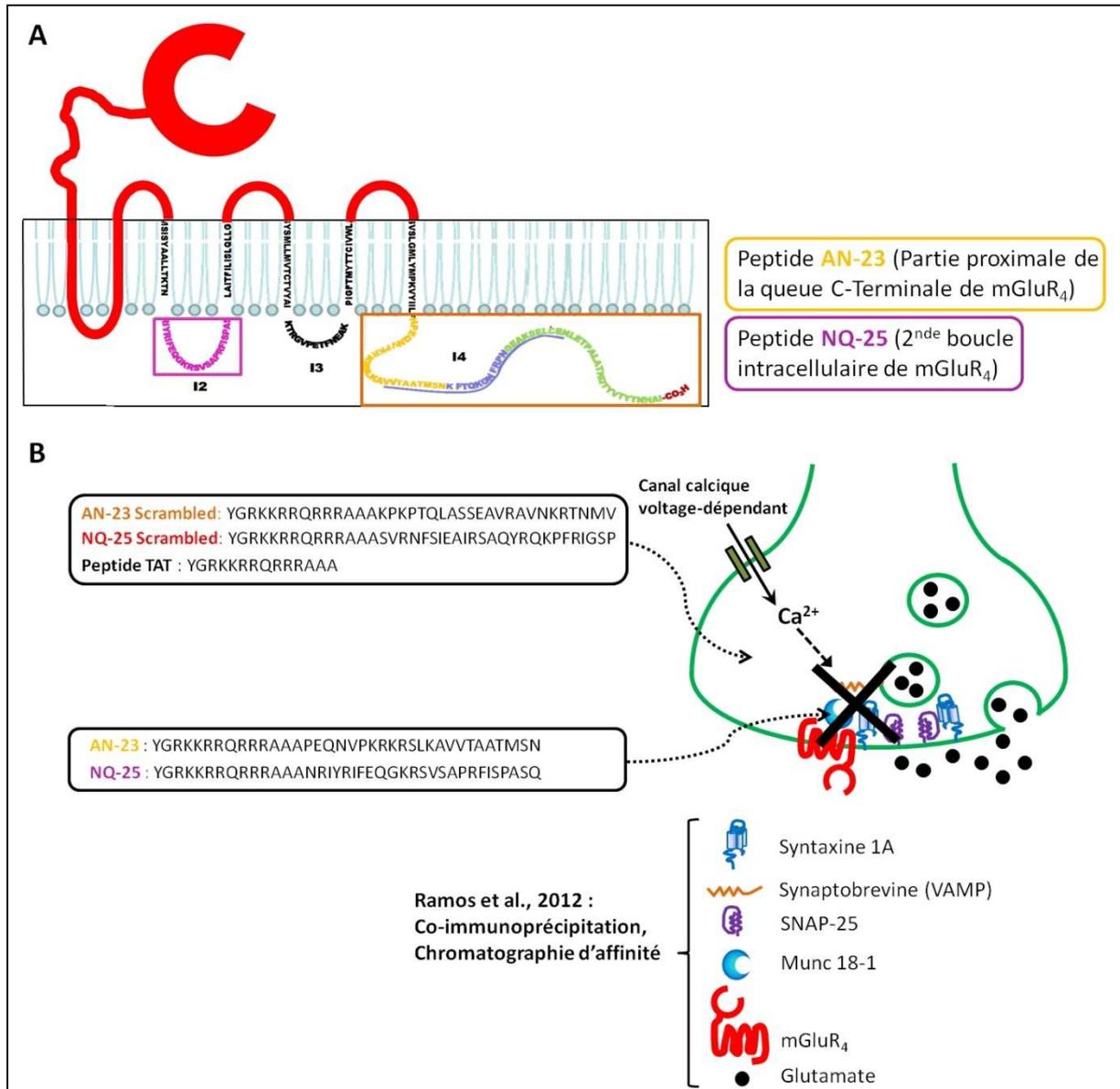


Figure 24. A – Séquences peptidiques impliquées dans les interactions mGluR₄/protéines impliquées dans les mécanismes d'exocytose. **B** – Représentation schématique de l'action des peptides AN-23, NQ-25, ainsi que de leur version « Scrambled » et du peptide TAT dans le compartiment présynaptique.

Bien que le peptide TAT comporte initialement 80 acides aminés, il a été montré que seuls 11 acides aminés étaient nécessaires pour son internalisation (⁴⁷YGRKKRRQRRR⁵⁷) (Vivès et al., 1997). Ce sont ces 11 acides aminés que nous avons couplé aux séquences AN-23 et NQ-25, après ajout de 3 alanines, ainsi qu'à leur version « scrambled ».

Toutes les séquences peptidiques utilisées dans nos travaux ont été synthétisées par GeneCust (Luxembourg).

V - Fluorométrie Calcique

1. Technique utilisée

A l'heure actuelle, il est très difficile voire impossible d'accéder au compartiment présynaptique à l'aide de la technique de Patch-Clamp, à de rares exceptions près (synapse géante du Calice de Held (Lin et al., 2012), et terminaisons des Fibres Moussues au sein de l'hippocampe (Bischofberger et al., 2002)). Bien que l'analyse des courants miniatures, ainsi que la mesure de la PPF, grâce à cette technique électrophysiologique puissent théoriquement nous apporter des informations sur l'activité du compartiment présynaptique, il ne s'agit que de mesures indirectes. Nous avons donc opté, au sein du laboratoire, pour l'utilisation d'une technique permettant d'accéder directement à ce compartiment : la fluorométrie calcique, mise au point par David Tank et ses collaborateurs (Regehr & Tank, 1991 ; Regehr & Atluri, 1995).

Cette méthode repose sur l'utilisation d'une sonde calcique fluorescente à faible affinité (K_D de $9.7\mu\text{M}$), le Fluo4FF-AM (dont le spectre d'excitation se trouve autour de 485 nm, et celui d'émission aux alentours de 530 nm). Le groupement AM (Acétoxy-méthyl-ester) lui permet de traverser les membranes plasmiques des cellules. Au sein de ces cellules, ce groupement est ensuite clivé par des estérases endogènes, piégeant alors le fluorochrome dans le milieu intracellulaire (Figure 25).

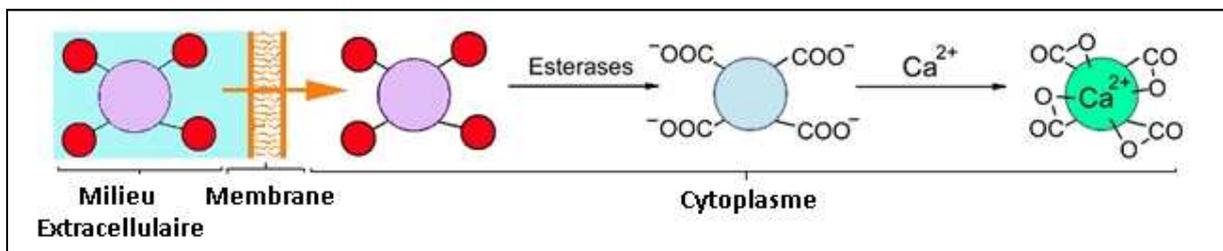


Figure 25. Principe de la dé-estérification des fluorochromes-AM.

Une solution de Fluo4FF-AM à une concentration de $100\mu\text{M}$ est réalisée à partir d'une solution mère contenant 80% de DMSO (DiMéthyl SulFOxide) et 20% d'acide pluronique (permettant de faciliter la solubilisation du fluorochrome) diluée dans du LCRA.

Celle-ci est localement perfusée à l'aide d'une pipette d'éjection (reliée à une pompe délivrant une légère surpression) placée au contact de la couche moléculaire d'une tranche coronale de vermis cérébelleux, permettant de préserver au mieux l'intégrité des fibres parallèles.

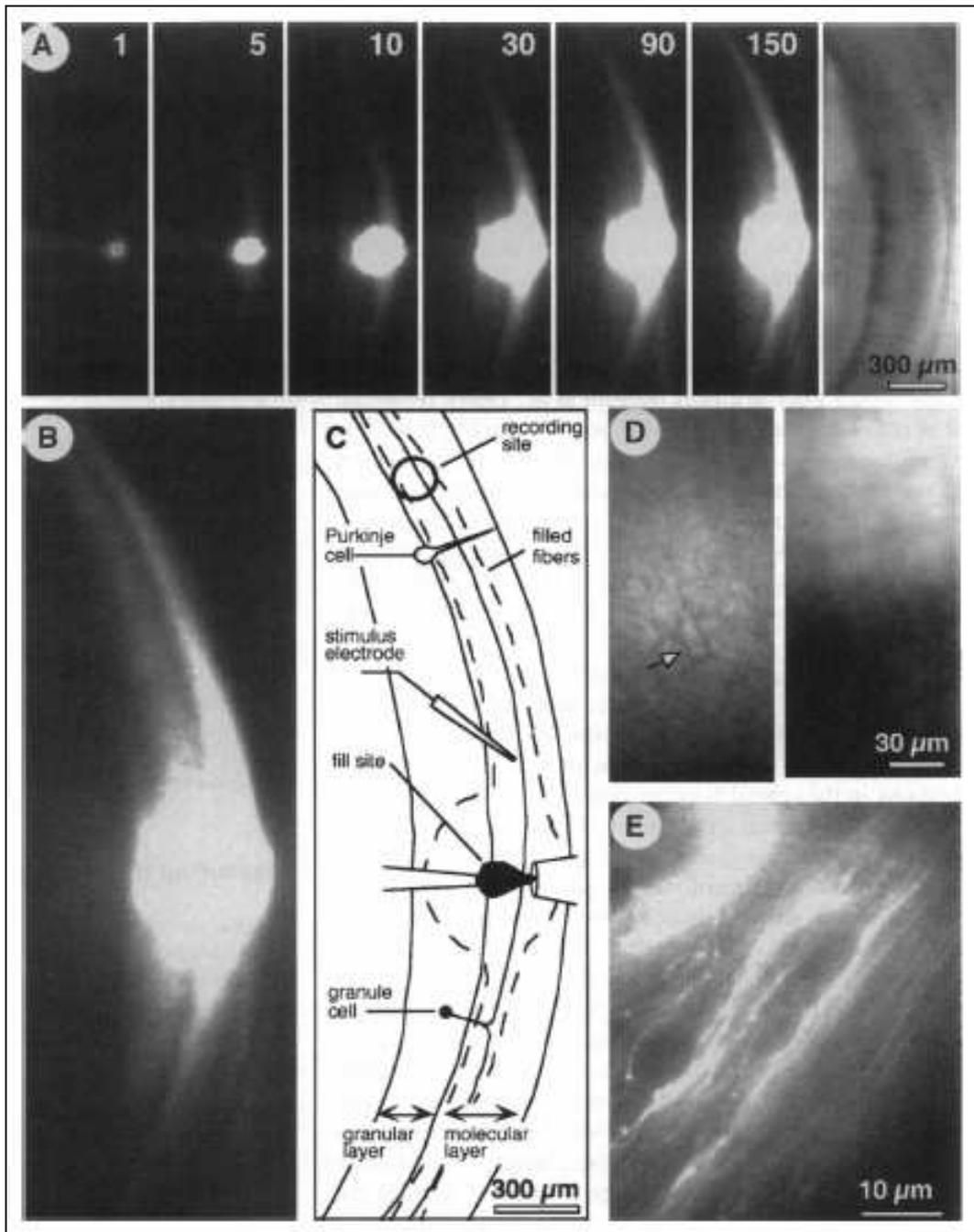


Figure 26. Marquage des Fibres Parallèles par le Fluo-4FF-AM (D'après Atluri & Regehr, 1995). **A** – Évolution de la fluorescence pendant ($t=0$ jusqu'à 30 minutes) le marquage d'une région de la couche moléculaire, puis après diffusion du fluorochrome ($t=30$ à 150 minutes). **B** – Marquage fluorescent des FP après 150 minutes, à fort grossissement. **C** – Représentation schématique de B avec indications sur le positionnement de l'électrode de stimulation ainsi que de la fenêtre de mesure. **D** – Agrandissement de la région marquée, en lumière blanche (gauche) ou par faisceau lumineux de fluorescence (droite). **E** – Localisation du marquage fluorescent au sein de la couche moléculaire à fort grossissement : seules les Fibres Parallèles sont marquées, contrairement aux corps cellulaires des autres neurones de la couche moléculaire.

Une seconde pipette dite « d'aspiration », reliée à une pompe à vide, est placée légèrement au dessus de la pipette d'éjection. Ceci permet une meilleure focalisation du marquage, ainsi qu'une meilleure élimination du fluorochrome qui ne diffuse pas dans la tranche.

Après une période de 30 minutes environ, le fluorochrome a pu diffuser à l'intérieur des fibres parallèles sur plusieurs centaines de μm (Figure 26).

Une fenêtre de mesure d'environ $30 \times 50 \mu\text{m}$ est alors définie sur la trajectoire des fibres marquées, à distance du site de chargement. Ceci permet d'obtenir un très bon rapport signal/bruit, puisqu'à distance du site de chargement il n'y a pas de saturation, la fluorescence basale étant très faible. Ainsi les variations de fluorescence sont dans ces conditions aisément quantifiables.

Une électrode de stimulation, reliée à un stimulateur dont le déclenchement est piloté à travers le logiciel d'acquisition, est ensuite placée sur le trajet hypothétique des fibres d'intérêt, à mi-chemin entre la fenêtre de mesure et le site de chargement.

Une lampe à mercure (Nikon Hg 100W) associée à un filtre d'excitation disposant d'une bande passante de 22nm permet d'émettre un faisceau lumineux de 485 nm, nécessaire pour exciter le fluorochrome.

Le signal émis est ensuite recueilli à l'aide d'un photomètre, après passage à travers un cube d'épifluorescence composé d'un miroir dichroïque DM505 et d'un filtre d'émission 530DF30 (530 nm avec une bande passante de 30 nm), monté sur le même microscope que celui utilisé pour les enregistrements électrophysiologiques. Ce signal, filtré à une fréquence de 200Hz, représente la variation relative de fluorescence $\Delta F/(F-F_0)$, ΔF étant la variation de fluorescence évoquée par stimulation des fibres parallèles, F la fluorescence de base de la tranche, et F_0 l'autofluorescence de la tranche. La mesure de la fluorescence basale de la tranche permet de s'affranchir d'éventuels problèmes liés à la dégradation progressive de la sonde (suite à une illumination d'intensité élevée ou de longue durée) qui peut survenir au cours de l'expérience, bien que rare. Cependant, ceci ne peut limiter la production de radicaux libres suite à cette dégradation, néfastes pour les cellules voisines. Pour cela, un ensemble de filtres d'atténuation ainsi qu'un obturateur électromécanique (Uniblitz, Rochester, New York, USA) sont utilisés afin de limiter au maximum l'intensité et la durée d'illumination. La surface d'illumination est quant à elle optimisée grâce à un diaphragme manuel.

L'acquisition des signaux est effectuée toute les 30 secondes sur une durée d'une seconde, pendant laquelle l'obturateur laisse passer le faisceau lumineux d'excitation. La stimulation des fibres parallèles est déclenchée 200 ms après le début de l'acquisition.

Afin de se placer dans les mêmes conditions que lors des enregistrements électrophysiologiques, nous avons systématiquement ajouté au bain de perfusion des préparations *ex-vivo* de la Bicuculline Methiodide à une concentration de 10 μ M.

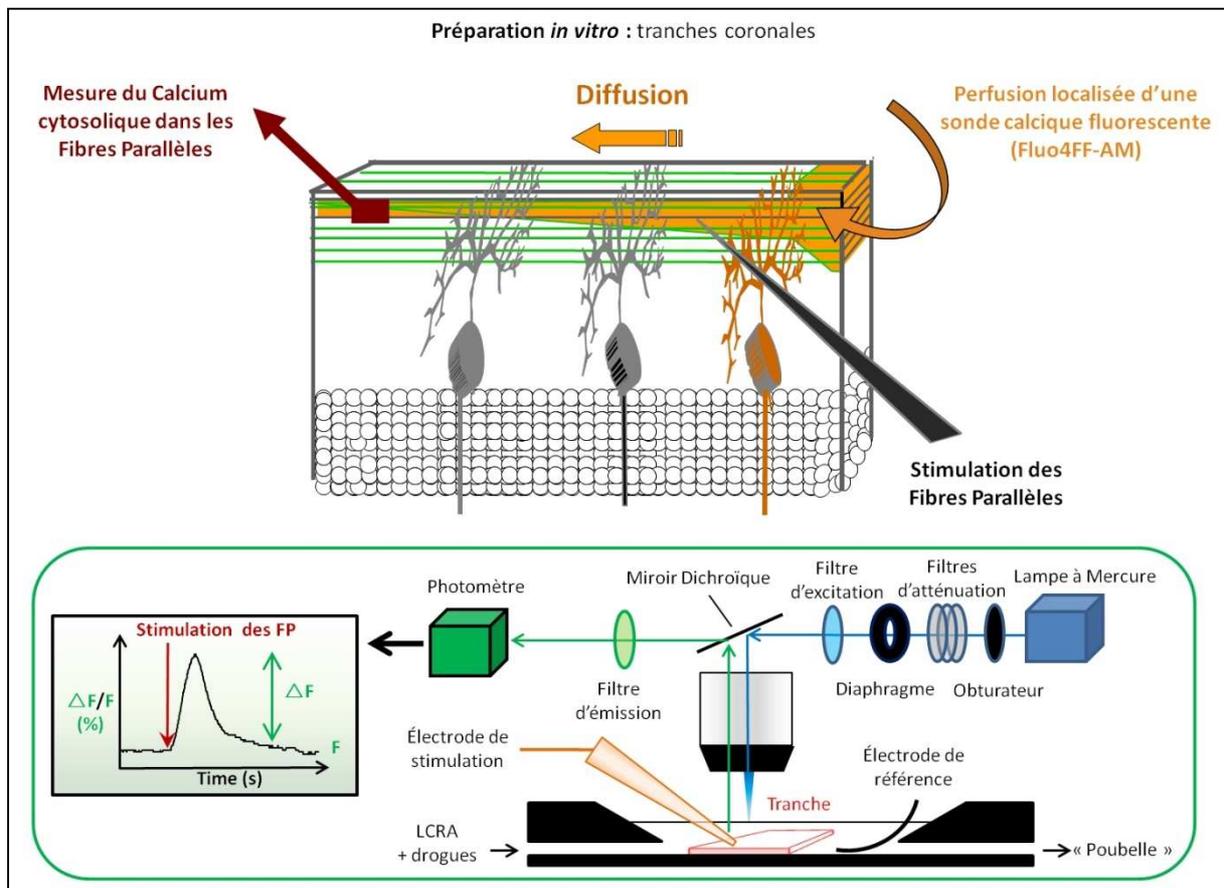


Figure 27. Montage expérimental utilisé lors des enregistrements optiques par fluorométrie.

2. Analyse des données Optiques

De la même manière que lors des enregistrements électrophysiologiques, les données optiques correspondant aux variations relatives de fluorescence quantifiées à l'aide du photomètre ont été analysées on- et off-line au sein du logiciel Acquis1. Pour chaque signal acquis, la valeur du rapport de l'amplitude du pic de fluorescence ΔF divisée par la fluorescence de base F , corrigée de l'autofluorescence F_0 lorsque celle-ci excède 5% de F , était reportée dans un tableau représentant la cinétique d'évolution de cette variation relative de fluorescence en fonction du temps.

L'ensemble des données acquises était ensuite analysé sous Excel. Chaque expérience étant répétée plusieurs fois, la totalité des valeurs obtenues était alors moyennée, avec pour indice de variabilité le SEM. Ceci nous a permis d'obtenir la cinétique d'évolution moyenne de la variation relative de fluorescence, pour un traitement donné.

La comparaison statistique entre les différentes séries expérimentales, sur l'amplitude maximale de la dépression du pic $\Delta F/F$ suite aux différents traitements pharmacologiques, était enfin réalisée à l'aide d'un t-test de Student non-apparié.

Résultats

I – Caractérisation pharmacologique de nouveaux agonistes orthostériques des récepteurs mGluR₄.

1. Introduction.

L'étude des récepteurs mGluR₄ suscite un intérêt grandissant depuis la découverte de modulateurs allostériques positifs sélectifs pour ce sous-type de mGluRs. L'utilisation de ces molécules a non seulement permis de mettre en évidence le rôle neuroprotecteur des récepteurs mGluR₄, mais les a également placé au rang de cibles thérapeutiques prometteuses dans le traitement de certaines pathologies, telles que la maladie de Parkinson, les douleurs neuropathiques et l'anxiété.

Cependant, bien que la liste des PAMs sélectifs pour les seuls récepteurs mGluR₄ ne cesse d'augmenter, les seuls agonistes et antagonistes orthostériques de ces récepteurs commercialisés à ce jour sont des outils à large spectre des mGluRs du groupe III, ce qui constitue une limite majeure à l'étude des mGluR₄.

En effet, comme dit précédemment, bien que les récepteurs mGluR₄ soient le seul sous-type de mGluRs du groupe III fonctionnels dans le cortex cérébelleux, ce n'est pas le cas dans les autres structures cérébrales, rendant leur étude beaucoup plus complexe.

Les deux études présentées ici portent sur la caractérisation pharmacologique de deux nouveaux agonistes orthostériques potentiellement sélectifs des récepteurs mGluR₄: le LSP1-2111 et le LSP4-2022. Mon travail a été de déterminer l'efficacité de ces deux molécules concernant l'activation des récepteurs mGluR₄ natifs sur des préparations *ex vivo* (tranches de cervelet), en comparaison avec les données déjà publiées du L-AP4, agoniste à large spectre des mGluRs du groupe III, très largement utilisé à ce jour.

2. Identification de nouveaux agonistes potentiellement sélectifs des récepteurs mGluR₄.

La majorité des agonistes pour les mGluRs du groupe III connus à ce jour sont des molécules possédant un groupement phosphonate, dont font partie le L-AP4 et le L-SOP. La recherche de nouveaux outils sélectifs pour les récepteurs mGluR₄ a donc été entreprise à partir de ce type de molécules, et plus particulièrement du (S)-PCEP. Le (S)-PCEP possède en effet la particularité de se fixer dans une région du domaine VFT caractérisée par la présence de nombreux résidus spécifiques du sous-type de mGluR du groupe III, bien qu'étant lui-même incapable de faire la différence entre les mGluR₄, les mGluR₆ et les mGluR₈ de par sa structure (Selvam *et al.*, 2010).

De nombreux dérivés aromatiques du (S)-PCEP ont ainsi été développés, dans l'optique d'optimiser ce composé afin qu'il interagisse fortement avec les résidus spécifiques des récepteurs mGluR₄ situés dans leur domaine VFT.

Les composés ayant la plus forte sélectivité pour les récepteurs mGluR₄ ont ensuite été modélisés puis testés sur un modèle du domaine VFT des récepteurs mGluR₄ réalisé à partir de la structure en configuration active et inactive des récepteurs mGluR₁ et mGluR₃.

La synthèse de l'intégralité de ces composés a été réalisée par le groupe de Francine Acher (Université Paris Descartes, Paris).

2.1. Le LSP1-2111, un candidat prometteur ?

La sélectivité de chaque composé pour chaque sous-type de mGluR du groupe III a pu être déterminée au sein d'un modèle *in vitro* : cellules HEK293 transfectées avec les gènes codant pour les différents sous-types de mGluRs du groupe III, couplés à la voie Phospholipase C/IP₃ (Inositol triphosphate) par une protéine Gq chimérique. Ce travail a été réalisé par le groupe de Jean-Philippe Pin (Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier).

Pour ce faire, deux approches différentes ont été mises en œuvre : une méthode de mesure de la production d'IP₃ radiomarqué, et une seconde méthode permettant de mesurer, à l'aide d'une sonde calcique à forte affinité (le Fluo4), la libération de calcium dans le cytosol à partir des stocks intracellulaires induite par la fixation de l'IP₃ sur ses récepteurs.

Les courbes dose-réponse de chaque composé, pour l'ensemble des différents sous-types de mGluRs du groupe III ont été réalisées en utilisant des concentrations allant de 0.1 nM à 1 mM, ce qui a permis de calculer leurs EC₅₀ respectifs (concentration pour laquelle l'effet observé correspond à la moitié de l'effet maximal).

Parmi l'intégralité des composés ainsi testés, deux d'entre eux se démarquent par leur affinité nettement supérieure pour les récepteurs mGluR₄ que pour les autres sous-types de mGluRs du groupe III : le LSP1-2111 et le LSP4-2022.

2.2. Activité pharmacologique du LSP1-2111.

L'ensemble des molécules synthétisées dans cette étude sont des dérivés d'acide aminé portant un groupement phosphonate dans leur chaîne latérale, composés connus comme pouvant être des antagonistes des récepteurs NMDA. Cette activité antagoniste du LSP1-2111 sur ces récepteurs a ainsi été testée sur des ovocytes de Xenope exprimant des récepteurs NMDA comportant les sous-unités GluN1 / GluN2A ou GluN1 / GluN2B. L'IC₅₀ de ce composé (concentration pour laquelle l'effet inhibiteur observé correspond à la moitié de l'effet maximal) a été déterminé respectivement à 1.1 ± 0.3 mM et 2.3 ± 0.3 mM.

De ce fait, le LSP1-2111 ne semble cibler que les mGluRs du groupe III à faible concentration (de l'ordre de plusieurs micromolaires), avec une préférence pour les récepteurs mGluR₄.

Afin d'évaluer l'activité pharmacologique du LSP1-2111 sur les récepteurs mGluR₄ natifs, nous avons mesurés la capacité de ce composé à déprimer les influx calciques présynaptiques évoqués par stimulation des fibres parallèles, ainsi que l'amplitude des courants postsynaptiques excitateurs des cellules de Purkinje également évoqués par stimulation de ces mêmes fibres. Appliqué à une concentration de 100 µM, correspondant à une concentration saturante pour le L-AP4 (Abitbol *et al.*, 2008), le LSP1-2111 déprime de façon réversible l'amplitude de ces courants postsynaptiques excitateurs de 49.2 ± 4.8% et 26.4 ± 2.3% respectivement pour la première et la seconde réponse. Cette baisse est accompagnée d'une augmentation également réversible de l'amplitude de la PPF d'environ 25% (cette PPF ayant une valeur de 2.29 ± 0.11 en conditions contrôle contre 2.91 ± 0.22 après application du LSP1-2111).

Au niveau présynaptique, cette molécule entraîne, pour la même concentration de 100 µM, une dépression des influx calciques également réversible de 12.5 ± 2.12 %.

En utilisant des concentrations allant de 3 µM à 1 mM, nous avons réalisé les courbes dose-réponse du LSP1-2111, calculées selon la formule :

$$\text{Effet dépressant (\%)} = \frac{100}{1 + \left(\frac{EC_{50}}{\text{concentration}}\right)^n}, \text{ n correspondant au coefficient de Hill}$$

(ou coefficient de coopérativité), que nous avons fixé à 1, correspondant à une coopérativité nulle, ce qui signifie que la fixation d'un ligand ne modifie pas l'affinité du récepteur pour celui-ci. Nous avons ainsi pu déterminer son EC₅₀ à 60 µM, soit environ dix fois supérieur à celui du L-AP4 pour les récepteurs mGluR₄ (déterminé à 1.8 µM en ce qui concerne l'inhibition des influx calciques présynaptiques évoqués par stimulation des fibres parallèles, Abitbol *et al.*, 2008).

Selvam C., Lemasson I.A., Brabet I., Oueslati N., Rigault D., Courtiol T., Cesarini S., Mony L., **Bessiron T.**, McLean H., Daniel H., Bertrand H.O., Goudet C., Pin J.P., Acher F. A new series of potent group-III metabotropic glutamate receptors agonists (manuscript en revision à J. Med. Chem).

2.3. Le LSP4-2022.

2.3.1. Affinité du LSP4-2022 pour les récepteurs mGluR₄.

Le deuxième composé sélectionné comme nouvel agoniste potentiel des récepteurs mGluR₄ est le LSP4-2022. Il se distingue de toutes les autres molécules apparentées, y compris du LSP1-2111, par sa sélectivité respectivement 256 fois, 105 fois et 40 fois supérieure pour les récepteurs mGluR₄ que pour les mGluR₈, mGluR₇ et mGluR₆.

De la même façon que pour le LSP1-2111, la détermination de la sélectivité du LSP4-2022 vis-à-vis des différents sous-types de mGluRs du groupe III a été réalisée sur des cultures de cellules HEK293 transfectées avec les gènes codants l'ensemble de ces récepteurs, et couplés à une protéine Gq chimérique.

Afin de vérifier que ces données ne soient pas influencées par l'utilisation d'une voie de signalisation « forcée », des mesures similaires ont été réalisées sur des cellules tsA-201. Ces cellules ont également été transfectées avec les gènes codant pour les différents mGluRs du groupe III, ainsi qu'avec les gènes codant les sous-unités α_1 , β_{1b} , et $\alpha_2\delta_1$ des canaux calciques voltage-dépendants Ca_v2.2. A la différence des cellules HEK293, les protéines G couplées à l'ensemble des mGluRs présents sont des protéines G_{i/o} sensibles à la PTX (toxine pertussique) endogènes. L'amplitude des courants calciques évoqués par stimulation électrique de ces cellules a été mesurée à l'aide de la technique électrophysiologique de Patch-Clamp, ce qui a permis de réaliser les courbes dose-réponse du LSP4-2022 pour chaque récepteur. Les différents EC₅₀ du LSP4-2022 pour chaque sous-type de mGluR du groupe III déterminés à partir des ces courbes sont très proches de ceux déterminés par l'utilisation des cellules HEK293 (table 7).

Récepteur	EC ₅₀ mesuré (μM)	
	Cellules HEK293	Cellules tsA-201
mGluR4	0.11 ± 0.02	0.12 ± 0.03
mGluR6	4.2 ± 0.6	3.68 ± 0.94
mGluR7	11.6 ± 1.9	15.7 ± 3.5
mGluR8	29.2 ± 4.2	51.6 ± 10.6

Table 7. Affinité du LSP4-2022 pour les différents sous-types de mGluRs du groupe III après couplage à des protéines Gq chimériques (cellules HEK293) ou des protéines G_{i/o} endogènes (cellules tsA-201).

2.3.2. Identification du site de fixation du LSP4-2022 sur les récepteurs mGluR₄.

Pour déterminer quels sont les résidus situés dans le domaine VFT des récepteurs mGluR₄ importants pour la fixation du LSP4-2022, des expériences de mutagenèse dirigée

ont été réalisées. Il a été ainsi montré que la partie du LSP4-2022 mimant le glutamate se fixe au niveau du même site que celui-ci.

La seconde partie du LSP4-2022, quant à elle, se fixe dans une cavité différente située sur l'un des deux lobes du domaine VFT, dont la taille est contrôlée par la séquence d'acides aminés composant la boucle $\alpha_1\beta_1$ (reliant le premier feuillet β à la première hélice α du lobe concerné du domaine VFT). Cette boucle, dont la composition varie selon le sous-type de récepteurs semble être la raison de la plus forte affinité du LSP4-2022 pour les mGluR₄ que pour les mGluR₈.

2.3.3. Enregistrements par Patch-Clamp des réponses excitatrices des cellules de Purkinje évoquées par stimulation des fibres parallèles.

Afin de tester l'efficacité du LSP4-2022 sur les récepteurs mGluR₄ natifs, à la synapse fibre parallèle – cellule de Purkinje, nous avons comparé les effets de cette molécule sur l'amplitude de EPSCs évoqués par stimulation des fibres parallèles, sur la PPF et sur l'amplitude des transitoires calciques présynaptiques, chez des souris dont le gène codant pour ce récepteur a été invalidé (mGluR₄ KO) (Pekhletski *et al.*, 1996), à ceux obtenu chez des souris sauvages (« wild-type »).

L'application de LSP4-2022 à la concentration de 100 μ M entraîne, chez les souris sauvages, une diminution réversible de l'amplitude des EPSCs évoqués par stimulation des fibres parallèles d'environ 30% pour la première réponse et 25% pour la seconde réponse, accompagnée d'une augmentation également réversible de la PPF d'environ 15% (augmentation de 1.62 ± 0.04 à 1.85 ± 0.05). Au contraire, cet effet, à la fois sur l'amplitude des EPSCs évoqués par stimulation des fibres parallèles et sur la PPF, est complètement aboli chez les souris mGluR₄ KO.

De la même façon, on observe une diminution de l'amplitude des transitoires calciques d'environ 11% par le LSP4-2022 (100 μ M) chez les souris sauvages, diminution inexistante chez les souris mGluR₄ KO.

L'ensemble de ces résultats confirment ainsi l'action du LSP4-2022 sur des récepteurs mGluR₄ natifs.

2.3.4. Étude de l'activité *in vivo* du LSP4-2022 à l'aide d'un modèle murin pour la maladie de Parkinson.

Après avoir été testée sur des modèles *in vitro* et *ex vivo*, l'activité du LSP4-2022 a également été étudiée *in vivo* sur un modèle de souris cataleptique (induite par injection systémique ou intra-cérébro-ventriculaire d'Halopéridol, un antagoniste des récepteurs dopaminergiques « D₂-like »), connu comme étant un bon modèle d'akinésie Parkinsonienne.

Les résultats de ce travail, réalisé par l'équipe de Marianne Amalric (Laboratoire de Neurobiologie de la Cognition, CNRS UMR6155, Université Aix-Marseille, Marseille), montrent que le LSP4-2022 est capable de réduire considérablement, voire d'annuler, l'effet cataleptique de l'Halopéridol de façon réversible. Le LSP4-2022 étant efficace pour contrer cette catalepsie après injection par voie intra-cérébro-ventriculaire ou systémique, on peut en déduire que le LSP4-2022 est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique.

On peut également noter que l'effet maximal du LSP4-2022 après injection par voie systémique (c'est-à-dire un effet d'une durée allant jusqu'à 90 minutes après injection de LSP4-2022) est observé pour de faibles concentrations de cette molécule (0.75 mg/kg), reflétant la forte affinité du LSP4-2022 pour les récepteurs mGluR₄.

Goudet, C., Vilar, B., Courtiol, T., Deltheil, T., **Bessiron, T.**, Brabet, I., Oueslati, N., Rigault, D., Bertrand, H.-O., McLean, H., Daniel, H., Amalric, M., Acher, F., and Pin, J.P. (2012). A novel selective metabotropic glutamate receptor 4 agonist reveals new possibilities for developing subtype selective ligands with therapeutic potential. *FASEB J.* 26, 1682–1693.

II – Identification des mécanismes moléculaires sous-tendant l'effet inhibiteur des récepteurs mGluR₄ sur les influx calciques présynaptiques à la synapse fibre parallèle – cellule de Purkinje.

1. Introduction.

Les études sur la signalisation des mGluRs du groupe III ont été menées principalement *in vitro* dans des systèmes d'expression. Ces récepteurs y ont été initialement décrits comme couplés négativement à l'adénylate cyclase via une protéine $G_{i/o}$ sensible à la toxine pertussique (Thomsen *et al.*, 1992 ; Tanabe *et al.*, 1993 ; Chavis *et al.*, 1994 ; Neil *et al.*, 1996). Les mGluRs du groupe III semblent également interagir avec la PI3Kinase ainsi que certains membres du module des MAPKinases Erk (Iacovelli *et al.*, 2002).

Au sein du cortex cérébelleux, et plus précisément à la synapse fibre parallèle – cellule de Purkinje, les récepteurs mGluR₄ sont connus pour déprimer les influx calciques présynaptiques, résultant de l'ouverture de 3 types différents de canaux calciques voltage-dépendants : les canaux de type P/Q, les canaux de type N les canaux de type R (Mintz *et al.*, 1995 ; Daniel *et al.*, 2004). Cependant, la question que nous avons posée était : cet effet dépressant est-il lié à une inhibition directe de ces canaux calciques voltage-dépendants, ou indirecte via l'activation de canaux potassiques ? Il a en effet été montré que les mGluRs du groupe III interagissent avec des canaux potassiques de type GIRK (Sharon *et al.*, 1997).

Au sein de l'équipe, nous avons donc cherché à déterminer l'implication de chacun de ces acteurs protéiques putatifs après activation de récepteurs mGluR₄ natifs, au niveau de la synapse fibre parallèle-cellule de Purkinje. Mon implication personnelle dans cette étude, déjà très avancée lors de mon arrivée au laboratoire, a consisté à mesurer l'effet du TEA (inhibiteur des canaux potassiques voltage-dépendants) sur la dépression de l'amplitude des transitoires calciques présynaptiques induite par le L-AP4 et son influence sur les volées afférentes des fibres parallèles, ainsi qu'à vérifier, dans notre modèle, l'efficacité des inhibiteurs de l'adénylate cyclase, des inhibiteurs des MAP Kinases et de la PI₃Kinase utilisés.

2. Pour une inhibition directe ou indirecte des canaux calciques ?

Afin de déterminer si l'action inhibitrice des influx calciques présynaptiques des récepteurs mGluR₄ est directe ou non sur les canaux calciques voltage-dépendants, nous avons utilisé divers inhibiteurs des canaux potassiques (canaux potassiques voltage-dépendants, canaux potassiques à deux pores (K₂P), et canaux potassiques à rectification entrante couplés aux protéines G (GIRKs)), ainsi que des toxines très sélectives des canaux calciques voltage-dépendants de type P/Q, N et R.

2.1. Implication des canaux potassiques.

Dans un premier temps, nous avons utilisé la 4-AminoPyridine (4-AP) afin de bloquer la plupart des canaux potassiques voltage-dépendants. Cependant, la 4-AP n'est pas une

molécule très sélective de ces seuls canaux, et doit être utilisée à de très fortes concentrations (dans cette étude, nous l'avons appliqué à une concentration de 200 μM), entraînant alors de nombreux effets secondaires indésirables. Parmi ces derniers, on peut par exemple noter une altération notoire des volées afférentes évoquées par stimulation des fibres parallèles, ainsi qu'une forte augmentation de l'amplitude (de $334 \pm 105\%$) des influx calciques présynaptiques accompagnés d'un allongement de leur cinétique (de $85 \pm 10\%$). De ce fait, nous avons décidé d'utiliser un autre inhibiteur des canaux potassiques voltage-dépendants : le Tétréthylammonium (TEA), à une concentration de 100 μM .

Bien que le TEA entraîne également de très légères altérations des volées afférentes évoquées par stimulation des fibres parallèles ainsi qu'une augmentation de 32% de l'amplitude des influx calciques présynaptiques, ces effets sont minimes comparé à la 4-AP. Conjointement à l'augmentation initiale de l'amplitude de ces influx calciques présynaptiques, nous avons pu observer une baisse de cette amplitude de 20% liée à l'application de L-AP4 à la concentration saturante de 100 μM . Nous avons ensuite diminué la concentration extracellulaire de calcium de 2 à 1,5 mM, afin d'obtenir des influx calciques présynaptiques sous TEA d'amplitude comparable aux conditions contrôles (c'est-à-dire sans TEA). Dans ces conditions, la baisse d'amplitude de ces influx calciques présynaptiques par l'application de L-AP4 à la même concentration de 100 μM est de $20.5 \pm 1.8\%$. Cette valeur est comparable à celle obtenue en conditions contrôles, soit une diminution d'amplitude de $25.3 \pm 2.3\%$ (Abitbol *et al.*, 2008).

De même, l'utilisation de Tertiapin Q, inhibiteur sélectif de certains canaux de type GIRK, ou de fluoxetine, inhibiteur de la recapture de sérotonine communément utilisé comme antidépresseur possédant également une activité antagoniste des canaux K_2P , aux concentrations respectives de 100 nM et 50 μM , n'altère aucunement l'effet du L-AP4 sur l'amplitude des influx calciques présynaptiques (baisse respective de $28.9 \pm 2.5\%$ sous Tertiapin Q et $26.1 \pm 5.1\%$ sous fluoxetine).

Toutes ces données suggèrent qu'aucun de ces différents types de canaux potassiques n'intervient dans la dépression des influx calciques présynaptiques médiée par l'activation pharmacologique des récepteurs mGluR_4 .

2.2. Implication des canaux calciques.

Contrairement à la majorité des outils pharmacologiques inhibiteurs des canaux potassiques, il existe pour les canaux calciques voltage-dépendants de nombreux bloqueurs très sélectifs pour chaque type de canal. Nous avons, dans cette étude, utilisé l' ω -conotoxine-GVIA (issue du venin de cônes mages venimeux), l' ω -agatoxine-TK (issue du venin d'abeilles), et le SNX-482 (issue du venin de tarentule *Hysteroocrates gigas*) afin de bloquer respectivement les canaux calciques de type N, P/Q et certains canaux de type R (à savoir les canaux $\text{Ca}_{\text{V}2.3}$).

L'utilisation séparée d' ω -conotoxine-GVIA à la concentration de 250 nM, d' ω -agatoxine-TK à la même concentration de 250 nM, et de SNX-482 à la concentration de 100 nM, entraîne une diminution de l'amplitude des influx calciques présynaptiques respective de $36.9 \pm 6\%$, $33.6 \pm 6.2\%$, et $21.3 \pm 3.5\%$. À cette baisse individuelle pour chaque type de canal calcique se superpose une nouvelle diminution de l'amplitude de ces influx calciques présynaptiques suite à l'application de L-AP4 à la concentration de 100 μ M d'environ 25% ($27.6 \pm 4.4\%$ en présence d' ω -conotoxine-GVIA, $25.9 \pm 1.5\%$ en présence d' ω -agatoxine-TK, et $28.9 \pm 4\%$ en présence de SNX-482).

Un cocktail de ces trois toxines à été utilisé par la suite, aux mêmes concentrations que précédemment. L'application de ce cocktail entraîne une baisse de l'amplitude des transitoires calciques présynaptiques de 60%, à laquelle s'ajoute une nouvelle diminution de 28% après co-application du L-AP4 à la concentration de 100 μ M.

L'ensemble de ces résultats indiquent que les récepteurs mGluR₄ ne semblent pas cibler un type particulier de canal calcique, mais moduleraient l'ensemble de ces canaux de façon similaire.

3. Implication d'une voie G_{i/o} / PKA dépendante ?

Les récepteurs mGluR₄ ont été décrits comme négativement couplés à l'adénylate cyclase via une protéine G $\alpha_{i/o}$ sensible à la PTX. De ce fait, nous avons décidé de mesurer l'amplitude des influx calciques présynaptiques après avoir préalablement incubé les tranches avec la PTX pendant 12 à 19 heures. Après application du L-AP4 à la concentration de 100 μ M dans le bain de perfusion, on constate une diminution, réversible, de l'amplitude de ces transitoires calciques présynaptiques de $24.1 \pm 2.5\%$.

Nous avons également testés l'implication putative de l'adénylate cyclase sur la dépression des influx calciques présynaptiques, à la suite de l'activation pharmacologique des récepteurs mGluR₄, par l'utilisation de 2 inhibiteurs perméants spécifiques de cet enzyme : le SQ22,536 (utilisé à la concentration de 50 à 300 μ M) et la 2',5'-Didéoxyadénosine (utilisée à la concentration de 20 μ M). En présence de l'un ou l'autre de ces composés, qui n'altèrent aucunement l'amplitude des influx calciques présynaptiques, la co-application de L-AP4 à la concentration de 100 μ M déprime toujours ces transitoires calciques de $27.6 \pm 1.5\%$ et $29.7 \pm 3.8\%$ respectivement.

Enfin, de la même façon, en présence de KT5720, inhibiteur perméant spécifique de la Protéine Kinase A, nous observons toujours un effet dépressant du L-AP4 à la concentration de 100 μ M d'environ 25%.

Ces résultats démontrent que dans notre modèle, les récepteurs mGluR₄ ne mettent pas en jeu la voie G $\alpha_{i/o}$ /Adénylate Cyclase/Protéine Kinase A habituellement, décrite pour ces récepteurs.

4. Implication des MAPKinases et /ou de la PI₃Kinase ?

Afin de tester l'implication potentielle des MAPKinases Erk1/2 et de la PI₃Kinase, nous avons utilisés le PD98059 (inhibiteur perméant des MAPKinases) et le LY294002 (inhibiteur perméant de la PI₃Kinase). De même que pour les différents inhibiteurs de la voie G_{i/o} / PKA dépendante décrits précédemment, l'amplitude de la dépression des influx calciques présynaptiques par le L-AP4 n'est pas significativement différente de celle observée en conditions contrôle.

De ce fait, ces protéines ne semblent pas intervenir dans les mécanismes mis en jeu par l'activation des récepteurs mGluR₄ dans notre modèle d'étude.

5. La voie PLC/PKC, une voie « non canonique ».

Les récepteurs mGluR₄ ont été initialement décrits dans la littérature comme couplés négativement à l'adénylate cyclase par une protéine G_{i/o} sensible à la PTX. Cependant ceci ne semble pas être le cas à la synapse fibre parallèle-cellule de Purkinje, au vu des résultats exposés précédemment, obtenus avec des récepteurs mGluR₄ natifs. Par ailleurs, l'implication d'une voie PLC-dépendante inhibant des canaux calciques de type P/Q a été démontrée pour un autre mGluR du groupe III, mGluR₇, dans des cellules granulaires du cortex cérébelleux en culture (Perroy *et al.*, 2000).

Nous avons donc utilisés un inhibiteur de la PLC sous deux formes : une forme active, l'U73122, et une forme inactive, l'U73343.

Après avoir incubé les tranches de cervelet pendant 3h30 avec l'une de ces deux molécules, l'amplitude des transitoires calciques présynaptiques a été mesurée. En présence d'U73122, le L-AP4 (100µM) déprime l'amplitude de ces influx calciques d'environ 10% seulement, une valeur significativement différente de celle obtenue en conditions contrôles. Au contraire, en présence d'U73343, l'effet dépressant du L-AP4 est similaire à celui obtenu en conditions contrôles. Ces résultats mettent en évidence une contribution importante de la PLC à l'effet inhibiteur des récepteur mGluR₄ sur les canaux calciques voltage-dépendants.

De façon complémentaire dans les expérimentations que j'ai menées, l'effet dépressant du L-AP4 sur l'amplitude des EPSCs évoqués par stimulation des fibres parallèles, est fortement diminué en présence d'U73122 par rapport aux conditions contrôles. De plus, l'augmentation de PPF accompagnant l'activation des récepteurs mGluR₄ par le L-AP4 est également fortement atténuée en présence d'U73122. Cependant, en présence d'U73343, l'effet du L-AP4 sur l'amplitude des EPSCs évoqués par stimulation des fibres parallèles ainsi que sur la PPF est similaire à celui observé en conditions contrôles, confirmant les résultats précédents.

La Protéine Kinase C (PKC) étant un effecteur connu de la PLC, nous avons donc décidés de tester l'implication potentielle de cette enzyme à l'aide du Ro 32-0432, inhibiteur

perméant spécifique de cette PKC. Après incubation des tranches pendant 1h30 avec ce composé, nous avons observés les mêmes effets qu'en présence de la forme active de l'inhibiteur de PLC, à savoir, une réduction majeure des effets dépressants du L-AP4 sur les réponses synaptiques.

Abitbol, K., McLean, H., **Bessiron, T.**, and Daniel, H. (2012). A new signalling pathway for parallel fibre presynaptic type 4 metabotropic glutamate receptors (mGluR4) in the rat cerebellar cortex. *J. Physiol. (Lond.)* 590, 2977–2994.

III – Étude des mécanismes d’action des récepteurs mGluR₄ à la synapse fibre parallèle – interneurone de la couche moléculaire.

1. Introduction.

Les fibres parallèles jouent un double rôle de transmission d’informations sensori-motrices en provenance de diverses structures cérébrales aux cellules principales du cortex cérébelleux, les cellules de Purkinje, et de contrôle des commandes émises par ces cellules de Purkinje par le biais d’interneurones, et notamment des interneurones de la couche moléculaire (cellules étoilées et cellules en panier).

Compte-tenu du rôle très différent de ces deux types de cellules, on peut se demander si les synapses fibre parallèle – cellule de Purkinje et fibre parallèle – interneurone de la couche moléculaire font appel aux mêmes mécanismes de régulation, les cellules postsynaptiques pouvant influencer la composition protéique des présynapses les contactant (Craig & Boudin, 2001). En effet, ces deux synapses ayant des effets antagonistes, la genèse concomitante de courants excitateurs et inhibiteurs (induits par l’activation des divers interneurones inhibiteurs) dans les cellules de Purkinje, se retrouvant alors en opposition complète, reviendrait alors à « minimiser » fortement leur action.

Des résultats d’une étude récente suggéraient que les récepteurs mGluR₄ sont également présents et fonctionnels à la synapse fibre parallèle – interneurone de la couche moléculaire (Zhang & Linden, 2009). Nous avons ainsi utilisés, sur des préparations *ex-vivo* de cervelet de rat, une approche combinant des enregistrements électrophysiologiques des EPSCs évoqués par stimulation des fibres parallèles ou spontanés (mEPSCs), à des mesures optiques des variations calciques présynaptiques, afin de confirmer d’une part la présence de récepteurs mGluR₄ fonctionnels à la synapse fibre parallèle – interneurone de la couche moléculaire, et d’approfondir d’autre part nos connaissances sur les mécanismes d’actions de ces récepteurs, en tirant profit des particularités singulières de ces synapses.

2. Confirmation de la présence de récepteurs mGluR₄ fonctionnels à la synapse fibre parallèle – interneurone de la couche moléculaire.

L’application du L-AP4 ou du LSP4-2022 (Figure 28) à une concentration saturante de 100µM entraîne dans les deux cas une dépression réversible de l’amplitude des EPSCs d’environ 50% pour la réponse à la première stimulation et 30% pour la réponse à la seconde stimulation. Cette diminution est accompagnée d’une augmentation de la PPF autour de 40% (de 1.77 ± 0.13 à 2.39 ± 0.15 après application de L-AP4, et de 1.84 ± 0.06 à 2.55 ± 0.07 après application de LSPA-2022).

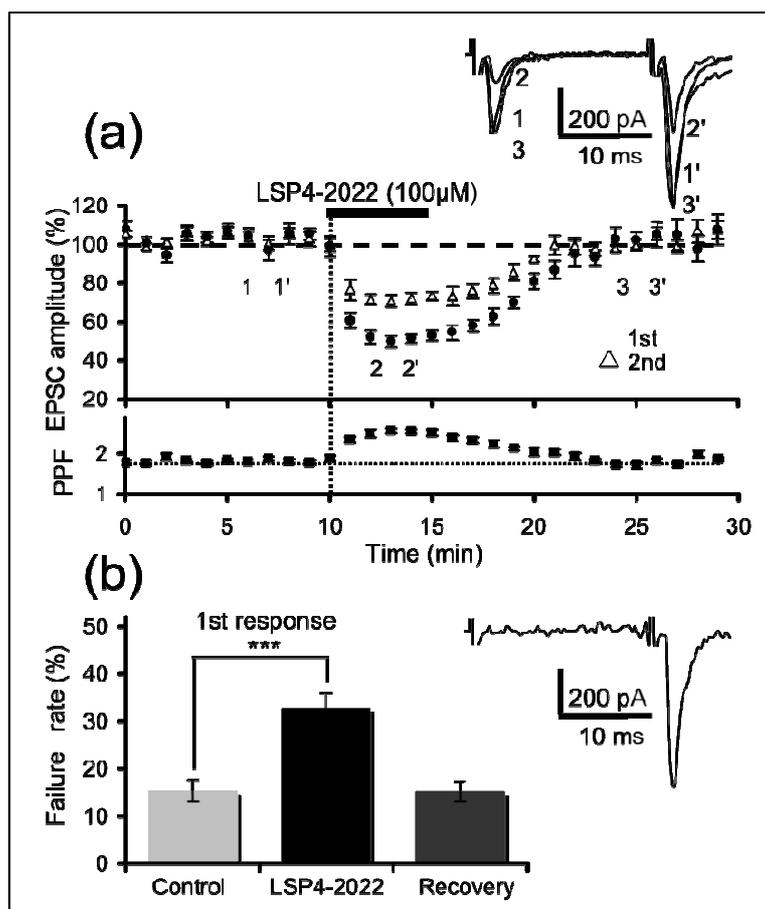


Fig 28. Conséquence de l'activation pharmacologique des récepteurs mGluR4 aux synapses fibres parallèles – interneurons de la couche moléculaire sur l'amplitude des réponses postsynaptiques et la PPF (a), et sur le taux d'échecs à la neurotransmission (b). **(a)** Chaque point calculé correspond à la moyenne \pm le SEM de 10 expériences individuelles. Les EPSCs illustrés dans le coin supérieur droit représentent la moyenne d'une dizaine de réponses individuelles (les échecs à la neurotransmission étant exclus du calcul) avant (1 1'), pendant (2 2') et après (3 3') application du LSP4-2022 (100 μM). **(b)** Histogramme représentant le taux d'échecs à la neurotransmission pour la réponse à la première stimulation (un exemple d'échec étant illustré dans la partie droite) avant, pendant, et après application du LSP4-2022 (100 μM) (***) $P < 0.001$.

De plus, en présence de PHCCC (30 μM), modulateur allostérique sélectif des récepteurs mGluR₄, l'effet du L-AP4 (100 μM) à la fois sur l'amplitude des EPSCs évoqués par stimulation des fibres parallèles et sur la PPF, est significativement potentialisé (dépression de l'amplitude des EPSCs d'environ 80% et 65% respectivement pour la première et la seconde réponse, accompagnée d'une augmentation de la PPF autour de 55%, soit une augmentation de 1.81 ± 0.06 à 2.78 ± 0.09). On peut également noter que dans nos conditions de stimulation des fibres parallèles (c'est-à-dire à une fréquence de 0.167 Hz), le PHCCC ne possède aucun effet propre ni sur l'amplitude des EPSCs évoqués, ni sur la PPF.

Enfin, au contraire, en présence de MSOP (300 μM), antagoniste à large spectre des mGluRs du groupe III, le L-AP4 (100 μM) ne déprime plus que d'environ 5%, à la fois l'amplitude de la première et de la seconde réponse, sans modifier de façon significative la

PPF (de 1.91 ± 0.08 à 1.96 ± 0.07 après application du L-AP4). De plus, cet antagoniste ne possède également aucun effet propre significatif sur ces différents paramètres, ceci dans nos conditions de stimulation.

L'ensemble de ces résultats confirme ainsi la présence de récepteurs mGluR₄ fonctionnels à la synapse fibre parallèle – interneurone de la couche moléculaire.

3. Etude de l'implication potentielle d'une voie Gq/PLC-dépendante.

Nous nous sommes demandé si l'activation pharmacologique par le L-AP4 des récepteurs mGluR₄ présents à la synapse fibre parallèle – interneurone de la couche moléculaire mettait en jeu une voie PLC-dépendante, de la même manière qu'à la synapse fibre parallèle – cellule de Purkinje. Pour répondre à cette question, j'ai utilisé le même inhibiteur de PLC que précédemment, sous sa forme active et inactive (l'U73122 et l'U73343).

En raison de la fragilité des interneurons de la couche moléculaire à une incubation d'U73122 (10 μ M) et de leur petite taille, nous avons décidé de n'appliquer ce composé, ainsi que l'U73343 (10 μ M), que pendant une période de 10 minutes et non plusieurs heures (voir chapitre précédent), avant une application subséquente de L-AP4 (100 μ M).

En présence d'U73343, l'effet du L-AP4 sur l'amplitude des EPSCs évoqués par stimulation des fibres parallèles, ainsi que sur la PPF, n'est pas significativement différent de celui observé en conditions contrôles.

Au contraire, en présence d'U73122, le L-AP4 n'entraîne plus qu'une diminution de l'amplitude des EPSCs évoqués de $19.5 \pm 8.7\%$ et $14.7 \pm 3\%$ respectivement pour la réponse à la première stimulation et la réponse à la seconde stimulation, accompagnée d'une augmentation de la PPF de seulement 8% (de 1.75 ± 0.11 à 1.89 ± 0.13).

J'ai également pu tester la contribution des protéines G α_q dans le fonctionnement synaptique des récepteurs mGluR₄ à l'aide d'un inhibiteur sélectif pour ces protéines récemment mis sur le marché, l'UBO-QIC (Université de Bonn). En présence d'UBO-QIC (10 μ M), le L-AP4 ne déprime plus l'amplitude des EPSCs évoqués par stimulation des fibres parallèles que de $7.1 \pm 2.5\%$ et $4.9 \pm 3.4\%$ respectivement pour la réponse à la première stimulation et la réponse à la seconde stimulation, accompagnée d'une augmentation non significative de la PPF autour d'1% (de 1.73 ± 0.02 à 1.74 ± 0.03).

Ces résultats montrent que l'activation des récepteurs mGluR₄ à la synapse fibre parallèle – interneurone de la couche moléculaire met en jeu une voie G α_q /PLC-dépendante.

4. Influence de l'activation des récepteurs mGluR₄ sur le taux d'échecs à la neurotransmission.

La synapse fibre parallèle – interneurone de la couche moléculaire offre la possibilité de quantifier le nombre d'échecs à la neurotransmission qui s'y produisent. Ainsi, dans nos conditions, j'ai pu mesurer un taux d'échecs basal d'environ 15% en ce qui concerne les réponses à la première stimulation, une valeur environ huit fois supérieure à celle mesurée pour les réponses à la seconde stimulation (soit un taux d'échecs basal autour de 2%).

De manière intéressante, nous avons remarqué que l'activation des récepteurs mGluR₄ aussi bien par le L-AP4 que le LSP4-2022 entraîne une augmentation réversible et significative du taux d'échecs à la neurotransmission, à la synapse fibre parallèle – interneurone de la couche moléculaire, atteignant une valeur d'environ 40% en ce qui concerne les réponses à la première stimulation ou 7% pour les réponses à la seconde stimulation. Cet effet est par ailleurs potentialisé en présence de PHCCC (30µM) (taux d'échecs d'environ 50% et 14% respectivement pour les réponses à la première et à la seconde stimulation) ou très fortement diminué en présence de MSOP (300µM) (taux d'échecs autour de 19% et 2% respectivement pour les premières et secondes réponses).

De plus, en présence d'U73343 (10µM), forme inactive de l'inhibiteur de PLC, les résultats obtenus sont similaires aux conditions contrôles. Au contraire, en présence d'U73122 (10µM), forme active de l'inhibiteur de PLC, ou d'UBO-QIC (10µM), l'effet du L-AP4 sur le taux d'échecs est fortement diminué (respectivement de $21.6 \pm 3.6\%$ et $3.4 \pm 1\%$ pour l'U73122 et de $20 \pm 6.3\%$ et $1.5 \pm 0.5\%$ pour l'UBO-QIC).

Ces résultats suggèrent ainsi que l'activation des récepteurs mGluR₄ augmente le taux d'échecs à la neurotransmission à la synapse fibre parallèle – interneurone de la couche moléculaire, au moins en partie par la mise en jeu d'une voie G_q/PLC-dépendante.

5. Influence du Calcium sur les mécanismes d'action des récepteurs mGluR₄.

Afin d'évaluer le rôle du calcium dans les mécanismes d'action des récepteurs mGluR₄, j'ai pu comparer l'effet du L-AP4, en modulant la concentration calcique extracellulaire (allant d'1 à 4mM), sur 4 paramètres différents : la diminution d'amplitude des EPSCs évoqués par stimulation des fibres parallèles, l'augmentation de la PPF et du taux d'échecs à la neurotransmission, et la diminution de l'amplitude des influx calciques.

De façon intéressante, j'ai pu remarquer que la concentration calcique extracellulaire ne modifie que de façon limitée l'effet de l'activation pharmacologique des récepteurs mGluR₄ sur l'amplitude des influx calciques présynaptiques, l'amplitude des EPSCs évoqués par stimulation des fibres parallèles, de même que la PPF, tandis qu'elle affecte de façon majeure l'augmentation du taux d'échecs.

L'ensemble de ces résultats suggère donc que les mécanismes inhibiteurs de la neurotransmission consécutifs à l'activation pharmacologique des récepteurs mGluR₄, pourraient être en partie calcium-indépendants, en parallèle des actions calcium-dépendantes connues pour ces récepteurs (inhibition des canaux calciques présynaptiques au moins en partie via l'intervention de la phospholipase C). De tels mécanismes inhibiteurs de la transmission synaptique, indépendants des influx calciques, ont été également récemment suggérés après activation pharmacologique des récepteurs mGluR₈ dans l'hippocampe (Erdmann et al., 2012). Je me suis donc intéressé à l'influence de l'activation des récepteurs mGluR₄ sur les EPSCs spontanés miniatures (mEPSCs), événements supposés moins calcium-dépendants que les EPSCs évoqués.

En présence de BAPTA-AM (200µM), chélateur du calcium perméant, aucune altération significative de la fréquence ni de l'amplitude des mEPSCs est observée. En revanche l'application subséquente de L-AP4 (100µM) entraîne une réduction réversible de la fréquence de ces événements d'environ 40%, sans affecter leur amplitude. Ces résultats démontrent qu'une partie au moins des mécanismes d'action des récepteurs mGluR₄ est peu dépendante du calcium.

6. Effet du blocage des interactions putatives entre les récepteurs mGluR₄ et ses différents partenaires protéiques

Les récepteurs mGluR₄ possèdent de nombreux partenaires protéiques, dont certains sont connus pour être des acteurs majeurs de l'exocytose (Ramos *et al.*, 2012). Les études biochimiques menées au laboratoire ont également montré que ces différentes protéines interagissent avec la partie proximale de la queue C-terminale ainsi que la seconde boucle intracellulaire des récepteurs mGluR₄ (Ramos *et al.*, 2012).

Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle ces interactions entre les récepteurs mGluR₄ et leurs différents partenaires protéiques seraient nécessaires et suffisantes pour soutenir au moins en partie les effets dépressants consécutifs à l'activation pharmacologique des mGluR₄.

Pour empêcher les interactions entre mGluR₄ et ses partenaires protéiques, la stratégie que nous avons utilisée est de fusionner deux peptides mimant les deux domaines d'interactions de mGluR₄ (le peptide AN23 mimant la partie proximale de la queue C-terminale et le peptide NQ25 mimant la seconde boucle intracellulaire de mGluR₄) à un peptide perméant de type TAT (Ster *et al.*, 2009). Ces dominants négatifs de l'interaction ont été perfusés de façon aigüe sur les préparations *ex vivo*, et par compétition, après avoir traversé la membrane plasmique, ont pu abolir les interactions entre les récepteurs mGluR₄ et leurs partenaires putatifs.

Néanmoins, en présence de ces peptides, l'effet dépressant du L-AP4 sur l'amplitude des transitoires calciques présynaptiques (de 28.9 ± 3.7 %) et sur l'amplitude des EPSCs évoqués par stimulation des fibres parallèle (de $53.4 \pm 3.7\%$ et $39.3 \pm 3.1\%$ respectivement

pour la première et la seconde réponse) est similaire à celui observé en conditions contrôles. Ces résultats soulignent le rôle majeur de l'inhibition des canaux calciques voltage-dépendants dans les mécanismes d'action des récepteurs mGluR₄, inhibition indépendante des interactions entre ces récepteurs et leurs partenaires putatifs.

Cependant, les récepteurs mGluR₄ sont également capables d'agir sur des phénomènes relativement peu dépendants du calcium, effet que l'on peut démasquer par l'étude des mEPSCs. Nous nous sommes alors intéressés à l'influence des interactions entre les mGluR₄ et leurs partenaires putatifs sur l'amplitude et la fréquence de ces événements spontanés. Nous avons en premier lieu observé une baisse de fréquence des mEPSCs d'environ 50% consécutive à la perfusion des peptides AN23 et NQ25, sans altération de leur amplitude. Cet effet étant retrouvé après perfusion des versions inactives (« scrambled ») de ces peptides, ou du peptide TAT seul, nous en avons conclu qu'il s'agit d'un effet propre lié à la présence de la séquence TAT, et non d'une conséquence du blocage des interactions entre les récepteurs mGluR₄ et ses partenaires protéiques. En second lieu, l'application subséquente de L-AP4, en présence des peptides inactifs ou du peptide TAT seul, diminue réversiblement la fréquence des mEPSCs de façon similaire aux conditions contrôles (c'est-à-dire autour de 40%), sans affecter leur amplitude. Au contraire, cet effet du L-AP4 sur la fréquence des mEPSCs est complètement aboli en présence des peptides AN23 et NQ25 actifs.

Ces résultats montrent que l'activation des récepteurs mGluR₄ met en jeu, en parallèle de l'inhibition des canaux calciques présynaptiques, des mécanismes moins dépendants du calcium par le biais d'interactions avec des protéines impliquées notamment dans les processus d'exocytose.

mGluR4 depresses both evoked and spontaneous synaptic transmission at the parallel fibre – molecular layer interneuron synapse the rat cerebellar cortex

Bessiron T., McLean H., and Daniel H.

Introduction

Metabotropic glutamate receptors (mGluRs) are G-protein coupled receptors that modulate fast excitatory and inhibitory transmission throughout the central nervous system. mGluRs form a 8 member family that is divided into three groups based on receptor agonist affinity, sequence homology and the second messenger signalling pathways that they activate (Anwyl 1999). Group I receptors (mGluR1 and 5) are predominantly postsynaptic where they reinforce neuronal excitability initiated by AMPA/Kainate and / or NMDA receptor activation. Group II receptors (mGluR2 and 3) are found at both pre- and postsynaptic loci. Presynaptic mGluR 2 and 3 regulate transmitter liberation from their glutamatergic terminals (autoreceptors) or from other (dopaminergic, GABAergic or serotonergic) terminals (heteroreceptors) (Cartmell and Schoepp 2000). Group III receptors (mGluR4, 6, 7, and 8), with the exception of mGluR6, are on the presynaptic membrane (Mateos et al 1998, Corti et al 2002, Ferraguti and Shigemoto 2006), where they modulate transmitter release.

mGluR4s are highly expressed in the cerebellum where they acutely depress synaptic transmission (Lorez et al 2003), are implicated in short term synaptic plasticity (Pekhletski et al 1996), and participate in complicated cerebellar learning tasks and certain forms of spatial memory (Pekhletski et al 1996; Gerlai et al 1998). The anatomical and physiological characteristics of the cerebellar cortex make this structure an ideal model in which to study presynaptic mGluR4 function. We have previously demonstrated that among the group III mGluRs expressed in this structure, mGluR4 is the only functional subtype found on parallel fibre presynaptic terminals (Abitbol et al 2008). Parallel fibres, that are axons arising from cerebellar granule cells, constitute of one of the two excitatory afferent inputs to this cortex. In addition, mGluR4s are strategically situated in the active zone of the presynaptic membrane (Mateos et al 1998) lending credence to their role as autoreceptors. It is well documented that mGluR4 activation inhibits excitatory glutamatergic synaptic transmission at parallel fibre - Purkinje cell synapses (Daniel and Crepel, 2001, Abitbol et al 2008), at least in part by depression of evoked calcium influx due to inhibition of voltage gated calcium channels in parallel fibre terminals (Abitbol et al 2012). We have recently shown that

these effects of mGluR4 depend on the activation of a signalling pathway that involves both PLC and PKC (Abitbol et al 2012).

In another recent study from our laboratory, Ramos et al (2012) used co-immunoprecipitation and affinity chromatography to identify candidate protein partners that interact with mGluR4, and their region of interaction on this receptor. Among the rather large number of proteins identified we found several that are directly involved in neurotransmitter exocytosis, for example Munc18-1, SNAP-25, syntaxin, synapsin 1, and synaptotagmin 2. These proteins are thought to bind somewhere in the second intracellular loop and / or in the proximal part of the C terminal of mGluR4. In light of these data, we emit the hypothesis that mGluR4 can also modulate synaptic transmission by directly targeting different actors of the release machinery, and that these actions could be independent of action potential driven calcium entry into parallel fibre terminals. It has been shown that other mGluRs can modulate spontaneous glutamate release downstream of voltage gated calcium channels (Scanziani et al 1995, Schoppa and Westbrook 1997, Erdmann et al 2012). As such, we tested the hypothesis that mGluR4 can initiate two separate but complimentary mechanisms, one that involves $G\alpha_q$ / PLC - dependent inhibition of presynaptic calcium influx and the other, that is not action potential driven but involves interactions with the release machinery.

In the cerebellar cortex, parallel fibres contact not only Purkinje cells, but also form synapses with small inhibitory interneurons such as Golgi cells and molecular layer interneurons (Palay and Chan-Palay 1974). It has recently been shown that presynaptic mGluR4 receptors are also functional at parallel fibre – molecular layer interneuron synapses (Zhang and Linden 2009). In this study, we exploited this synapse in order to further investigate the molecular mechanisms by which mGluR4 reduces glutamate release. The parallel fibre – molecular layer interneuron synapse presents an interesting alternative to the parallel fibre – Purkinje cell synapse since, in keeping with previous results (Clark and Cull-Candy 2002, Carter and Regehr 2002, Rancillac and Crepel 2004, Rancillac and Barbara 2005), one can detect apparent failures in synaptic transmission that allow us to quantify the effect of mGluR4 activation on the failure rate at this synapse. This parameter can provide insight into interactions between

mGluR4 and the release machinery. In this study we show that mGluR4 acts through at least two mechanisms, one involving protein $G_{\alpha q}$ / PLC inhibition of evoked presynaptic calcium influx and the other involving interactions with the release machinery.

Materials and Methods

Preparation of cerebellar slices

Animal care and all experimental procedures are in accordance with guidelines from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, France). Male Sprague–Dawley rats, 13–18 days old, were stunned and then decapitated. Sagittal or coronal slices (250 μm thick) were cut from the cerebellar vermis in ice-cold oxygenated saline solution (0–1°C), after addition of 2 μM Tetrodotoxin (TTX) and 50 μM of the NMDA receptor antagonist, D-AP5. This saline solution contained (in mM): NaCl, 124; KCl, 3; NaHCO_3 , 24; KH_2PO_4 , 1.15; MgSO_4 , 1.15; CaCl_2 , 2; glucose, 10 and registered an osmolarity of 330 mosmol.L⁻¹ and a pH of 7.35 at 25°C. The slices cut with a Microm HM 650V (Microm International) vibratome, were kept in saline solution gassed with 95% O₂–5% CO₂ at 35°C for 1h, then transferred to the same solution at room temperature (25°C). They were then transferred to a recording chamber on an upright microscope (Zeiss, LePeck France) and were perfused at a rate of 2 ml per minute with this same oxygenated saline solution, supplemented with the GABA_A receptor antagonist bicuculline methiodide (10 μM) to block inhibitory membrane currents mediated by these receptors.

Pharmacological agents

All pharmacological agents were applied to cerebellar slices by direct addition to the saline solution. L-AP4 (L-(+)-2-amino-4-phosphonobutyric acid), U73122 (1-[6-[[17 β]-3-Methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl]amino]hexyl]-1*H*-pyrrole-2,5-dione), M-SOP ((*RS*)- α -methylserine-O-phosphate), PHCCC (N-phenyl-7-(hydroxylimino)cyclopropa[b]-chromen-1a-carboxamide), TTX (tetrodotoxin) and D-AP5 ((*D*)-(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid) were purchased from Tocris (Illkirch, France). BAPTA-AM (1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-*N,N,N,N*-tetraacetic acid tetrakis(acetoxymethyl ester) was purchased from ABCAM (France). UBO-QIC was purchased from the institute of Pharmaceutical Biology (University of Bonn). U7343 (1-[6-[[17 β]-3-Methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl]amino]hexyl]-1*H*-pyrrole-2,5-dione) and bicuculline methiodide were purchased from Sigma (Sigma Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). Trans activating transcriptional activator (TAT) peptides were synthesized by GeneCust (Dudelange, Luxembourg). Three motifs of TAT-coupled

peptides were used: the TAT sequence itself, NQ-25 and AN-23 sequences coupled to the TAT peptide (mimicking the second intracellular loop and the proximal part of the C-terminal tail of mGluR₄ respectively), and the scrambled version of these two peptides coupled to the TAT peptide. All drug stocks were prepared in distilled water, except for Fluo4FF-AM (Molecular Probes), PHCCC, U73122 and U73343 Tocris (Illkirch, France), which were prepared in dimethylsulfoxide (DMSO). Drug stocks were kept at -20°C until just before use. Unless otherwise stated, drugs were added to the superfusate at the desired concentration just before application (the final concentration of DMSO was 0.1%).

Electrophysiology

All recordings were made at 28–30°C. Recordings were carried out from Molecular Layer Interneuron (MLI) selected on the basis of their small soma diameter (8–9 μM), and their location in the outer third of the molecular layer of the cerebellar cortex. Cells were visualized using Nomarski optics and a x63 water-immersion objective of the microscope. Whole-cell patch-clamp recordings of molecular layer interneuron somas in sagittal slices were performed with an Axopatch-1D amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA, USA). Patch pipettes (5–7 M Ω , borosilicate glass) were filled with an intracellular solution of the following composition (in mM): Cs-gluconate, 140; HEPES, 10; MgCl_2 , 4.6; Tetraethylammonium, 20; CaCl_2 , 0.1; EGTA, 1; Na-GTP, 0.4; Na₂ATP, 4; pH adjusted to 7.3 with CsOH; 300 mosmol.L⁻¹. Neurons were clamped at -60mV. Parallel fibres were stimulated every 6 seconds with an extracellular glass saline-filled monopolar electrode placed at the surface of the slice, > 100 μM from recorded cells, to evoke excitatory postsynaptic currents (eEPSCs). Recorded eEPSCs were filtered at 2 kHz, digitized on line at 20 kHz, and analyzed on and off-line with Acquis1 software (Biologic, Grenoble, France). In the cells conserved for analysis, access resistance was partially compensated (50–70%), according to the procedure described by Llano et al. (1991). Throughout the experiment, parallel fibre eEPSCs were elicited on a 10mV hyperpolarizing voltage step, which allowed monitoring of passive membrane properties (cell capacitance and input resistance) of the recorded cells. EPSCs were evoked with pairs of stimuli of the same intensity with an inter-stimulus interval of 20 ms. Suprathreshold stimulation intensities were used (see Clark and Cull-Candy, 2002) and set such that failure rate did not exceed 20% for the first stimulation. Paired-pulse facilitation (PPF) values (Atluri and Regehr, 1996) were calculated on-line as the ratio of the amplitude of the second eEPSC over the first one and plotted against time.

Corresponding PPF values in individual plots were then averaged for all cells recorded to obtain the plot of mean PPF values before, during and after bath application of the mGluR₄ agonist, L-AP4.

Somatic whole-cell voltage-clamp recordings of spontaneous mEPSCs were performed in extracellular solution (see above) supplemented with 0.5 μ M TTX. Recordings were obtained using Axopatch-1D amplifier, filtered at 2kHz and digitized at 20kHz, during 5 minutes of continuous acquisition with Elphy software (Gerard Sadoc, Unité de Neurosciences Information et Complexité, CNRS, Gif-sur-Yvette), to later calculate the values of frequency and amplitude of miniature events. All mEPSCs recordings were performed at least 10 min after establishing the whole-cell configuration to allow for stable recording conditions. Miniature events were analysed off-line using Clampfit software (Axon Instrument). Amplitude threshold value for detection of an event, was set at level corresponding to a value 3 times higher than the root mean square of the baseline noise amplitude. Individual mEPSCs were detected using a peak detection algorithm, which measured the peak amplitude, and the rise and decay times. Automated search parameters were selected based on typical mEPSCs kinetics. All false positives and undetected events were corrected by visual inspection. For each cell analysed, mEPSC frequency was calculated for continuous periods of 5 minutes, in control solution and then in test solutions. The baseline values of mEPSC amplitude was calculated for 5 min in control solution, then the putative effects of the test solutions on mEPSCs amplitude were quantified as a test value represented as a percentage of the control value.

Calcium-sensitive fluorometric measurements

Using coronal slices, presynaptic parallel fibre tracts were labeled by local application of a saline solution containing the low-affinity calcium indicator Fluo-4FF AM (100 μ M), as previously described (Daniel and Crepel, 2001). At least 30 min after loading, a confined region of labeled parallel fibres was illuminated at a single excitation wavelength (480 \pm 22 nm). Excitation light obtained from a 100W mercury lamp was gated with an electromechanical shutter (Uniblitz, Rochester, NY, USA). The optical signals were recorded at 28–30°C, through a 20 \times 50 μ m² window placed in the molecular layer on the visible narrow band of labeled parallel fibres, approximately 500–700 μ m away from the loading site. At this distance, only the loaded fibre tracts were visible in the recording window; no other labeled structures were detectable. Parallel fibres situated in the recording window were stimulated every 30 s with a single 100 Hz train of five electrical stimuli, through a

saline-filled glass microelectrode placed in the molecular layer between the loading site and the recording site. Stimulation-evoked Ca²⁺-sensitive changes in fluorescence were acquired through a \times 63 water-immersion objective, filtered by a barrier filter at 530 \pm 30 nm and converted into an electric signal by a photometer. Fluorometric measurements were analyzed on- and off-line using Acquis1 software. The fluorescence data corrected for dye bleaching were expressed as relative fluorescence changes $\Delta F/F$, where F is the baseline fluorescence intensity, and ΔF is the change induced by PF stimulation. When background fluorescence of the tissue in unlabeled regions of the slice was greater than 5% of the resting fluorescence intensity of the indicator, the data were corrected for background fluorescence.

Statistical analysis

All data are presented as mean \pm S.E.M. Statistical significance was assessed for normally distributed data by an unpaired or paired (as indicated) Student's t tests, with *** P <0.001, ** P <0.01 and * P <0.05 (two-tailed) considered as significant. The similarity of variances between each group of results was tested using F test. « n » indicates the number of cells included in the statistics.

Results

Functional mGluR4 at Parallel Fibre – Molecular Layer Interneuron Synapses

Paired electrical stimulation of parallel fibres, (0.167 Hz, inter stimulus interval of 20 ms) evokes excitatory postsynaptic currents (eEPSC) of variable latency and amplitude in molecular layer interneurons (figure 1a). Note that the first eEPSC exhibits a more variable latency than the second and that the evoked responses show strong paired pulse facilitation (PPF). PPF is characteristic of synapses with a low probability of glutamate release (Atluri and Regehr 1998) and may depend, at least in part, on residual calcium that accumulates in the presynaptic terminal between the first and second stimulation (Zucker and Regehr, 2002). The variability in latency and amplitude of molecular layer interneuron eEPSCs has been observed before, in addition to failures in synaptic transmission (Rancillac and Crepel 2004, Rancillac and Barbara 2005). In light of this variability, representative illustrations of eEPSCs in the remaining figures are an average of 10 consecutive responses.

We investigated whether parallel fibre – molecular layer interneuron synapses, like parallel fibre – Purkinje cell synapses, possess functional presynaptic mGluR₄ receptors. After bath application of saturating concentrations of the group III mGluR agonist, L-AP4 (100 μ M, Abitbol et al 2008), the amplitude of parallel fibre eEPSCs in

molecular layer interneurons was significantly and reversibly reduced by $46.4 \pm 5.4\%$ for the first response and by $33.4 \pm 4.1\%$ for the second response ($p < 0.001$, $n = 10$). This effect was associated with an increase in PPF from 1.77 ± 0.13 in control to 2.39 ± 0.15 in the presence of L-AP4 ($p < 0.001$, figure 1a). These changes are consistent with, albeit less pronounced than those reported for parallel fibre – Purkinje cell synapses (Daniel and Crepel, 2001; Abitbol et al 2008, 2012). We next analysed the depressant effect of L-AP4 in the presence of PHCCC, a positive allosteric modulator of mGluR4 that appears to interact with specific amino acids of the TMIII and / or TMVII portion of the receptor protein (Maj et al 2003). Bath application of $30 \mu\text{M}$ PHCCC alone had no effect on the amplitude of eEPSCs in molecular layer interneurons ($n = 10$, figure 2b). However, and as expected, depressant effects of L-AP4 on eEPSC amplitude were enhanced in the presence of this compound. With co-application of L-AP4 and PHCCC, the amplitude of the first eEPSC was reduced by $76.6 \pm 1.9\%$ compared with $46.4 \pm 5.4\%$ in the presence of L-AP4 alone. Similarly, the amplitude of the second eEPSC was reduced by $63.9 \pm 2.7\%$ compared with $33.4 \pm 4.1\%$ in the presence of L-AP4 alone. This was associated with significant increases in PPF from 1.81 ± 0.06 in control to 2.78 ± 0.09 in the presence of L-AP4 and PHCCC ($p < 0.001$). Finally, in the presence of $300 \mu\text{M}$ MSOP, a broad - spectrum group III mGluR antagonist (Thomas et al 1996), L-AP4 had no significant effect on the amplitude of either the first or the second eEPSC in molecular layer interneurons. As expected, PPF remained unchanged with co-application of MSOP and L-AP4 ($n = 6$, Figure 1c). Taken together these data show that parallel fibre – molecular layer interneuron synapses possess functional mGluR₄ with a pharmacological profile typical of these receptors.

Parallel Fibre mGluR4s are functionally coupled to Gαq proteins and activate Phospholipase C

We have recently shown that at parallel fibre – Purkinje cell synapses, mGluR4 act by way of a PLC / PKC - dependent pathway (Abitbol et al 2012). We sought to extend this observation to the parallel fibre – molecular layer interneuron synapse. To this end, we used U73122, an inhibitor of Phospholipase C activity. While 10 min bath application of $10 \mu\text{M}$ U73122 had no visible effect on amplitude of the first or the second eEPSC (figure 2a), this inhibitor strongly reduced the depressant effect of L-AP4 on these synaptic currents ($19.5 \pm 8.7\%$ depression for eEPSC₁ and $14.7 \pm 3\%$ depression for eEPSC₂ with bath application of U73122 compared to $46.4 \pm 5.4\%$ and $33.4 \pm 4.1\%$ respectively in L-AP4 alone, $n =$

10). PPF was essentially unchanged during co-application of U73122 and L-AP4. When we applied L-AP4 in the presence of U73343, an inactive analogue of the PLC inhibitor, we observed decreases in the amplitude of both the first and the second eEPSC of a similar order to those observed in L-AP4 alone ($58.4 \pm 4.1\%$ reduction for eEPSC₁ and $46.7 \pm 4.8\%$ reduction for eEPSC₂, $p < 0.001$, $n = 10$, figure 2b). These reductions were accompanied by an increase in PPF from 1.96 ± 0.1 in control to 2.92 ± 0.18 in the presence of U73343 and L-AP4 ($p < 0.001$). It appears then that parallel fibre mGluR4s reduce glutamate release onto molecular layer interneurons by a signalling pathway involving Phospholipase C.

We next investigated whether mGluR₄ effects on eEPSC amplitude require the activation of a Gαq protein. After 10 min bath application of UBO-QIC ($10 \mu\text{M}$), a potent inhibitor of protein Gαq activity (Hennen et al., 2013), the amplitude of eEPSCs was identical to that observed under control conditions (figure 2c). Subsequent application of L-AP4 in the presence of UBO-QIC produced only slight reductions in eEPSC amplitude ($7.1 \pm 2.5\%$ for the first eEPSC and $4.9 \pm 3.4\%$ for the second, $n = 4$). There was no concomitant effect on PPF. Taken together, these data show that the mGluR₄ - signalling pathway involves the activation of a Gαq protein and / or the activation of the Phospholipase C signalling pathway.

mGluR4 activation increases failures in transmission at the parallel fibre – molecular layer interneuron synapse

As we show in figure 1, paired stimulations of parallel fibres at intensities slightly above threshold evoke EPSCs of variable latency and amplitude in molecular layer interneurons with clear paired pulse facilitation. However, even with these supra-threshold stimuli, we frequently observed failures in synaptic transmission (Figure 3a). These failures were most often observed for the first evoked response (in around 15% of cases). Only rarely (in less than 2,5% of cases) did the second stimulus of the pair fail to evoke a response. Interestingly, identical stimulation parameters applied to the parallel fibre – Purkinje cell synapse evoke reliable synaptic responses (data not presented but see Abitbol et al 2012).

Among the possible origins of synaptic failure at the parallel fibre – molecular layer interneuron synapse, one must consider the fact that molecular layer interneurons are contacted by a rather small number of parallel fibre terminals (Palay and Chan-Palay 1974) and synaptic release seems to be monovesicular (Nahir and Jahr 2013). Considering that the probability of glutamate release from parallel fibre terminals depends on

cytosolic calcium concentrations (Brenowitz and Regehr 2007) and that mGluR₄ activation depresses synaptic transmission at this synapse by reducing evoked calcium transients in these terminals (Abitbol et al 2008), we studied the effect of mGluR₄ activation on synaptic transmission failure for the first of the two EPSCs evoked by paired stimulation at the parallel fibre – molecular layer interneuron synapse. As illustrated in figure 3a, bath application of L-AP4 reversibly increased the failure rate of the first eEPSP from $16.2 \pm 2.7\%$ in control to $37.8 \pm 5\%$ in the presence of L-AP4 ($p < 0.001$) and the second eEPSP from $2.2 \pm 0.5\%$ in control to $6.8 \pm 1.3\%$ in the presence of L-AP4 ($p < 0.01$, figure 3b, $n=10$). Given the extremely low failure rate of the second eEPSC, in the rest of the figure, we will present data for only the first eEPSC. As summarized in figure 3c, the failure rate of the first eEPSC was significantly enhanced in the presence of PHCCC and L-AP4 ($49.2 \pm 2.5\%$) compared to that observed in L-AP4 alone ($37.8 \pm 5\%$, $p < 0.05$, $n=10$). As expected, in the presence of MSOP, L-AP4 had no significant effect on failure rate ($18.7 \pm 2.3\%$) compared to that observed in MSOP alone $13.1 \pm 1.3\%$, $n=6$).

We next examined the effect of mGluR₄ activation on eEPSP failure rate after inhibiting either protein Gαq activity (with 10 μM UBO-QIC) or phospholipase C activity (with 10 μM U73122). As shown in figure 3c, in the presence of UBO-QIC, subsequent application of L-AP4 had no significant effect on the failure rate of eEPSCs ($20 \pm 6.3\%$ in UBO-QIC + L-AP4 compared to $17 \pm 3.5\%$ in UBO-QIC alone, $n=4$). Similarly, L-AP4 did not significantly affect the failure rate in the presence of U73122 ($20 \pm 3.6\%$ in U73122 + L-AP4 compared to $11.9 \pm 2.2\%$ in U73122 alone, $n=10$). In contrast, after 10 min bath application of 10 μM U73343, the inactive form of the phospholipase C inhibitor, L-AP4 increased the failure rate of eEPSCs to $42 \pm 4.4\%$, a value not significantly different than that obtained with L-AP4 alone ($37.8 \pm 5\%$, $n = 10$). These data show that modulating either mGluR₄ activity with allosteric enhancers or antagonists, or inhibiting the activity of certain actors in the Gαq signalling pathway, reversibly affects the failure rate of eEPSCs at the parallel fibre – molecular layer interneuron synapse.

mGluR₄ effects on presynaptic calcium transients are not affected by changes in extracellular calcium concentrations

With a low affinity calcium dye that permits linear measures of presynaptic Ca²⁺ influx, we have previously shown that in 2mM external calcium, activation of mGluR₄ by bath application of 100 μM L-AP4 reversibly reduces stimulation evoked increases in cytosolic calcium levels in parallel fibre terminals by around 25% (Daniel and

Crepel 2001, Abitbol et al. 2008). Given the fact that mGluR₄ exerts its actions at least in part by inhibiting calcium influx through voltage gated channels, we sought to determine if this depressant effect is influenced by the concentration of calcium in the extracellular medium. Not surprisingly, reducing extracellular calcium from 2mM (control) to 1.5 mM decreased the amplitude of evoked calcium transients by $11.1 \pm 2.8\%$ (figure 4a). As can be expected, further decreasing extracellular calcium to 1 mM lead to even larger reductions in calcium transient amplitudes ($22.5 \pm 2.8\%$, figure 4b), while increasing extracellular calcium to 2.5 mM increased the amplitude of these evoked transients by $17.7 \pm 3.4\%$ (figure 4c). Interestingly, while extracellular calcium levels clearly affect the basal amplitude of evoked presynaptic calcium transients, the depressant effect of L-AP4 on these transients was nearly the same magnitude in all external calcium concentrations tested. In figure 4d we summarize the L-AP4 depressant effects on evoked calcium transients. These normalized values represent the L-AP4 – induced depression in the amplitude of evoked calcium transients relative to their amplitude measured just before L-AP4 application under the different external calcium conditions. L-AP4 decreases calcium transients by $17.3 \pm 1.9\%$ in 1 mM calcium ($n = 7$), by $16.4 \pm 1.2\%$ in 1.5 mM calcium ($n = 7$), by $25.2 \pm 2.4\%$ in 2.0 mM calcium ($n = 8$) and by $23.4 \pm 2.7\%$ in 2.5 mM calcium ($n = 7$). We conclude that mGluR₄ effects on evoked calcium transients and ultimately on glutamate release, are not affected by the level of extracellular calcium.

mGluR₄ effects on eEPSCs are not affected by changes in extracellular calcium concentrations

We next determined whether L-AP4 mediated reductions in eEPSC amplitude depend on external calcium levels. As shown in figure 5a, reducing external calcium from 2 mM (control) to 1.5 mM reduced the amplitude of both the first ($34.2 \pm 3.6\%$) and the second eEPSC ($24.7 \pm 3.6\%$) and slightly increased the PPF ($19 \pm 5.2\%$, $n=11$). Subsequent application of L-AP4 significantly and reversibly decreased the amplitude of the evoked responses by $49.6 \pm 3.5\%$ for the first eEPSC and by $44.7 \pm 2.5\%$ for the second ($p < 0.001$). This was associated with a $16.1 \pm 4.9\%$ increase in PPF (from 2.71 ± 0.12 to 3.15 ± 0.17 , $p < 0.01$). Similarly, in 1 mM calcium, the amplitude of the first eEPSC was reduced by $33.9 \pm 6.2\%$ while the amplitude of the second eEPSC was reduced by $25.7 \pm 5.6\%$ (data not shown). Subsequent application of L-AP4 further decreased the amplitude of the evoked responses by $57.5 \pm 5\%$ for the first eEPSC and by $51.3 \pm 5.6\%$ for the second ($p < 0.001$). This was

associated with an increase in PPF of $22.4 \pm 7.3\%$ ($p < 0.05$).

Increasing extracellular calcium concentrations from 2 mM to 2.5 mM increased the amplitude of the first eEPSC by $22.9 \pm 6.9\%$ but had no effect on the amplitude of the second eEPSC (figure 5b). As such, this was associated with a $13.7 \pm 6.3\%$ reduction in the PPF ($n=10$). Subsequent application of L-AP4 decreased the amplitude of the first eEPSC by $39.3 \pm 3.6\%$ and of the second by $28.4 \pm 3\%$ ($p < 0.001$). This was accompanied by a $34.2 \pm 10.1\%$ increase in PPF ($p < 0.001$). Further increasing the extracellular calcium to 4 mM increased the amplitude of the first eEPSC by $27.9 \pm 4\%$ with no effect on the amplitude of the second. This was accompanied by a $21.1 \pm 2.2\%$ reduction in PPF (figure 5c, $n=9$). Subsequent application of L-AP4 decreased the amplitude of the first eEPSC by $58.8 \pm 1.6\%$ and that of the second eEPSC by $45.7 \pm 1.5\%$ ($p < 0.001$) accompanied by a $32 \pm 4.2\%$ increase in PPF ($p < 0.001$). We summarize the L-AP4 depressant effects on the first eEPSC in figure 5d. Values are presented relative to the amplitude of eEPSCs measured just before L-AP4 application, under the different external calcium conditions. L-AP4 decreases eEPSC amplitude by $57.5 \pm 5\%$ in 1 mM calcium ($n = 10$), by $49.6 \pm 3.5\%$ in 1.5 mM calcium ($n = 11$), by $46.4 \pm 5.4\%$ for 2 mM, by $39.3 \pm 3.6\%$ in 2.5 mM calcium ($n = 10$), and by $58.8 \pm 1.6\%$ in 4 mM calcium ($n = 9$). It appears that as for evoked calcium transients, mGluR4 effects on eEPSC amplitudes and PPF are relatively independent of external calcium concentration.

mGluR4 activation increases synaptic transmission failure rate in a calcium dependent manner

Since the probability of glutamate release from parallel fibre terminals depends on cytosolic calcium concentrations, we investigated whether mGluR4 effects on synaptic transmission failure at the parallel fibre – molecular layer interneuron synapse depend on external calcium concentrations. As shown in figure 6a, the basal failure rate of synaptic transmission under control conditions (2 mM extracellular calcium) was $16.2 \pm 2.7\%$ for the first eEPSC and $2.2 \pm 0.5\%$ for the second eEPSC ($n=10$). Reducing extracellular calcium to 1.5 increased the failure rate of both eEPSCs compared to control values (to $22.4 \pm 1.6\%$ for eEPSC1 and to $3.5 \pm 0.5\%$ for eEPSC2, $n=10$). Further reducing extracellular calcium to 1 mM further increased the failure rate of synaptic transmission compared to control values (to $13.7 \pm 3.2\%$ for eEPSC1 and to $3 \pm 0.7\%$ for eEPSC2, $n=10$). Increasing extracellular calcium concentrations had the opposite effect on the failure rate of synaptic transmission. In 2.5 mM calcium, the failure rate of the first eEPSC

decreased to $3.1 \pm 0.4\%$ ($n=10$) and in 4 mM calcium to $4.9 \pm 0.7\%$ ($n=9$). In these elevated calcium conditions, we never observed failures in the second eEPSC.

We next analysed the effect of L-AP4 application on the failure rate of the first eEPSC under the different calcium conditions. In control conditions (2 mM calcium), L-AP4 increased the failure rate by $133 \pm 16\%$. In order to compare the effect of external calcium on the L-AP4 modulation of failure rate, all effects of L-AP4 in different calcium concentrations were normalized to this value (see figure 6b where the variation in failure rate in 2 mM calcium is 100%). L-AP4 increased the failure rate by $91.1 \pm 12.5\%$ ($n=11$) in 1.5 mM external calcium and by $81.6 \pm 8.1\%$ in 1 mM external calcium ($n=10$). There is no significant difference between the L-AP4 induced increases in failure rate in low external calcium conditions compared to control conditions. In contrast, increasing extracellular calcium concentrations had dramatic effects on the increased failure rate induced by L-AP4 application. In 2.5 mM extracellular calcium, L-AP4 increased the failure rate by $309 \pm 71.8\%$ and by $563 \pm 112.6\%$ in 4 mM calcium. Both of these values are significantly larger than those observed in control calcium ($p < 0.001$).

mGluR4 effects on mEPSCs are not affected by buffering intracellular calcium

Our data strongly suggest that mGluR₄ effects on the amplitude of evoked calcium transients and the amplitude of eEPSCs as well as the ensuing PPF are relatively independent of extracellular calcium concentrations. We took this notion further by studying the effects of L-AP4 application on miniature (m) EPSCs recorded from molecular layer interneurons. It has long been thought that spontaneous liberation of synaptic vesicles that underlie mEPSCs is mostly independent of extracellular calcium concentrations (Katz and Miledi 1963, Dale and Kandel 1990, Scanziani et al 1992, Dittman and Regehr 1996). In addition, variations in mEPSC frequency or amplitude induced by different pharmacological manipulations give insight into the respective pre- or postsynaptic nature of these changes (Malgaroli and Tsien, 1992; Manabe et al., 1992). We analysed the effect of mGluR₄ activation on mEPSCs under normal intracellular calcium conditions and after chelating intracellular calcium with BAPTA-AM (200 μ M). Figure 7a shows a typical recording of mEPSCs under control conditions, in the presence of L-AP4 (100 μ M) and during recovery. In light of the variable amplitude of these mEPSCs we delimited 2 classes of events: mEPSCs that were inferior to 100 pA (small events) and those superior to 100 pA (large events). After analysing the effects of L-AP4 on

these mEPSCs, we discerned no difference between these two classes (supplementary figure 1) and as such, we analyzed all mEPSC events together in the same group. In control conditions, mEPSC frequency was 0.063 ± 0.009 Hz (figure 7b, $n=10$). L-AP4 significantly and reversibly reduced this frequency to 0.038 ± 0.007 Hz, a decrease of $39.4 \pm 6.6\%$ ($p<0.01$). There was no concomitant effect on mEPSC amplitude (figure 7b). In order to determine whether L-AP4 effects on mEPSC frequency depend on intracellular calcium concentrations, we repeated the experiments in the presence of $200 \mu\text{M}$ BAPTA-AM. This ester-containing form of BAPTA permits chelation of intracellular calcium when applied to the bath solution (Tsien, 1981). Neither the amplitude, nor the frequency of mEPSCs was affected by 20 min bath application of BAPTA-AM (figure 7c, $n=6$). Furthermore, in the presence of BAPTA-AM, L-AP4 reduced mEPSC frequency by $37.9 \pm 4.2\%$ (from 0.057 ± 0.007 to 0.036 ± 0.004 Hz; $p=0.01$), a value comparable to the reduction observed in control conditions. The mEPSC amplitude remained unchanged. These data strongly suggest that the majority of L-AP4 effects on mEPSCs are independent of intracellular calcium levels.

mGluR₄ directly interact with protein partners involved in spontaneous transmitter release

In our previous study (Ramos et al 2012) we show that mGluR4 interacts with a large number of presynaptic proteins, including those involved in the process of exocytosis. Using peptide affinity chromatography techniques we identified two cytoplasmic domains of mGluR4 that interact with key exocytosis proteins like Munc18-1, SNAP-25, Synapsin I, and Syntaxin. One site is on the proximal part of the C-Terminal tail and the other on the second intracellular loop. In order to test whether the specific amino acid sequences in these identified cytoplasmic mGluR4 domains are implicated in the L-AP4 effects observed on molecular layer interneuron mEPSCs, eEPSCs and evoked calcium transients we synthesized peptides corresponding to these domains (GeneCust, Luxembourg). These included the AN-23 peptide corresponding to the proximal part of the C-Terminal tail and the NQ-25 peptide corresponding to the 2nd intracellular loop. These peptides were coupled to a TAT sequence that allowed them to gain access to the intracellular compartment (Ster et al 2009, Moutin et al 2012). Once in the cytosol, they compete with mGluR4 for presynaptic protein partners. These peptides were applied in sufficient concentration in order to reduce the probability that native mGluR4 will bind these presynaptic proteins (Ramos et al. 2012).

We examined the effect of L-AP4 on mEPSCs, eEPSCs in molecular layer interneurons

and on parallel fibre evoked presynaptic calcium transients in the presence of AN-23 and NQ-25 peptides. As a control, we quantified L-AP4 effects either in the presence of the TAT motif alone (without peptides) or in the presence of TAT-scrambled peptides. Bath application of either ordered peptides (TAT- AN-23, $2.5 \mu\text{M}$ + TAT- NQ-25, $2.5 \mu\text{M}$) or TAT- scrambled peptides applied in the same concentrations (figure 8a,b) progressively decreased mEPSC frequency over the 20 minute incubation period. As such, before L-AP4 application, mEPSC frequency was significantly reduced compared to the first 5 minutes of peptide application in both experimental conditions ($p<0.05$, $n=6$). After incubation with the ordered peptides, AN-23 + NQ-25, bath application of L-AP4 had no effect on mEPSC frequency (figure 8a). However, in experiments with the scrambled version of the peptides, bath application of L-AP4 significantly and reversibly reduced mEPSC frequency by $41.9 \pm 4\%$ ($p<0.05$, figure 8b). Neither peptide treatment (either ordered TAT-AN-23 + TAT- NQ-25 or TAT- scrambled), nor the subsequent application L-AP4 affected mEPSC amplitude. Because incubation with both ordered and scrambled peptides progressively reduced the frequency of mEPSCs, we examined the effect of the TAT sequence alone on mEPSCs. After 20 minutes of incubation with the TAT peptide, mEPSC frequency was 0.033 ± 0.001 Hz, a value comparable to that obtained after TAT- AN-23 + TAT- NQ-25 or TAT- scrambled peptide incubation ($n=4$, supplementary figure 3). In these conditions, subsequent application of L- AP4 reversibly reduced the frequency by $37.5 \pm 8.4\%$ to 0.021 ± 0.003 Hz ($p<0.05$). This reduction was similar to that observed in control experiments (figure 7b) and after incubation with scrambled peptides (figure 8b). There was no effect on average mEPSC amplitude. These data show that loading the cytoplasm with peptides that effectively compete for mGluR4 liaison sites for key exocytosis proteins abolishes the effect of L-AP4 on mEPSC frequency. The fact that these various treatments had no effect on L-AP4 modulations mEPSC amplitude, confirms the presynaptic nature of mGluR4 actions. By interacting with the exocytosis machinery, mGluR4s can modulate spontaneous release of glutamate. This represents a complimentary mechanism to the inhibition of voltage gated calcium channels responsible for the mGluR4 effects on eEPSCs and calcium transients on eEPSCs and evoked calcium transients.

We next looked at the effect of TAT- AN-23 + TAT- NQ-25 competition on evoked synaptic transmission in molecular layer interneurons. After 20 minutes of bath application of ordered TAT- AN-23 + TAT- NQ-25 peptides, subsequent application of L-AP4 reduced both the first and second eEPSC by 53.4 ± 3.7 and 39.3 ± 3.1 % respectively

($p < 0.001$, $n = 7$, figure 8c). This was associated with a significant and reversible increase in PPF from 1.67 to 2.73 ($p < 0.001$). Interestingly, both application of the ordered peptides had no significant effect on the failure rate of either the first or the second eEPSC (supplementary figure 2). Subsequent application of L-AP4 significantly increased the failure rate of the first eEPSC ($44 \pm 7.8\%$ in L-AP4 compared with $24.9 \pm 5.1\%$ just prior to L-AP4 application, $p < 0.01$). Similarly, an increase was also observed in the failure rate of the second eEPSC ($5.7 \pm 0.8\%$ in L-AP4 compared with $2.6 \pm 0.7\%$ just prior to L-AP4 application, $p < 0.05$). These data suggest that competing with the mGluR4 liaison sites for key exocytosis proteins has no effect on evoked release of glutamate from parallel fibre terminals.

Finally, we examined the effect of the ordered TAT- AN-23 and TAT- NQ-25 peptides on the L-AP4 effect on evoked calcium transients. As shown in figure 8d, after 20 minutes of peptide incubation, subsequent application of L-AP4 significantly and reversibly reduced the amplitude of evoked calcium transients ($n = 3$). This reduction ($28.9 \pm 3.7\%$) was similar to that observed with L-AP4 application alone ($25.2 \pm 2.4\%$). These data suggest that as for eEPSCs, peptide competition for mGluR4 liaison sites for key exocytosis proteins does not affect the amplitude of evoked calcium transients.

Discussion

Our data suggest that mGluR4 reduces synaptic transmission at the parallel fibre – molecular layer interneuron synapse by at least two complementary mechanisms. One mechanism, revealed by the effects on evoked calcium transients and eEPSCs, requires the activation of a $G\alpha_q$ protein and the Phospholipase C signalling pathway. The other mechanism, revealed by an analysis of spontaneous glutamate release (mEPSCs), is linked to interactions between mGluR4 and the presynaptic release machinery.

Pharmacological Profile of mGluR4s at the parallel fibre – molecular layer interneuron synapse

We show that mGluR4s at the parallel fibre - molecular layer interneuron synapse have the same pharmacological profile as those at parallel fibre - Purkinje cell synapses. Saturating concentrations of L-AP4 produce a significant and reversible reduction in the amplitude of molecular layer interneuron eEPSCs accompanied by an increase in paired pulse facilitation that were of the

same order of magnitude as those seen at parallel fibre – Purkinje cell synapses. The L-AP4 effect is largely potentiated in the presence of the positive allosteric mGluR4 modulator, PHCCC, and nearly abolished by the non-selective group III antagonist, MSOP. At least from a functional point of view, activating parallel fibre mGluR4s has the same effect on synaptic transmission independently of the target cell. At first glance, this is not surprising. However, it has been demonstrated that not only the sub-type composition, but also the concentration of receptors may differ at synapses arising from the same nerve terminal that can lead to differences in transmission properties. For example, in the hippocampus, mGluR7 is heavily expressed on CA3 axon terminals that oppose GABAergic interneurons in the CA1 region, whereas the same axon terminal that opposes CA1 pyramidal neurons is devoid of this receptor (Shigemoto et al 1996). Furthermore, glutamate release from a single CA3 pyramidal cell is inhibited by group III agonists at CA3 – CA1 interneuron synapses, but not at CA3 - CA1 pyramidal cell synapses (Scanziani et al 1998). These target cell specific properties can have important implications for neuronal network activity. With respect to mGluR4, the function of these receptors in the cerebellar cortical network is still not well known and merits investigation particularly in light of their strategic location on both parallel fibre – Purkinje cell and parallel fibre – molecular layer interneuron synapses. However, given the fact that to this day we are still in need of selective, high affinity antagonists for mGluR4, this is a very difficult task.

We have confirmed that mGluR4s at the parallel fibre – molecular layer interneuron synapse, like those found at the parallel fibre – Purkinje cell synapse (Abitbol et al 2012), modulate synaptic transmission by activating Phospholipase C. Furthermore, we show here that this effect clearly involves the activation of a $G\alpha_q$ protein. These data are in contrast with the classical idea that group III mGluRs are coupled to Gi/o proteins and exert their cellular effects by down regulating the adenylate cyclase signalling pathway (Anwyl 1999, Nicoletti et al 2011). In transfected cell lines like BHK and CHO (Thomsen et al 1992 and Tanabe et al 1993 respectively) or in guinea pig cerebellar slices (Neil et al 1996), biochemical studies designed to assay cAMP levels show that group III metabotropic receptor activation inhibits forskalin-induced cAMP

generation. The inconsistency between these results and ours could arise from differences in experimental preparations. For example, forced transfection of mGluR4 receptors into expression systems may lead to atypical coupling between receptors and intracellular second messenger systems. While Neil et al (1996) studied native group III mGluRs in cerebellar slices they observed effects of L-AP4 on induced cAMP levels only at very elevated (> 1 mM) agonist concentrations. It is possible that such concentrations may have non-specific effects on cAMP production and other cellular processes. We have shown that in rat cerebellar slices the EC50 of L-AP4 on parallel fibre evoked calcium transients is around 1,8 μ M (Abitbol et al 2008). Interestingly, and in line with our new data, Perroy et al (2000) provide evidence for an atypical signalling pathway for mGluR7 in cerebellar granule cells that involves a Go-like protein, Phospholipase C and protein kinase C. Similarly, Erdmann et al (2012) show that mGluR8 does not depress glutamate release at hippocampal synapses via down regulation of adenylate cyclase. Taken together, our results show that native mGluR4s present on parallel fibres in the cerebellar cortex inhibit glutamatergic synaptic transmission at synapses formed with molecular layer interneurons, and this by way of a $G\alpha_q$ / Phospholipase C signalling pathway.

We are still a long way from deciphering the complete signalling pathway for mGluR4 in the cerebellar cortex. It is clear however that in our system mGluR4 acts via a protein $G\alpha_q$ / PLC / PKC pathway. Given this, several interesting possibilities present themselves. It has recently been shown that in the hippocampus (slices and primary cultures) protein kinase C phosphorylation of SNAP-25, a protein largely implicated in exocytosis, negatively regulates N-type voltage gated calcium channels (Pozzi et al 2008). Furthermore, this inhibition is known to decrease presynaptic calcium transients and neurotransmitter release (Verderio et al 2004, Jarvis and Zamponi 2005). As such, mGluR4 activation may engage a similar mechanism at the parallel fibre synapses and contribute to the mGluR4 effect on evoked glutamate release. Another possible mechanism, linked to the $G\alpha_q$ / PLC / PKC signalling pathway involves a membrane bound lipid, phosphatidylinositol biphosphate (PIP2). PIP2 has been shown to interact with vesicular trafficking proteins. PLC

hydrolyses PIP2 into IP3 and DAG. As such, mGluR4 activation of PLC could result in a decrease in PIP2 levels and a reduction in vesicular release of glutamate (Khuong et al 2013, Honigmann et al 2013, Ammar et al 2013).

mGluR4 controls evoked glutamate release : influence of extracellular calcium

During parallel fibre stimulation, calcium influx into presynaptic terminals, which is a prerequisite for evoked glutamate release, results from the activation of diverse calcium channels including P/Q-, N- and R- types (Mintz et al 1995, Brown et al 2004, Daniel et al 2004). We have recently shown that mGluR4 reduces glutamate release from these terminals by inhibiting each of these channel types to various degrees (Abitbol et al 2012). Given that the magnitude of evoked calcium transients and ultimately the amount of glutamate released during parallel fibre stimulation is highly dependent on the driving force for calcium (Mintz et al 1995), we analysed the effect of mGluR4 activation on the amplitude of evoked calcium transients, eEPSCs, paired pulse facilitation and the failure rate of eEPSCs in various extracellular calcium concentrations. Our data shows that the L-AP4 induced relative reduction of these transients seems to be independent of external calcium levels.

Similar results were obtained for mGluR4 modulation of parallel fibre evoked EPSCs in molecular layer interneurons. Increasing or decreasing extracellular calcium levels notably affected the amplitude of both the first and the second eEPSC, but not to the same degree. In lowering external calcium, the amplitude of the first eEPSC was reduced to a greater extent than the second, which lead to a small increase in paired pulse facilitation. When extracellular calcium concentrations were increased, the increase in eEPSC amplitude was more apparent for the first evoked response than for the second leading to a decrease in paired pulse facilitation. At the same time, we observed that modulating external calcium concentrations also affected the failure rate of synaptic transmission. The failure rate of the first eEPSC increased with decreases in external calcium, while increases in external calcium levels showed a reverse trend. These effects on eEPSC amplitude, paired pulse facilitation and failure rate can be explained by the low release probability of this synapse. Increasing or decreasing extracellular calcium increases or

decreases the probability of transmitter release and modifies the amplitude of eEPSCs accordingly (Mintz et al 1995). In a paired pulse paradigm applied to a low release probability synapse, the amplitude of the second eEPSC is systematically larger than the first due to the accumulation of calcium in the pre synaptic terminal between stimulations (Fioravante and Regehr, 2011). Because of this residual calcium factor, the second response will be less influenced by modifications in extracellular calcium than the first response. Along these same lines, given that neurotransmitter release is strongly dependent on extracellular calcium levels (Mintz et al 1995), as we show here, the failure rate of synaptic transmission is inversely proportional to extracellular calcium (also see Kneisler and Dingledine, 1995).

It is interesting to note that independently of the external calcium concentration, the relative depression evoked by activation of mGluR4 is the same for evoked calcium transients and evoked EPSCs. Increasing or decreasing external calcium will influence evoked calcium influx, cytosolic calcium levels in the presynaptic terminal and glutamate release accordingly. Activation of mGluR4 by saturating concentrations of L-AP4 will engage the $G\alpha_q$ / PLC / PKC signalling pathway and inhibit voltage gated calcium channels. These channels will be inhibited to the same degree, whatever the magnitude of the evoked calcium currents. As such, the relative mGluR4 - inhibition of evoked calcium influx and of evoked EPSCs will be the same independently of the driving force for calcium, that is to say, independently of the external calcium concentration.

mGluR4 controls spontaneous calcium independent glutamate release

We have examined whether or not mGluR4 activation could contribute to inhibition of spontaneous synaptic release independently of presynaptic calcium entry. To this end, we analysed the effect of L-AP4 on miniature EPSCs recorded from molecular layer interneurons. mEPSCs are synaptic events that are largely independent of evoked calcium entry (Scanziani et al 1992; Dittman and Regehr 1996; Chen and Regehr 1997). We demonstrate that bath application of L-AP4 reduces the frequency of mEPSCs by around 40%, without any change in their amplitude. These data are coherent with those reported in the olfactory bulb, where L-AP4 reduces mitral cell mEPSCs via the activation of

mGluR8 (Schoppa and Westbrook 1997). Interestingly, we found that even in the presence of the fast calcium buffer, BAPTA-AM, the reduction in mEPSC frequency was still around 40%. These data confirm that mGluR4 depresses glutamate liberation at parallel fibre terminals independently of evoked calcium entry via inhibition of P/Q-, N- and R- voltage gated channels (Abitbol et al 2010). There is evidence that stochastic opening of these channels (with a preferential role of R- type channels) could account for 50% of spontaneous glutamate release (Ermolyuk et al 2013). We cannot rule out that mGluR4 - mediated inhibition of R- type calcium channels contribute to the reduction of spontaneous glutamate release. This is particularly pertinent for calcium channels located close to docked vesicles in the active zone of the synapse.

Our previous results show that native mGluR4s might interact with presynaptic vesicular trafficking proteins (such as Munc18-1, synapsin, and syntaxin) bind to the second intracellular loop and the proximal part of the C terminal tail of mGluR4 (Ramos et al 2012). We generated peptides that mimic amino acid sequences in these regions of the receptor: NQ-25 for the second intracellular loop and AN-23 for the proximal part of the C terminal. These peptides, coupled to a TAT sequence, compete with mGluR4 for its protein partners, thus reducing the possibility of protein interactions with the receptor. These peptides had no effect on either evoked calcium transients or evoked EPSCs, nor did they affect the L-AP4 induced decrease associated with mGluR4 activation. On the other hand, co-application of TAT- NQ-25 and TAT- AN-23 strongly reduced the L-AP4 effects on the frequency of miniature EPSCs with no effect on the amplitude. This unilateral effect on mEPSC frequency confirms that these peptides act on presynaptic loci of the synapse. Interestingly, we found that the TAT peptide alone reduced basal mEPSC frequency but had no effect on L-AP4 induced reductions in mEPSC frequency. Since the TAT peptide is internalized through its interactions with cargo proteins (Heitz et al 2009) and various macromolecules like glycoaminoglycans (GAG) (Console et al 2003), we cannot rule out the possibility that internalization of TAT denatures the membrane of parallel fibre terminals at certain liberation sites resulting in a reduction glutamate release leading to the initial reduction in mEPSC frequency observed under all TAT conditions.

However, it appears that TAT itself does not interfere with mGluR4 – exocytosis protein interactions. When we applied TAT coupled to AN-23 and NQ-25, there was the same reduction in basal mEPSC frequency as with TAT alone, and subsequent L-AP4 application had no effect. It is clear that mGluR4 activation reduces spontaneous glutamate release by interacting with certain presynaptic vesicular trafficking proteins. This mechanism, complimentary to mGluR4 effects on voltage gated calcium channels, is largely independent of intracellular calcium concentrations.

In perspective, given that molecular layer interneurons synapse not only among themselves (Kondo and Marty 1998, Briatore et al., 2010), but also project to Purkinje cells (Midtgaard 1992, Briatore et al., 2010) thus modulating the output activity of this structure (Häusser and Clark 1997), the fact that the parallel fibre – molecular layer interneuron synapses posses functional mGluR4s has interesting implications for information processing in the cerebellum and merit to be studied.

References

- Abitbol, K., Acher, F., and Daniel, H. (2008). Depression of excitatory transmission at PF-PC synapse by group III metabotropic glutamate receptors is provided exclusively by mGluR4 in the rodent cerebellar cortex. *J. Neurochem.* *105*, 2069–2079.
- Abitbol, K., McLean, H., Bessiron, T., and Daniel, H. (2012). A new signalling pathway for parallel fibre presynaptic type 4 metabotropic glutamate receptors (mGluR4) in the rat cerebellar cortex. *J. Physiol. (Lond.)* *590*, 2977–2994.
- Anwyl, R. (1999). Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain Res. Brain Res. Rev.* *29*, 83–120.
- Atluri, P.P., and Regehr, W.G. (1998). Delayed release of neurotransmitter from cerebellar granule cells. *J. Neurosci.* *18*, 8214–8227.
- Brenowitz, S.D., and Regehr, W.G. (2007). Reliability and heterogeneity of calcium signaling at single presynaptic boutons of cerebellar granule cells. *J. Neurosci.* *27*, 7888–7898.
- Briatore, F., Patrizi, A., Viltono, L., Sassoè-Pognetto, M., and Wulff, P. (2010). Quantitative organization of GABAergic synapses in the molecular layer of the mouse cerebellar cortex. *PLoS ONE* *5*, e12119.
- Brown, S.P., Safo, P.K., and Regehr, W.G. (2004). Endocannabinoids inhibit transmission at granule cell to Purkinje cell synapses by modulating three types of presynaptic calcium channels. *J. Neurosci.* *24*, 5623–5631.
- Carter, A.G., and Regehr, W.G. (2002). Quantal events shape cerebellar interneuron firing. *Nat. Neurosci.* *5*, 1309–1318.
- Cartmell, J., and Schoepp, D.D. (2000). Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. *J. Neurochem.* *75*, 889–907.
- Chen, C., and Regehr, W.G. (1997). The mechanism of cAMP-mediated enhancement at a cerebellar synapse. *J. Neurosci.* *17*, 8687–8694.
- Clark, B.A., and Cull-Candy, S.G. (2002). Activity-dependent recruitment of extrasynaptic NMDA receptor activation at an AMPA receptor-only synapse. *J. Neurosci.* *22*, 4428–4436.
- Console, S., Marty, C., García-Echeverría, C., Schwendener, R., and Ballmer-Hofer, K. (2003). Antennapedia and HIV transactivator of transcription (TAT) “protein transduction domains” promote endocytosis of high molecular weight cargo upon binding to cell surface glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* *278*, 35109–35114.
- Corti, C., Aldegheri, L., Somogyi, P., and Ferraguti, F. (2002). Distribution and synaptic localisation of the metabotropic glutamate receptor 4 (mGluR4) in the rodent CNS. *Neuroscience* *110*, 403–420.
- Daniel, H., and Crepel, F. (2001). Control of Ca²⁺ influx by cannabinoid and metabotropic glutamate receptors in rat cerebellar cortex requires K(+) channels. *J. Physiol. (Lond.)* *537*, 793–800.
- Daniel, H., Rancillac, A., and Crepel, F. (2004). Mechanisms underlying cannabinoid inhibition of presynaptic Ca²⁺ influx at parallel fibre synapses of the rat cerebellum. *J. Physiol. (Lond.)* *557*, 159–174.
- Dittman, J.S., and Regehr, W.G. (1996). Contributions of calcium-dependent and calcium-independent mechanisms to presynaptic inhibition at a cerebellar synapse. *J. Neurosci.* *16*, 1623–1633.
- Erdmann, E., Rupprecht, V., Matthews, E., Kukley, M., Schoch, S., and Dietrich, D. (2012). Depression of release by mGluR8 alters Ca²⁺ dependence of release machinery. *Cereb. Cortex* *22*, 1498–1509.
- Ermolyuk, Y.S., Alder, F.G., Surges, R., Pavlov, I.Y., Timofeeva, Y., Kullmann, D.M., and Volynski, K.E.

- (2013). Differential triggering of spontaneous glutamate release by P/Q-, N- and R-type Ca²⁺ channels. *Nat Neurosci* *16*, 1754–1763.
- Ferraguti, F., and Shigemoto, R. (2006). Metabotropic glutamate receptors. *Cell Tissue Res.* *326*, 483–504.
- Fioravante, D., and Regehr, W.G. (2011). Short-term forms of presynaptic plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* *21*, 269–274.
- Gerlai, R., Roder, J.C., and Hampson, D.R. (1998). Altered spatial learning and memory in mice lacking the mGluR4 subtype of metabotropic glutamate receptor. *Behav. Neurosci.* *112*, 525–532.
- Häusser, M., and Clark, B.A. (1997). Tonic Synaptic Inhibition Modulates Neuronal Output Pattern and Spatiotemporal Synaptic Integration. *Neuron* *19*, 665–678.
- Heitz, F., Morris, M.C., and Divita, G. (2009). Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Br. J. Pharmacol.* *157*, 195–206.
- Hennen, S., Wang, H., Peters, L., Merten, N., Simon, K., Spinrath, A., Blättermann, S., Akkari, R., Schrage, R., Schröder, R., Schulz D., Vermeiren C., Zimmermann K., Kehraus S., Drewke C., Pfeifer A., König G.M., Mohr K., Gillard M., Müller C.E., Lu R.Q., Gomeza J., and Kostenis E. (2013). Decoding signaling and function of the orphan G protein-coupled receptor GPR17 with a small-molecule agonist. *Sci Signal* *6*, ra93.
- Jarvis, S.E., and Zamponi, G.W. (2005). Masters or slaves? Vesicle release machinery and the regulation of presynaptic calcium channels. *Cell Calcium* *37*, 483–488.
- Kneisler, T.B., and Dingledine, R. (1995). Synaptic input from CA3 pyramidal cells to dentate basket cells in rat hippocampus. *J. Physiol. (Lond.)* *487 (Pt 1)*, 125–146.
- Kondo, S., and Marty, A. (1998). Synaptic currents at individual connections among stellate cells in rat cerebellar slices. *J Physiol* *509*, 221–232.
- Llano, I., Marty, A., Armstrong, C.M., and Konnerth, A. (1991). Synaptic- and agonist-induced excitatory currents of Purkinje cells in rat cerebellar slices. *J. Physiol. (Lond.)* *434*, 183–213.
- Lorez, M., Humbel, U., Pflimlin, M.-C., and Kew, J.N.C. (2003). Group III metabotropic glutamate receptors as autoreceptors in the cerebellar cortex. *Br. J. Pharmacol.* *138*, 614–625.
- Maj, M., Bruno, V., Dragic, Z., Yamamoto, R., Battaglia, G., Inderbitzin, W., Stoehr, N., Stein, T., Gasparini, F., Vranesic, I., et al. (2003). (-)-PHCCC, a positive allosteric modulator of mGluR4: characterization, mechanism of action, and neuroprotection. *Neuropharmacology* *45*, 895–906.
- Malgaroli, A., and Tsien, R.W. (1992). Glutamate-induced long-term potentiation of the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *Nature* *357*, 134–139.
- Manabe, T., Renner, P., and Nicoll, R.A. (1992). Postsynaptic contribution to long-term potentiation revealed by the analysis of miniature synaptic currents. *Nature* *355*, 50–55.
- Mateos, J.M., Azkue, J., Sarría, R., Kuhn, R., Grandes, P., and Knöpfel, T. (1998). Localization of the mGlu4a metabotropic glutamate receptor in rat cerebellar cortex. *Histochem. Cell Biol.* *109*, 135–139.
- Midgaard, J. (1992). Stellate cell inhibition of Purkinje cells in the turtle cerebellum in vitro. *J. Physiol. (Lond.)* *457*, 355–367.
- Mintz, I.M., Sabatini, B.L., and Regehr, W.G. (1995). Calcium control of transmitter release at a cerebellar synapse. *Neuron* *15*, 675–688.
- Moutin, E., Raynaud, F., Roger, J., Pellegrino, E., Homburger, V., Bertaso, F., Ollendorff, V., Bockaert, J., Fagni, L., and Perroy, J. (2012). Dynamic remodeling of scaffold interactions in dendritic spines controls synaptic excitability. *J. Cell Biol.* *198*, 251–263.
- Nahir, B., and Jahr, C.E. (2013). Activation of extrasynaptic NMDARs at individual parallel fiber-molecular layer interneuron synapses in cerebellum. *J. Neurosci.* *33*, 16323–16333.
- Neil, K.E., Kendall, D.A., and Alexander, S.P. (1996). Coupling of metabotropic glutamate receptors to phosphoinositide mobilisation and inhibition of cyclic AMP generation in the guinea-pig cerebellum. *Br. J. Pharmacol.* *118*, 311–316.
- Nicoletti, F., Bockaert, J., Collingridge, G.L., Conn, P.J., Ferraguti, F., Schoepp, D.D., Wroblewski, J.T., and Pin, J.P. (2011). Metabotropic glutamate receptors: from the workbench to the bedside. *Neuropharmacology* *60*, 1017–1041.
- Palay, S.L., and Chan-Palay, V. (1974). Cerebellar

cortex: cytology and organization (Springer).

Pekhletski, R., Gerlai, R., Overstreet, L.S., Huang, X.P., Agopyan, N., Slater, N.T., Abramow-Newerly, W., Roder, J.C., and Hampson, D.R. (1996). Impaired cerebellar synaptic plasticity and motor performance in mice lacking the mGluR4 subtype of metabotropic glutamate receptor. *J. Neurosci.* *16*, 6364–6373.

Perroy, J., Prezeau, L., De Waard, M., Shigemoto, R., Bockaert, J., and Fagni, L. (2000). Selective blockade of P/Q-type calcium channels by the metabotropic glutamate receptor type 7 involves a phospholipase C pathway in neurons. *J. Neurosci.* *20*, 7896–7904.

Pozzi, D., Condliffe, S., Bozzi, Y., Chikhladze, M., Grumelli, C., Proux-Gillardeaux, V., Takahashi, M., Franceschetti, S., Verderio, C., and Matteoli, M. (2008). Activity-dependent phosphorylation of Ser187 is required for SNAP-25-negative modulation of neuronal voltage-gated calcium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 323–328.

Ramos, C., Chardonnet, S., Marchand, C.H., Decottignies, P., Ango, F., Daniel, H., and Le Maréchal, P. (2012). Native presynaptic metabotropic glutamate receptor 4 (mGluR4) interacts with exocytosis proteins in rat cerebellum. *J. Biol. Chem.* *287*, 20176–20186.

Rancillac, A., and Barbara, J.G. (2005). Frequency-dependent recruitment of inhibition mediated by stellate cells in the rat cerebellar cortex. *J. Neurosci. Res.* *80*, 414–423.

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

Scanziani, M., Capogna, M., Gähwiler, B.H., and Thompson, S.M. (1992). Presynaptic inhibition of miniature excitatory synaptic currents by baclofen and adenosine in the hippocampus. *Neuron* *9*, 919–927

Scanziani, M., Gähwiler, B.H., and Thompson, S.M. (1995). Presynaptic inhibition of excitatory synaptic transmission by muscarinic and metabotropic glutamate receptor activation in the hippocampus: are Ca²⁺ channels involved? *Neuropharmacology* *34*, 1549–1557.

Scanziani, M., Gähwiler, B.H., and Charpak, S. (1998). Target cell-specific modulation of transmitter release at terminals from a single axon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 12004–12009.

Schoppa, N.E., and Westbrook, G.L. (1997). Modulation of mEPSCs in olfactory bulb mitral cells

by metabotropic glutamate receptors. *J. Neurophysiol.* *78*, 1468–1475.

Shigemoto, R., Kulik, A., Roberts, J.D., Ohishi, H., Nusser, Z., Kaneko, T., and Somogyi, P. (1996). Target-cell-specific concentration of a metabotropic glutamate receptor in the presynaptic active zone. *Nature* *381*, 523–525.

Ster, J., de Bock, F., Bertaso, F., Abitbol, K., Daniel, H., Bockaert, J., and Fagni, L. (2009). Epac mediates PACAP-dependent long-term depression in the hippocampus. *J. Physiol. (Lond.)* *587*, 101–113.

Tanabe, Y., Nomura, A., Masu, M., Shigemoto, R., Mizuno, N., and Nakanishi, S. (1993). Signal transduction, pharmacological properties, and expression patterns of two rat metabotropic glutamate receptors, mGluR3 and mGluR4. *J. Neurosci.* *13*, 1372–1378.

Thomas, N.K., Jane, D.E., Tse, H.W., and Watkins, J.C. (1996). alpha-Methyl derivatives of serine-O-phosphate as novel, selective competitive metabotropic glutamate receptor antagonists. *Neuropharmacology* *35*, 637–642.

Thomsen, C., Kristensen, P., Mulvihill, E., Haldeman, B., and Suzdak, P.D. (1992). L-2-amino-4-phosphonobutyrate (L-AP4) is an agonist at the type IV metabotropic glutamate receptor which is negatively coupled to adenylate cyclase. *Eur. J. Pharmacol.* *227*, 361–362.

Tsien, R.Y. (1981). A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature* *290*, 527–528.

Verderio, C., Pozzi, D., Pravettoni, E., Inverardi, F., Schenk, U., Coco, S., Proux-Gillardeaux, V., Galli, T., Rossetto, O., Frassoni, C., et al. (2004). SNAP-25 Modulation of Calcium Dynamics Underlies Differences in GABAergic and Glutamatergic Responsiveness to Depolarization. *Neuron* *41*, 599–610.

Zhang, W., and Linden, D.J. (2009). Neuromodulation at single presynaptic boutons of cerebellar parallel fibers is determined by bouton size and basal action potential-evoked Ca transient amplitude. *J. Neurosci.* *29*, 15586–15594.

Zucker, R.S., and Regehr, W.G. (2002). Short-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Physiol.* *64*, 355–405.

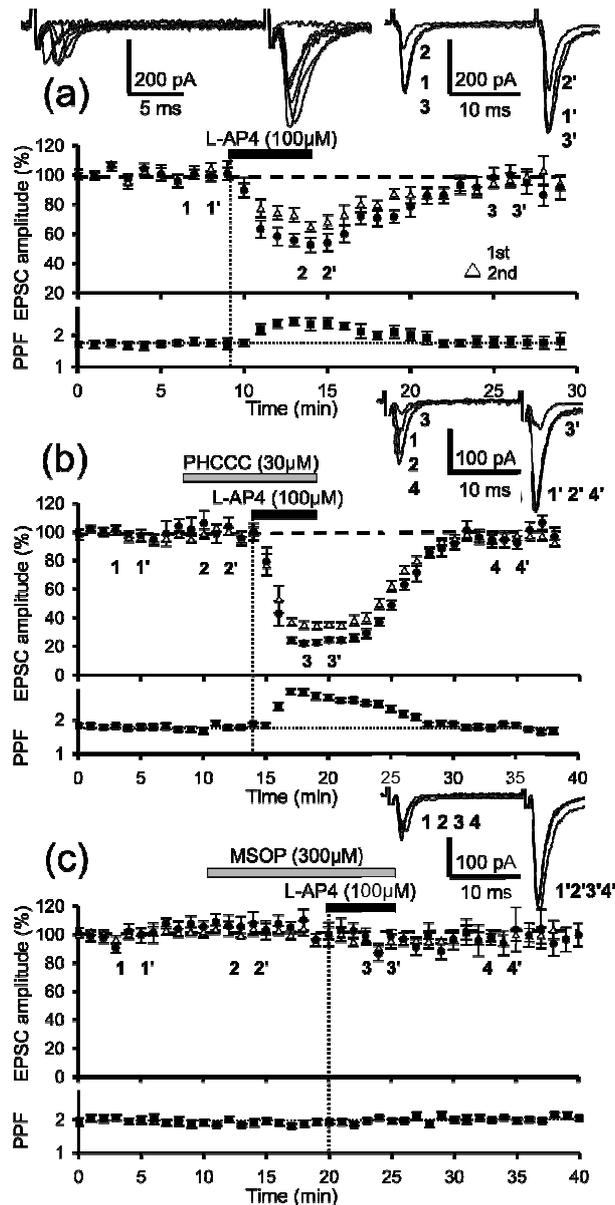


Fig. 1: Functional mGluR4 are present at Parallel fibre-Molecular Layer Interneuron synapses. (a) Plot of normalized amplitudes of PF-mediated excitatory postsynaptic currents (eEPSCs) as a function of time before, during and after bath application of 100 μM L-AP4 (horizontal filled bar). Each point is the mean \pm SEM of 10 separate experiments. The reversible L-AP4 depression of eEPSCs is accompanied by a transient increase in paired-pulse facilitation (PPF). The inset on the left shows superimposed traces corresponding to responses of one molecular layer interneuron (MLI) to 6 successive paired-PF stimuli with an inter-stimulus interval of 20 ms, recorded in control conditions. Note the variable latencies and amplitudes of eEPSCs elicited by 5 of these paired-stimuli and the failure of synaptic transmission for the other. The inset on the right displays representative superimposed averaged monosynaptic eEPSCs traces (failures excluded) recorded in one MLI before (1, 1'), during (2, 2') and after (3, 3') L-AP4 application. Each trace is an average of 5-15 consecutive trials. (b) The same as in (a), with sequential application of the selective mGluR4 positive allosteric agonist PHCC (30 μM) and L-AP4 (100 μM) ($n=10$). (c) The same as in (a), with sequential application of the broad spectrum group III mGluR antagonists MSOP (300 μM) and L-AP4 (100 μM) ($n=6$). Note that PHCC potentiates and MSOP prevents the L-AP4-mediated depressant effect on eEPSC amplitude respectively.

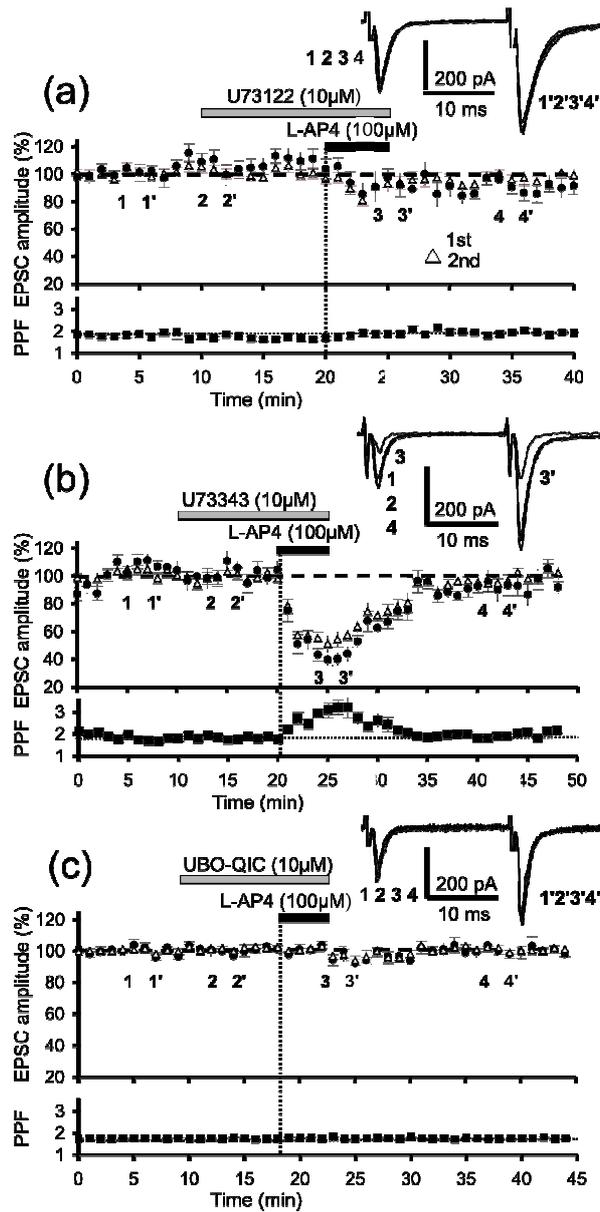


Fig. 2: L-AP4-mediated inhibition of synaptic transmission involves activation of a Gαq-PLC pathway. (a) The plot represents normalized amplitudes of eEPSCs recorded as a function of time before, during and after sequential bath application of the membrane-permeable PLC inhibitor U-73122 (10 μM) and L-AP4 (100 μM) (n=10). The insets displays averaged (5-15 traces) superimposed eEPSCs in one of these experiments, recorded at the indicated time. (b) Same as in (a) with sequential bath application of the inactive analogue U73343 (10 μM) and L-AP4 (100 μM) (n= 10). Insets as in (a). (c) Same as in (a) with sequential bath application of the membrane-permeable Gαq inhibitor UBO-QIC (10 μM) and L-AP4 (100 μM) (n=4). Sample traces are shown in the inset. Note that U73122 and UBO-QIC prevent the L-AP4-mediated depressant effect on eEPSC amplitude.

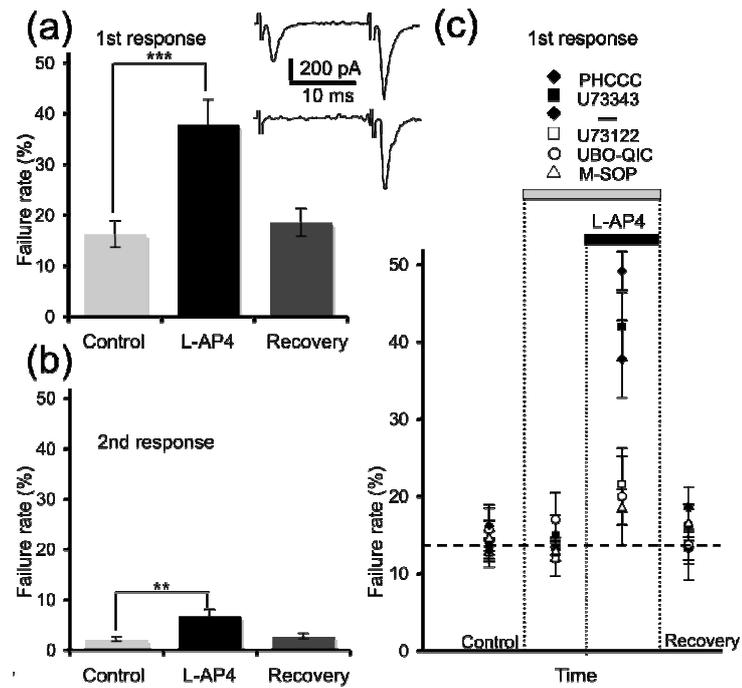


Fig. 3: Effects of L-AP4 on failure rate at Parallel fibre-Molecular Layer Interneuron synapses. The top inset on the right shows responses of one MLI to paired-PF stimulation with an inter-stimulus interval of 20 ms. Synaptic transmission failure is observed for the first of the paired stimulations, whereas the second stimulus elicited an EPSCs. Histogram of the failure rate of eEPSCs following the first stimulus of the paired suprathreshold-intensity stimulation, before, during and after bath application of L-AP4 (100 μ M) (n=10). (b) The same as in (a), with the second stimulus of the paired stimulations. (c) Summary graph illustrating differential effects of mGluR4 agonist/antagonist and Gq-PLC pathway inhibitors, on synaptic transmission failure for the first of the paired stimulations. (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

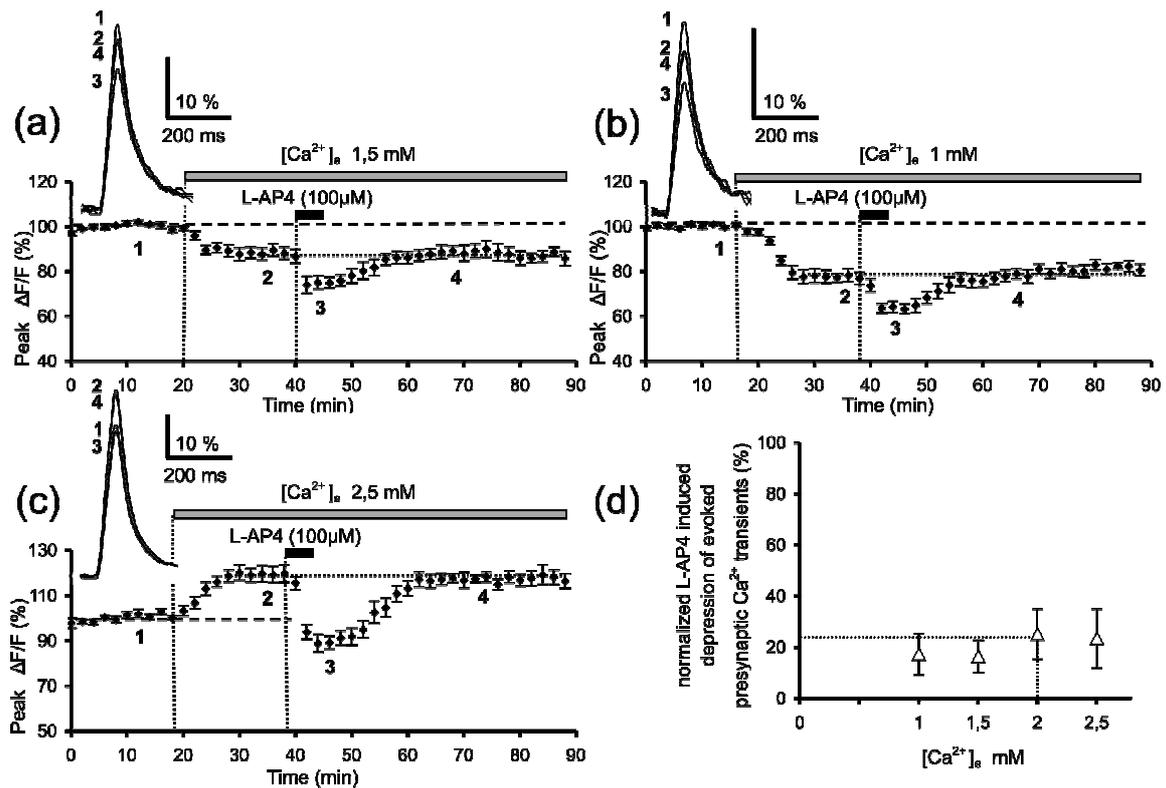


Fig. 4: Effects of L-AP4 on PF-evoked presynaptic calcium influx in diverse concentrations of external calcium. (a) The graph represents the normalized amplitudes of peak Fluo-4FF fluorescence transients ($\Delta F/F$) evoked by 5 PF stimulations (delivered at 100 Hz), plotted as a function of time before (1), during (2) and after (3) bath application of 100 μ M L-AP4, with 1.5mM calcium in the extracellular medium ($n = 7$). The inset on the left displays superimposed averaged fluorescence changes recorded at the indicated times. (b) The same as in (a), with 1 mM calcium in the extracellular medium ($n=7$). (c) The same as in (a), with 2.5 mM calcium in the extracellular medium ($n=7$). (d) Relationship of normalized L-AP4 induced inhibition of peak fluorescence transient to external calcium concentration (Ca^{2+}_e). Note that the amplitude of this depressant effect is largely independent of (Ca^{2+}_e).

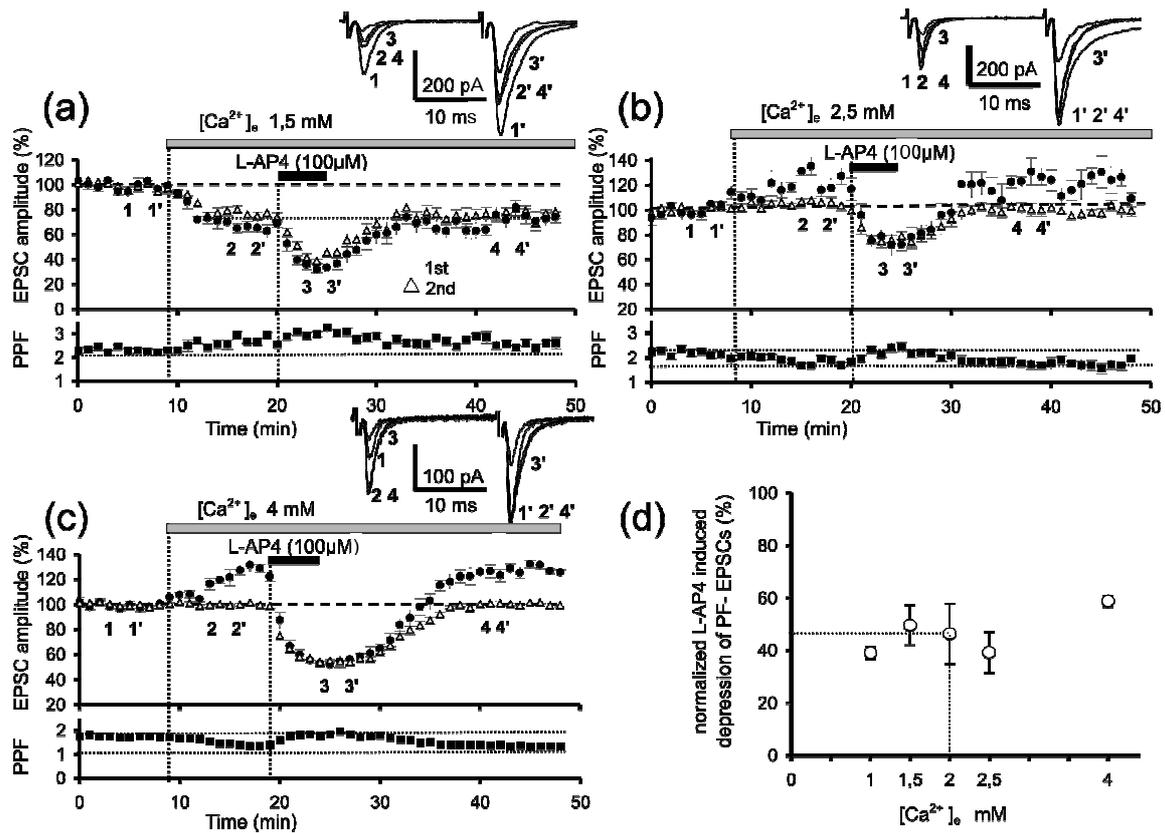


Fig. 5: Effects of L-AP4 on of PF-mediated synaptic responses in diverse concentrations of external calcium. (a) Time course of the normalized amplitudes of eEPSCs in control conditions (2mM Ca^{2+}_e), in 1.5 mM Ca^{2+}_e , and during and after application of 100 μM L-AP4 in this last condition ($n = 7$). The inset displays superimposed averaged fluorescence changes in one of these experiments, recorded at the indicated times. (b) The same as in (a), with 2,5 mM calcium in the extracellular medium ($n=7$). (c) The same as in (a), with 4 mM calcium in the extracellular medium ($n=9$). (d) Relationship of normalized L-AP4 induced inhibition of eEPSCs to external calcium concentration (Ca^{2+}_e). Note that the amplitude of this depressant effect is largely independent of (Ca^{2+}_e).

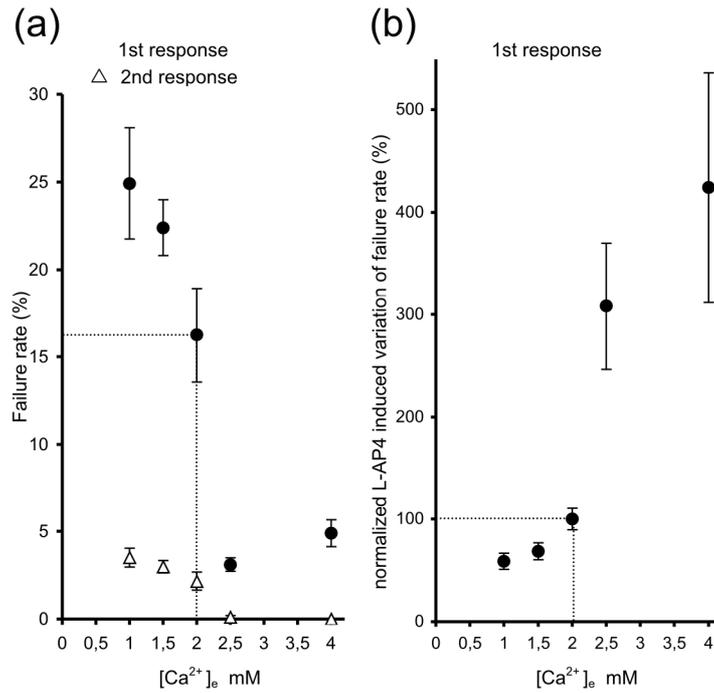


Fig. 6: Ca^{2+}_e dependence of failure rate of PF-mediated synaptic responses and Ca^{2+}_e sensitivity of L-AP4-induced variations in failure rate.

(a) Summary graph illustrating the differential effects of external calcium concentration (Ca^{2+}_e), on failure rate of synaptic transmission for the first (black circle) and the second (white triangle) eEPSC elicited by paired stimulations. (b) Summary graph illustrating for the first response, the differential effects Ca^{2+}_e on normalized L-AP4 induced variation in failure rate. The relative change in failure rate in response to bath application of 100 μ M L-AP4 for each Ca^{2+}_e is normalized with regard to the 2mM (control) Ca^{2+}_e .

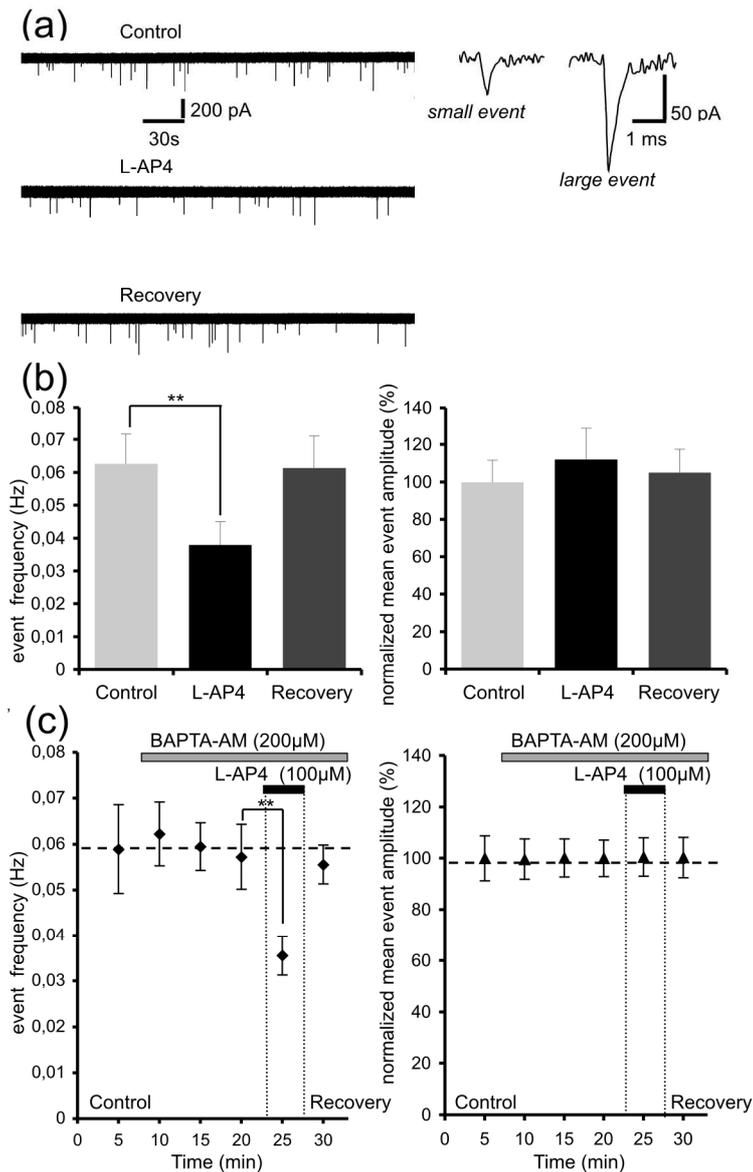


Fig. 7: Effects of L-AP4 on spontaneous release in normal 2mM Ca^{2+}_e and in the presence of BAPTA-AM. (a) Representative data showing the reversible effect of 100 μM L-AP4 on frequency of mEPSCs. There is no significant effect of this agonist on amplitude of mEPSCs. The inset on the right shows two representative events: a mEPSCs with amplitude inferior to 100 pA (small event) and a mEPSC with amplitude superior to 100 pA (large event). (b) Histograms of mEPSCs frequency (left) and of normalized mean mEPSC amplitude (right), before, during and after bath application of 100 μM L-AP4 (n=10). In the amplitude plot, data are normalized to the control amplitude before bath application of L-AP4. (c) Summary graph illustrating the effect of 100 μM L-AP4 on mEPSCs frequency (left) and on normalized mean mEPSC amplitude (right) before and during treatment of the slice with 200 μM BAPTA-AM, as a function of time (n=6). (** $P < 0.01$).

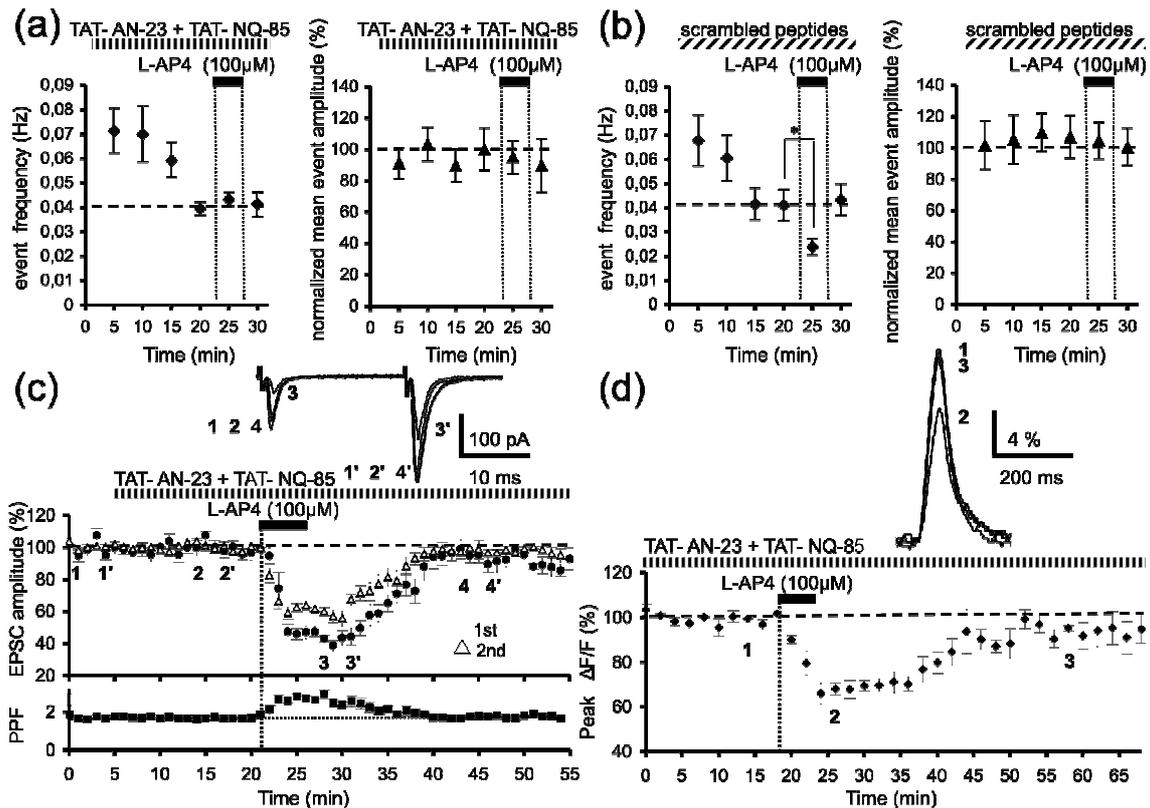
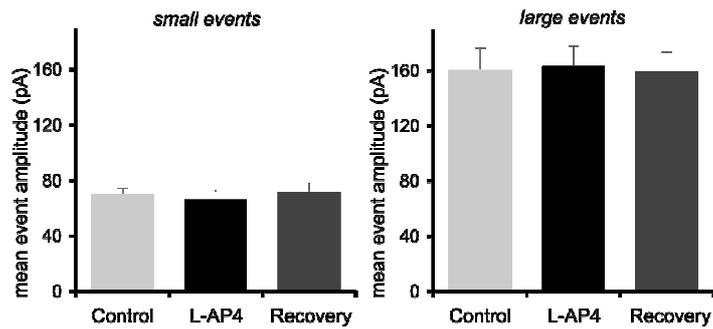
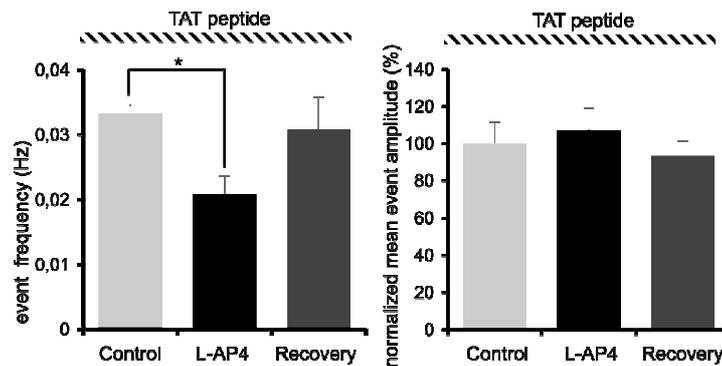


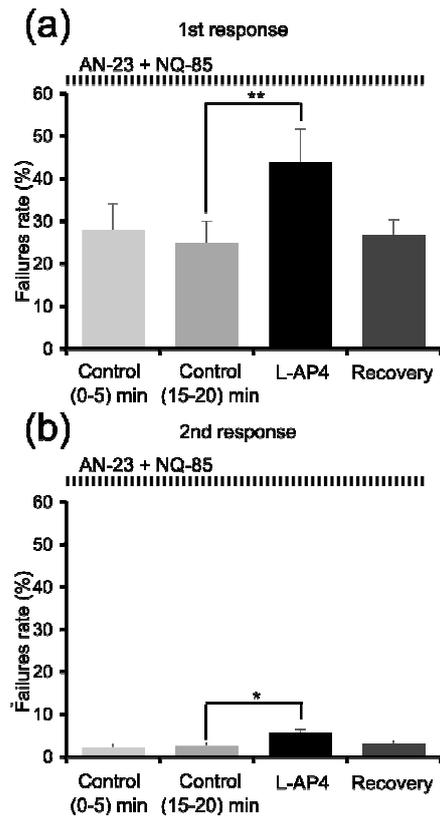
Fig. 8: Effect of L-AP4 on spontaneous glutamate release involves interactions between cytoplasmic mGluR4 domains and protein partners of the release machinery. (a) Summary graph illustrating the effect of 100 μ M L-AP4 on mEPSCs frequency (left) and on normalized mean mEPSC amplitude (right) before and during treatment of the slice with 2,5 μ M TAT- AN-23 and 2,5 μ M TAT- NQ-25 peptides, as a function of time (n=6). Note that these peptides prevent the L-AP4-mediated depressant effect on mEPSC frequency. (b) Same as in (a) with slices treated with 2,5 μ M TAT- scrambled AN-23 and 2,5 μ M TAT- scrambled NQ-25 peptides (n=4). Note that these TAT- scrambled peptides do not prevent the L-AP4-mediated depressant effect on mEPSC frequency. (c) Plot of normalized amplitudes of eEPSCs as a function of time before, during and after bath application of 100 μ M L-AP4 with slice treated with 2,5 μ M TAT- AN-23 and 2,5 μ M TAT- NQ-25 peptides (n=7). Sample traces recorded at the indicated times are shown in the inset. (d) Same as in (c) for normalized amplitudes of peak Fluo-4FF fluorescence presynaptic transient ($\Delta F/F$) evoked by 5 PF stimulations (n=3). Sample traces recorded at the indicated times are shown in the inset. Note that TAT- AN-23 and TAT- NQ-25 peptides, or TAT- scrambled AN-23 and TAT- scrambled NQ-25 peptides alone progressively and significantly decreased mEPSC frequency during the first 20 minutes of slice incubation (shaded rectangle), demonstrating the penetration efficiency of TAT-proteins into the presynaptic terminals. (* P<0.05).



Supplementary Fig. 1: Effects of L-AP4 on mEPSCs with amplitude inferior to 100 pA (small event) and with amplitudes superior to 100 pA (large event). Histogram of mean small events amplitude (right) and large events amplitude (left) before, during and after bath application of 100 μ M L-AP4.



Supplementary Fig. 2: Effects of L-AP4 on spontaneous glutamate release in slices incubated with TAT-peptide. Histogram of mEPSC frequency (left) and normalized mean mEPSC amplitude (right) before, during and after bath application of 100 μ M L-AP4 in slices treated with 5 μ M TAT-peptides (n=4). Note that in these conditions L-AP4 reversibly reduces the frequency of mEPSC. (* $P < 0.05$).



Supplementary Fig. 3: L-AP4 induced significant variations of failure rate in slices treated with TAT-AN-23 and TAT- NQ-25. (a) Histogram of failure rates of synaptic transmission for the first eEPSC of the paired stimulations, before, during and after 100 μ M L-AP4 application (n=7). (b) Same as in (a) for failure rate of synaptic transmission for the second eEPSC of the paired stimulations (n=7). (** P<0.01, * P<0.05).

Discussion et Perspectives

I – Importance du développement de nouveaux outils pharmacologiques sélectifs pour les récepteurs mGluR₄

Le manque d'outils pharmacologiques sélectifs pour les récepteurs mGluR₄ représente à l'heure actuelle une limite majeure à leur étude fonctionnelle au sein des diverses structures du système nerveux central. En effet, bien que ces récepteurs soient les seuls membres du groupe III présents et fonctionnels sur les « boutons synaptiques » des fibres parallèles, au sein du cortex cérébelleux, ce n'est pas le cas dans les autres structures du système nerveux dans lesquelles ils cohabitent avec les récepteurs mGluR₇ et/ou mGluR₈ (les récepteurs mGluR₆ n'étant présents qu'au niveau de la rétine) (Bradley *et al.*, 1996 ; Shigemoto *et al.*, 1997 ; Jones *et al.*, 2008). En effet, les récepteurs mGluR₇ ont, au sein du système nerveux central, la distribution la plus vaste parmi l'ensemble des mGluRs du groupe III (Ferraguti & Shigemoto, 2006). Ils sont donc fréquemment retrouvés au sein des mêmes structures que les récepteurs mGluR₄, notamment au sein du striatum et de l'hippocampe (Ferraguti & Shigemoto, 2006). De ce fait, le cortex cérébelleux constitue un modèle de choix pour l'étude de nouveaux outils pharmacologiques potentiellement sélectifs des récepteurs mGluR₄.

La forte homologie de séquence du domaine N-terminal des différents mGluRs du groupe III (Parmentier *et al.*, 2000 ; Acher & Bertrand, 2005), siège du site de fixation du ligand endogène, le glutamate, et de l'ensemble des agonistes orthostériques de ces récepteurs, représente l'obstacle principal à l'élaboration d'outils pharmacologiques orthostériques (agonistes et antagonistes) sélectifs des différents sous-types de mGluRs (Flor & Acher, 2012).

Les résultats obtenus avec le LSP1-2111 (Selvam *et al.*, en révision) et le LSP4-2022 (Goudet *et al.*, 2012) auxquels nous avons participé, montrent qu'il existe sur la partie N-terminale des récepteurs mGluR₄ (à proximité du site de fixation du glutamate) une région spécifique à chaque sous-type de mGluR du groupe III (Acher *et al.*, 2011). Il s'agit d'une poche délimitée par trois boucles peptidiques dont l'une d'elles possède une séquence d'acides aminés variant selon le sous-type de mGluR du groupe III. Dans le cas des récepteurs mGluR₇ et mGluR₈, la configuration spatiale de cette boucle spécifique semble obstruer de manière plus ou moins complète l'accès à cette cavité. Ceci expliquerait la forte affinité des récepteurs mGluR₄ (comparé à celle des récepteurs mGluR₇ et mGluR₈) pour le LSP1-2111 et le LSP4-2022, ces deux composés exploitant ce site spécifique pour leur fixation. La découverte d'un tel site, offre donc une multitude de possibilités quand au développement de nouveaux outils pharmacologiques sélectifs pour les récepteurs mGluR₄, dont le LSP1-2111 et le LSP4-2022 semblent être les premiers représentants.

Par ailleurs, les agonistes des mGluRs du groupe III possèdent un potentiel thérapeutique non négligeable. En effet, de nombreuses études présentent les différents mGluRs du groupe III comme des cibles thérapeutiques prometteuses pour diverses neuropathologies. Ainsi, l'activation des récepteurs mGluR₈ semble avoir des effets

anxiolytiques (Linden *et al.*, 2002 ; Duvoisin *et al.*, 2010), tandis que l'activation des récepteurs mGluR₇ faciliterait entre autre l'extinction des comportements de peur conditionnée, et diminuerait le pouvoir addictif de certaines drogues (telles que la cocaïne ou l'éthanol) (Fendt *et al.*, 2008 ; Li *et al.*, 2009 ; Bahi *et al.*, 2012). L'activation des récepteurs mGluR₄ est, quant à elle, associée à un effet anxiolytique (Stachowicz *et al.*, 2004). Ces récepteurs sont également connus pour leur effet bénéfique dans le traitement des douleurs neuropathiques (Wang *et al.*, 2011). Enfin, de nombreuses études montrent que les récepteurs mGluR₄ sont des cibles thérapeutiques prometteuses dans le traitement de certaines pathologies neurodégénératives associées à un phénomène d'excitotoxicité. L'activation de ces récepteurs réduit notamment la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire (Battaglia *et al.*, 2006), et améliore considérablement les déficits moteurs associés à la maladie de Parkinson (Beurrier *et al.*, 2009 ; Goudet *et al.*, 2012 ; Amalric *et al.*, 2013).

Bien qu'il existe des outils pharmacologiques sélectifs pour activer les récepteurs mGluR₄, qu'il s'agisse d'agonistes allostériques tels que le PHCCC ou orthostériques comme le LSP4-2022 et le LSP1-2111, nous ne disposons malheureusement pas à ce jour d'antagonistes sélectifs pour ces récepteurs.

L'obtention d'antagonistes sélectifs des récepteurs mGluR₄ sera un prérequis indispensable pour la détermination de leurs conditions d'activation dans des situations physiologiques, à l'aide d'un protocole utilisant des trains de stimulation de fréquence variable des afférences présynaptiques où ils sont présents. Dans un environnement complexe où les différents mGluRs du groupe III peuvent agir sur des types cellulaires distincts au sein d'un même réseau (Shigemoto *et al.*, 1997), il est en effet indispensable de disposer d'outils sélectifs afin d'isoler la contribution spécifique des récepteurs mGluR₄ de celle de l'ensemble des autres mGluRs du groupe III.

II – Les récepteurs mGluR₄ du cortex cérébelleux : des mécanismes de transduction non canoniques au sein des boutons synaptiques des fibres parallèles

Les récepteurs mGluR₄ ont été initialement décrits dans la littérature comme couplés négativement à la voie de l'adénylate cyclase via une protéine G $\alpha_{i/o}$ sensible à la toxine pertussique, ceci dans divers systèmes *in vitro* (Thomsen *et al.*, 1992 ; Tanabe *et al.*, 1993 ; Chavis *et al.*, 1994 ; Neil *et al.*, 1996). Cependant, les résultats des travaux que nous avons menés au sein de l'équipe montrent que les récepteurs mGluR₄ situés sur les boutons synaptiques des fibres parallèles inhibent les canaux calciques voltage dépendants par une voie Gq/PLC-dépendante, et non une voie G $\alpha_{i/o}$ /PKA - dépendante, ce qui a déjà été observé pour un autre mGluR du groupe III, les récepteurs mGluR₇ (Perroy *et al.*, 2000). Ces résultats, obtenus sur des récepteurs natifs, soulignent ainsi les limites d'études à l'aide de modèles *in vitro*. Les différences observées pourraient notamment s'expliquer par un couplage non spécifique des récepteurs mGluR₄, lié à leur surexpression dans un environnement protéique différent de celui dans lequel les récepteurs natifs se trouvent.

Il existe des techniques basées sur l'utilisation de bio-senseurs (Ting *et al.*, 2001) qui pourraient nous permettre de mesurer l'impact de l'activation pharmacologique des récepteurs mGluR₄ sur la production d'AMPC (à l'aide du senseur epac1-camps) et/ou l'activité de la PKA (à l'aide du senseur AKAR2) (Castro *et al.*, 2010 ; Hu *et al.*, 2011). Ces bio-senseurs, dont les séquences oligonucléotidiques peuvent être incorporées au matériel génétique des cellules dans des préparations *ex vivo* après infection virale (Castro *et al.*, 2010 ; Hu *et al.*, 2011), sont composés de deux protéines fluorescentes (la protéine CFP émettant un signal fluorescent d'une longueur d'onde autour de 480 nm, et la YFP émettant un signal fluorescent d'une longueur d'onde d'environ 535 nm), reliées entre elles par une chaîne polypeptidique dont la conformation spatiale est modifiée suite à la fixation d'AMPC (en ce qui concerne l'epac1-camps) ou après phosphorylation par la PKA (pour l'AKAR2). Lorsque ces bio-senseurs sont sous forme libre, les deux protéines sont spatialement proches, ce qui permet à la YFP, excitée par le signal émis par la CFP, d'émettre un relativement fort signal fluorescent d'une longueur d'onde de 535 nm. La fixation d'AMPC et/ou la phosphorylation par la PKA de ces senseurs se traduit par l'éloignement de ces deux protéines fluorescentes, se traduisant alors par une baisse du signal de fluorescence à 535 nm. Dans le cas de l'étude des mécanismes de transduction dans des neurones natifs, nous nous attendons donc à ce que cette fluorescence ne soit pas modifiée après activation pharmacologique des récepteurs mGluR₄, ce qui apporterait des arguments supplémentaires démontrant l'absence d'implication d'une voie G_{i/o}/PKA-dépendante dans ces conditions.

Dans le même ordre d'idée, aucune implication des MAP Kinases Erk_{1/2} ni de la PI₃Kinase n'a été observée pour les récepteurs mGluR₄ natifs à la synapse fibre parallèle – cellule de Purkinje, contrairement à ce qui a été décrit dans la littérature, dans des cultures de cellules granulaires du cortex cérébelleux (Iacovelli *et al.*, 2002).

Par ailleurs, nos résultats obtenus à la synapse fibre parallèle – cellule de Purkinje montrent que l'inhibition des canaux calciques voltage-dépendants implique l'activation de la protéine kinase C (PKC). Cependant, la cascade de signalisation mise en jeu par la PKC menant à l'inhibition de ces canaux est, pour l'heure, toujours inconnue.

Une hypothèse à tester expérimentalement serait que la protéine SNAP-25, largement impliquée dans les processus d'exocytose, pourrait faire partie de cette cascade de signalisation impliquant la PKC. En effet, cette protéine faisant partie intégrante du réceptosome des récepteurs mGluR₄ (Ramos *et al.*, 2012), est en plus de son rôle connu dans les mécanismes d'exocytose, également capable d'interagir avec certains canaux calciques voltage-dépendants, notamment les canaux de type N et P/Q (Jarvis & Zamponi, 2005). Ces interactions SNAP-25-canaux peuvent se traduire par leur inhibition (Verderio *et al.*, 2004). Il a été montré sur des préparations *ex vivo* d'hippocampe de souris, que l'effet inhibiteur de SNAP-25 sur les canaux calciques voltage-dépendants requiert sa phosphorylation, au niveau de la sérine 187, par une PKC située dans les terminaisons présynaptiques (Pozzi *et al.*, 2008). L'hypothèse que les récepteurs mGluR₄ dépriment les transitoires calciques

présynaptiques au sein des « boutons synaptiques » des fibres parallèles, via augmentation de la proportion de SNAP-25 phosphorylées par la mise en jeu d'une voie $G\alpha_q$ /PLC/PKC (Figure 29) devra donc être testée.

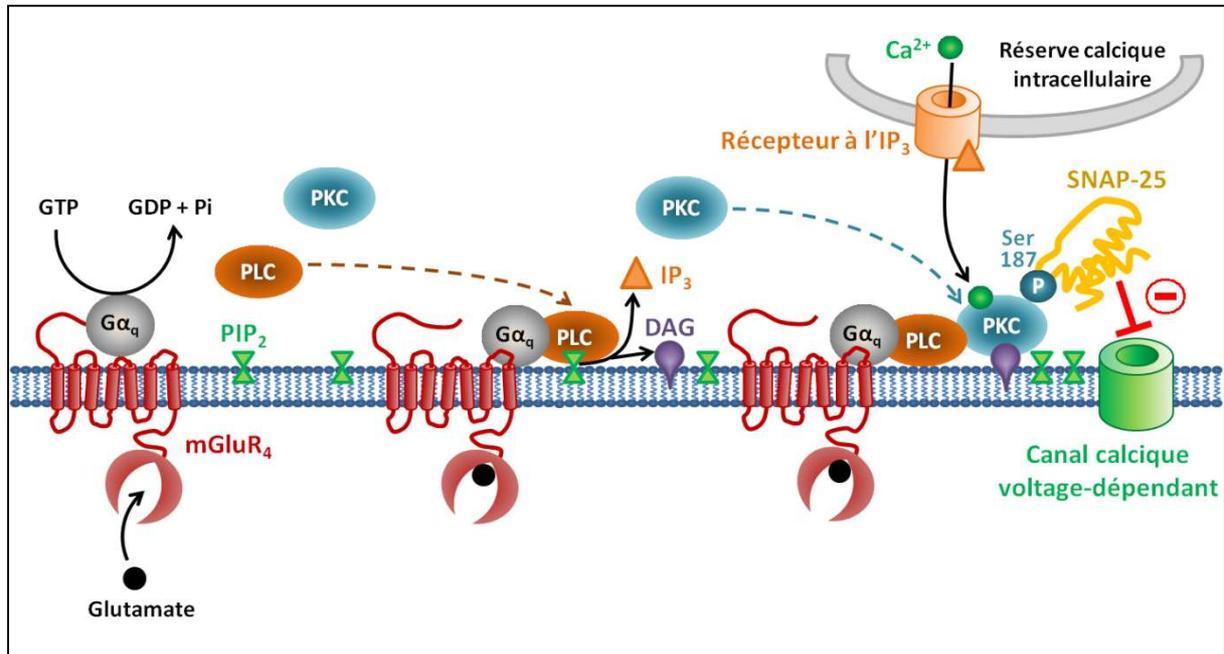


Fig 29. Cascade de signalisation hypothétique menant à l'inhibition des canaux calciques voltage-dépendants présynaptiques par les récepteurs mGluR₄.

A l'aide de la technique de fluorométrie calcique que j'ai utilisé au cours de ma thèse pour mesurer les influx calciques présynaptiques, il serait possible de vérifier cette hypothèse, par l'utilisation de souris dont le gène codant pour la protéine SNAP-25 a été invalidé (SNAP-25 KO) (Washbourne *et al.*, 2002). En effet, si la régulation négative de l'activité des canaux calciques voltage-dépendants par les récepteurs mGluR₄ requiert la phosphorylation de SNAP-25 par la PKC, nous nous attendons chez les souris SNAP-25 KO à une absence d'effet dépressant de l'amplitude des transitoires calciques présynaptiques, suite à l'activation des récepteurs mGluR₄ par le L-AP4.

Par ailleurs, l'activation de la PLC entraîne la production de diacylglycérol (DAG) et d'inositol triphosphate (IP₃) à partir du clivage d'un lipide membranaire : le phosphatidylinositol biphosphate (PIP₂). L'IP₃ ainsi libéré peut alors se fixer sur des récepteurs membranaires des réserves calciques intracellulaires, entraînant de ce fait la libération de calcium dans le cytosol à partir de ces réserves, menant entre autres à l'activation de la PKC (également DAG-dépendante). Le PIP₂ pourrait de plus avoir un effet plus direct sur les canaux calciques voltage-dépendants. Il a en effet été décrit que l'hydrolyse de ces lipides membranaires, par action de la PLC, a notamment pour conséquence l'inhibition des canaux calciques voltage-dépendants de type N et P/Q, cet effet étant indépendant de la production de DAG et d'IP₃ (Wu *et al.*, 2002). Il n'est donc pas

impossible que cet effet puisse également concourir à l'inhibition des influx calciques présynaptiques, consécutivement à l'activation des mGluR₄.

III – Implications fonctionnelles des interactions entre mGluR₄ et ses divers partenaires protéiques

En parallèle des voies de signalisation décrites ci-dessus, menant à la diminution de la libération de glutamate au moins en partie par l'inhibition des canaux calciques voltage-dépendants, j'ai pu montrer au cours de mon travail de thèse que les récepteurs mGluR₄ semblent également agir plus directement sur les phénomènes d'exocytose, ceci sans doute par le biais d'interactions directes ou indirectes avec diverses protéines impliquées dans ces processus d'exocytose.

Ainsi, nos résultats montrent que bien que l'inhibition des canaux calciques voltage-dépendants joue un rôle majeur dans l'action inhibitrice des récepteurs mGluR₄, leur activation pharmacologique implique également des phénomènes complémentaires sans doute moins dépendants du calcium, effets déjà suggérés pour les récepteurs mGluR₈ (Erdmann et al., 2012), que nous avons pu démasquer par l'étude des mEPSCs. En effet, nos résultats montrent que l'activation pharmacologique des récepteurs mGluR₄ diminue de façon réversible la fréquence de ces mEPSCs sans altérer leur amplitude, effet aboli lorsque l'on empêche ces récepteurs d'interagir avec leurs partenaires protéiques putatifs impliqués dans les processus d'exocytose.

Par ailleurs, une étude menée par Yoshiaki Nakajima et collaborateurs montre, sur des neurones du ganglion cervical supérieur en culture, que les interactions entre les récepteurs mGluR₄ et la protéine Munc18-1 semblent pouvoir réduire la probabilité de libération de neurotransmetteur. Ceci se traduit par une diminution de l'amplitude des EPSCs évoqués et par une augmentation du PPR (Paired-Pulse Ratio, c'est-à-dire le rapport entre l'amplitude des réponses obtenues lors d'un protocole utilisant deux stimulations rapprochées dans le temps), indépendamment de toute activation de ces récepteurs (Nakajima *et al.*, 2009). Cette hypothèse est également supportée par le fait que chez les souris dont le gène codant pour les récepteurs mGluR₄ a été invalidé, une altération du phénomène de PPF est observé (Pekhletski *et al.*, 1996). Ainsi, les récepteurs mGluR₄, en plus de leur rôle inhibiteur sur la libération de neurotransmetteur, permettraient également de maintenir dans les conditions basales une relativement faible probabilité de libération de neurotransmetteur au sein des synapses dans lesquelles ces récepteurs sont exprimés, condition requise pour l'expression de la forme de plasticité à court terme qu'est la PPF.

Pour l'heure, nous ne connaissons pas la position exacte de chacun de ces partenaires protéiques putatifs que nous avons mis en évidence (Ramos *et al.*, 2012) dans les cascades de signalisation mises en jeu lors de l'activation des récepteurs mGluR₄. Il existe des techniques qui pourraient permettre d'évaluer la proximité fonctionnelle entre les récepteurs mGluR₄ et les protéines spatialement très proches : les techniques de BRET

(Bioluminescence Resonance Energy Transfer), FRET (Förster/Fluorescence Resonance Energy Transfer), ou de PLA (Proximity Ligation Assay).

La technique de FRET repose sur l'utilisation d'un fluorophore appelé « donneur », fusionné à la première protéine et dont le rôle est d'émettre un faisceau lumineux d'une longueur d'onde donnée, capable d'exciter le fluorophore dit « accepteur » fusionné à la seconde protéine d'intérêt. Dans le cas où les fluorophores donneur et accepteur sont séparés d'une distance inférieure à 10 nanomètres, le fluorophore accepteur, excité par le donneur, émet alors un faisceau lumineux d'une longueur d'onde différente de celle du faisceau d'excitation. La technique de BRET ne diffère du FRET que par la substitution du fluorophore donneur par une enzyme, la luciférase, qui émet un faisceau d'excitation en présence de son substrat (Xu *et al.*, 1999).

La technique de PLA, quant à elle, repose sur l'utilisation de deux séquences d'ADN complémentaires, chacune d'entre elles étant couplée à un anticorps spécifique de l'un ou l'autre des partenaires protéiques d'intérêt (Fredriksson *et al.*, 2002). Lorsque les protéines sont suffisamment proches (c'est-à-dire lorsque les deux anticorps sont séparés par une distance inférieure à 40 nanomètres), ces deux séquences oligonucléotidiques s'hybrident et sont alors amplifiées grâce à l'intervention de ligases. Des sondes fluorescentes capables de se lier à ces séquences sont alors ajoutées, et permettent ainsi de révéler les potentielles interactions entre les deux protéines d'intérêt.

Il faut cependant noter que, bien qu'ayant une meilleure résolution spatiale, les techniques de FRET ou de BRET sont actuellement utilisées essentiellement sur des systèmes *in vitro*, de par le recours nécessaire à la transgénèse afin de fusionner les fluorophores et/ou la luciférase aux protéines d'intérêt. En revanche, la technique de PLA est utilisable dans certaines conditions sur des systèmes *ex vivo* (Trifilieff *et al.*, 2011). Pour cela, les anticorps doivent avoir accès au compartiment dans lequel sont situées les protéines d'intérêt, les épitopes respectifs pour ces anticorps devant être positionnés de façon à ne pas empêcher les éventuelles interactions entre ces protéines par gêne stérique.

Au sein du laboratoire, nous avons retenu cette technique de PLA pour, dans un avenir proche, étudier les interactions entre les récepteurs mGluR₄ et leurs divers partenaires protéiques, en nous focalisant tout d'abord sur deux partenaires principaux, à savoir la protéine Gq et Munc18-1, premièrement dans des cellules HEK293 transfectées avec les gènes codant pour ces différentes protéines, puis si possible au sein de préparations *ex vivo* (tranches de cervelet). D'autre part, nous pourrions également à l'aide de cette technique, étudier l'influence de l'activation pharmacologique des récepteurs mGluR₄ sur les interactions mGluR₄/Gq et mGluR₄/Munc18-1, et déterminer les sites de fixation de ces deux protéines sur ces récepteurs par l'utilisation de différentes versions mutées de mGluR₄ (transfectées dans des cellules HEK293).

IV – L'exocytose : importance des lipides membranaires et influence potentielle des récepteurs mGluR₄

L'exocytose certes implique de nombreux partenaires protéiques, mais les lipides membranaires semblent également jouer un rôle important dans ces processus (Figure 30). Ainsi, le cholestérol semble notamment impliqué dans la délimitation des sites d'exocytose au sein des zones actives (Ammar *et al.*, 2013).

Il a été montré que la production d'acides phosphatidiques par la Phospholipase D1 est requise lors des processus d'exocytose évoquée (Humeau *et al.*, 2001 ; Zeniou-Meyer *et al.*, 2007). Cette enzyme participerait notamment à la formation et l'expansion du pore de fusion (Zeniou-Meyer *et al.*, 2007), car son activation s'accompagne d'un enrichissement en acides phosphatidiques du feuillet interne (cytosolique) de la membrane plasmique. De par leur structure assimilable à un cône, ces lipides seraient capables d'introduire une courbure membranaire induisant le rapprochement de la membrane plasmique avec la membrane vésiculaire (Zeniou-Meyer *et al.*, 2007).

Toutefois, le rôle de ces lipides ne semble pas se limiter au seul aspect structurel. Le Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP₃) est, par exemple, impliqué dans le recrutement de la Syntaxine 1A au niveau des sites de libération vésiculaire (Khuong *et al.*, 2013). La Syntaxine 1A permet à son tour la formation d'agrégats de PIP₂, qui agiraient comme un signal de recrutement des vésicules à la membrane plasmique (Honigmann *et al.*, 2013 ; Ammar *et al.*, 2013). A l'inverse, une diminution de la concentration en PIP₂ à la membrane plasmique pourrait causer un moindre recrutement de vésicules à la membrane responsable d'une diminution de l'activité d'exocytose.

En outre, le PIP₂ est également capable de se fixer sur la synaptotagmine, augmentant alors l'affinité de cette protéine pour les ions calcium (Radhakrishnan *et al.*, 2009), ce qui de ce fait, faciliterait les processus de fusion membranaire.

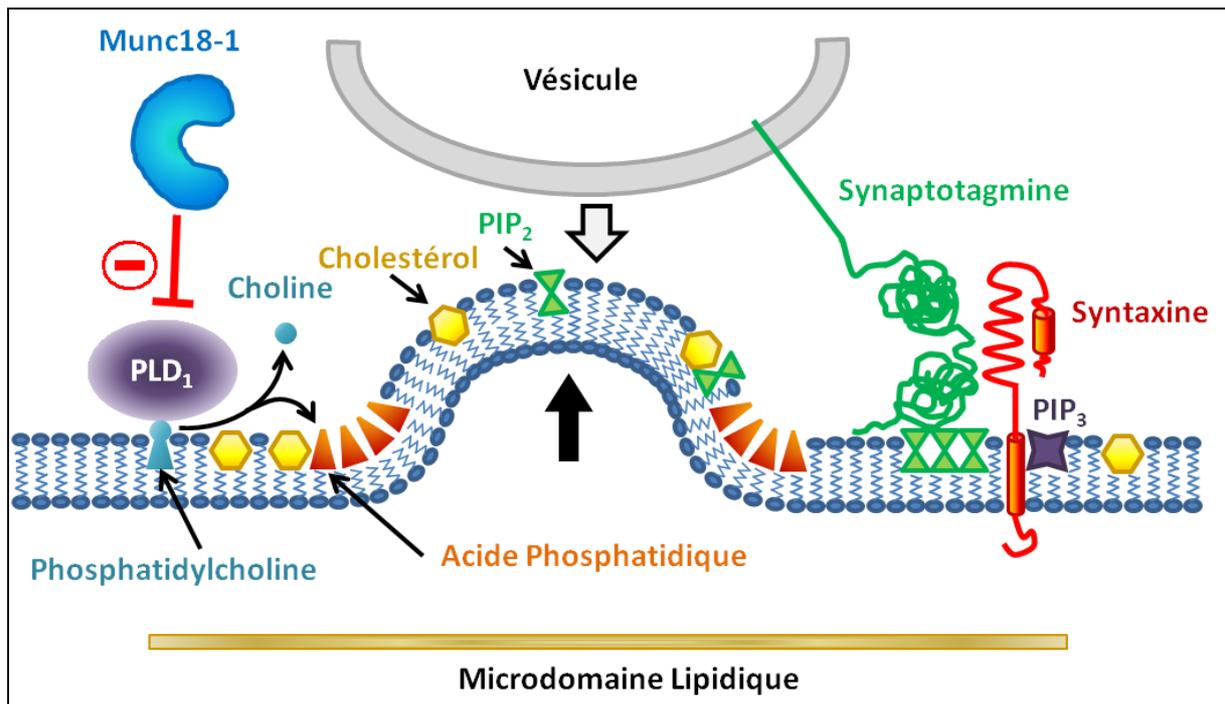


Fig 30. Influence des lipides dans les processus d'exocytose.

Ainsi, une hypothèse que l'on peut avancer est que la baisse de la quantité de PIP₂ membranaire disponible, consécutivement à son hydrolyse PLC-dépendante, après activation des récepteurs mGluR₄, pourrait pour une part au moins participer à la réduction de libération vésiculaire de neurotransmetteur.

Enfin, de manière intéressante, il a été montré que la protéine Munc18-1 est capable d'interagir avec la Phospholipase D1, la formation du complexe Munc18-1/Phospholipase D1 ayant un effet inhibiteur sur l'activité de cette Phospholipase (Lee *et al.*, 2004). Or la protéine Munc18-1 est également connue pour interagir de façon calcium-dépendante avec les récepteurs mGluR₄ (Nakajima *et al.*, 2009). Nous pouvons donc nous demander quel impact ont ces récepteurs sur l'activité de la Phospholipase D1, ces deux protéines ayant des effets antagonistes. En effet, si la production d'acide phosphatidique par la Phospholipase D1 semble avoir un effet facilitateur sur les processus d'exocytose évoquée, l'activation des récepteurs mGluR₄ est, quant à elle, inhibitrice sur ces processus d'exocytose. On peut ainsi faire l'hypothèse que les récepteurs mGluR₄ pourraient séquestrer ces Phospholipases indirectement, par l'intermédiaire de Munc18-1, ce qui aurait pour conséquence de rendre l'activation de ces enzymes et la production d'acide phosphatidique plus difficile (Figure 31).

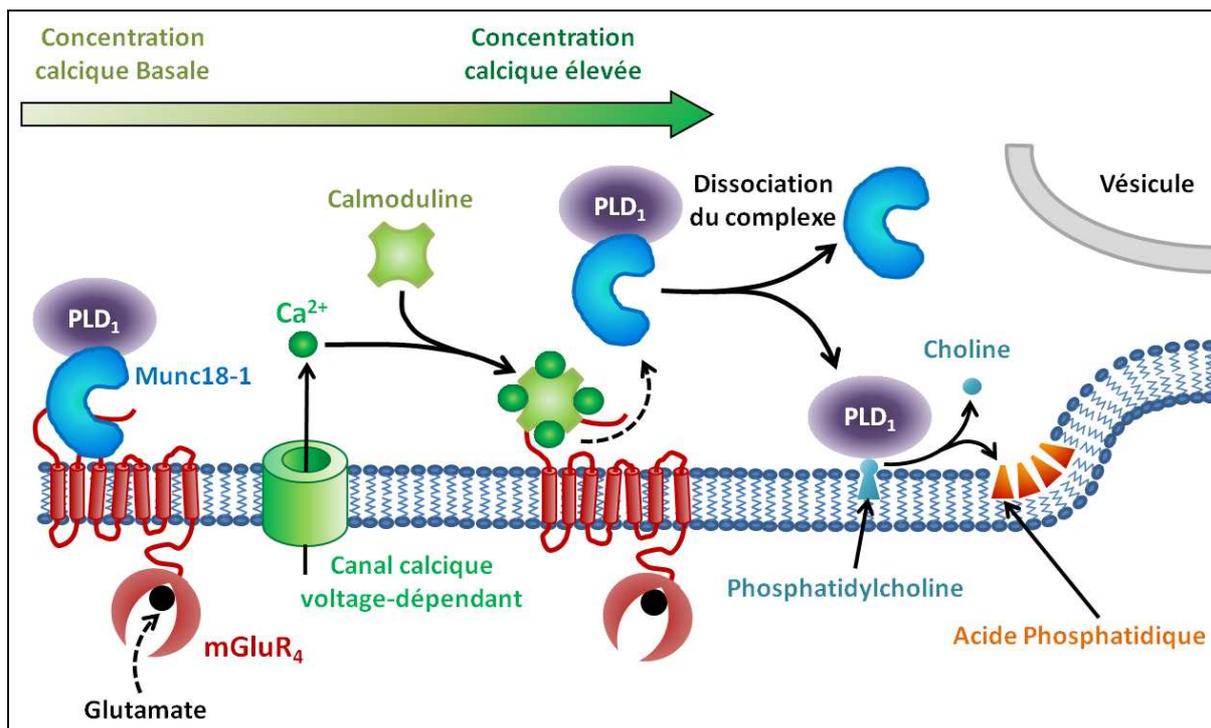


Fig 31. Représentation schématique de la dynamique de l'interaction hypothétique entre les récepteurs mGluR₄ et la Phospholipase D1.

V – Le rôle des récepteurs mGluR₄ dans le réseau neuronal du cortex cérébelleux

Les récepteurs mGluR₄ présents sur les boutons synaptiques des fibres parallèles au sein du cortex cérébelleux, régulent l'activité des cellules de Purkinje à la fois de façon négative en déprimant directement la libération vésiculaire de glutamate à la synapse fibre parallèle - cellule de Purkinje, et de façon positive en réduisant indirectement l'activité inhibitrice des interneurons avoisinants. De par ces effets diamétralement opposés, on peut légitimement se demander quelles sont les conditions d'activation des récepteurs mGluR₄ présents aux synapses fibre parallèles – cellules de Purkinje et celles des récepteurs présents aux synapses fibres parallèles – interneurons de la couche moléculaire.

Les interneurons de la couche moléculaire sont afférentés par un nombre réduit de fibres parallèles par rapport aux cellules de Purkinje : seules environ 10% des fibres parallèles contactent ces interneurons, même si ceux-ci sont à peu près dix fois plus nombreux que les cellules de Purkinje (Korbo *et al.*, 1993). Il faut également noter que 40% des interneurons de la couche moléculaire forment des synapses inhibitrices GABAergiques avec d'autres interneurons (Briatore *et al.*, 2010). La réduction de l'activité des interneurons inhibiteurs GABAergiques par le biais de l'activation des récepteurs mGluR₄ entrainerait ainsi une levée d'inhibition partielle de l'activité des cellules de Purkinje. Toutefois, l'afférentation par les fibres parallèles des cellules de Purkinje étant largement plus forte que l'afférentation des interneurons par ces mêmes fibres, l'effet dépressant des récepteurs mGluR₄ sur l'activité des cellules de Purkinje resterait prédominant. Dans ces conditions, l'activation des récepteurs mGluR₄ favoriserait alors l'inhibition des cellules de

Purkinje au détriment de leur excitation, tout en réduisant l'activité globale du réseau neuronal cérébelleux.

Néanmoins, l'origine du glutamate extracellulaire excédentaire permettant l'activation de ces récepteurs est, à ce jour, inconnue. Celui-ci pourrait provenir des boutons synaptiques mêmes des fibres parallèles (Lorez et al., 2003), et/ou de la diffusion de glutamate à partir de synapses avoisinantes. Il a notamment été montré que le glutamate diffusant hors des synapses fibres grimpantes – cellules de Purkinje est capable de générer des réponses excitatrices dans les interneurons proches (Szapiro & Barbour, 2007), et pourrait donc également participer à l'activation des récepteurs mGluR₄, si celui-ci est associé à une activité des fibres parallèles relativement élevée. Ceci permettrait ainsi une activation beaucoup plus localisée des récepteurs mGluR₄, restreinte aux seules microzones fonctionnelles associées aux fibres grimpantes suractivées, et donc un contrôle plus fin de l'activité du réseau neuronal cérébelleux.

VI – Conclusion générale

Les récepteurs métabotropiques du glutamate sont des éléments importants de la régulation de l'activité synaptique, et représentent des cibles thérapeutiques prometteuses dans le traitement de nombreuses pathologies. Du fait de la complexité de leur environnement, les récepteurs mGluR₄ natifs sont difficiles à étudier dans la plupart des structures du système nerveux central. Le développement d'outils pharmacologiques sélectifs et efficaces pour ces récepteurs et leur validation effective offre ainsi de nouvelles perspectives quant à l'étude de leurs rôles physiologiques et de leurs mécanismes d'action au sein de ces structures, ainsi que pour l'élaboration de nouveaux traitements pharmacologiques.

Dans un tel contexte, le cortex cérébelleux constitue une exception, les récepteurs mGluR₄ étant les seuls mGluRs du groupe III présents en fonctionnels au sein des « boutons synaptiques » des fibres parallèles, ce qui fait de cette structure un « terrain de jeu » exceptionnel pour valider les nouveaux outils pharmacologiques sélectifs de mGluR₄.

Les travaux présentés dans cette thèse montrent que l'activation des récepteurs mGluR₄, au sein des « boutons synaptiques » des fibres parallèles, semble mettre en jeu au moins deux types de mécanismes complémentaires : des mécanismes impliquant l'inhibition des canaux calciques voltage-dépendant présynaptiques par une voie Gα_q/PLC/PKC-dépendante, et des mécanismes sans doute moins dépendants des variations de calcium présynaptique, via des interactions directes ou indirectes avec nombre de protéines présynaptiques notamment impliquées dans les processus d'exocytose.

Bibliographie

- Abe, T., Sugihara, H., Nawa, H., Shigemoto, R., Mizuno, N., and Nakanishi, S. (1992). Molecular characterization of a novel metabotropic glutamate receptor mGluR5 coupled to inositol phosphate/Ca²⁺ signal transduction. *J. Biol. Chem.* *267*, 13361–13368.
- Abitbol, K., Acher, F., and Daniel, H. (2008). Depression of excitatory transmission at PF-PC synapse by group III metabotropic glutamate receptors is provided exclusively by mGluR4 in the rodent cerebellar cortex. *J. Neurochem.* *105*, 2069–2079.
- Abitbol, K., McLean, H., **Bessiron, T.**, and Daniel, H. (2012). A new signalling pathway for parallel fibre presynaptic type 4 metabotropic glutamate receptors (mGluR4) in the rat cerebellar cortex. *J. Physiol. (Lond.)* *590*, 2977–2994.
- Acher, F.C., and Bertrand, H.-O. (2005). Amino acid recognition by Venus flytrap domains is encoded in an 8-residue motif. *Biopolymers* *80*, 357–366.
- Acher, F.C., Selvam, C., Pin, J.-P., Goudet, C., and Bertrand, H.-O. (2011). A critical pocket close to the glutamate binding site of mGlu receptors opens new possibilities for agonist design. *Neuropharmacology* *60*, 102–107.
- Aiba, A., Chen, C., Herrup, K., Rosenmund, C., Stevens, C.F., and Tonegawa, S. (1994). Reduced hippocampal long-term potentiation and context-specific deficit in associative learning in mGluR1 mutant mice. *Cell* *79*, 365–375.
- Amalric, M., Lopez, S., Goudet, C., Fisone, G., Battaglia, G., Nicoletti, F., Pin, J.-P., and Acher, F.C. (2013). Group III and subtype 4 metabotropic glutamate receptor agonists: discovery and pathophysiological applications in Parkinson's disease. *Neuropharmacology* *66*, 53–64.
- Ammar, M.R., Kassas, N., Chasserot-Golaz, S., Bader, M.-F., and Vitale, N. (2013). Lipids in Regulated Exocytosis: What are They Doing? *Front Endocrinol (Lausanne)* *4*, 125.
- Antflick, J.E., and Hampson, D.R. (2012). Modulation of glutamate release from parallel fibers by mGlu4 and pre-synaptic GABA(A) receptors. *J. Neurochem.* *120*, 552–563.
- Anwyl, R. (1999). Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain Res. Brain Res. Rev.* *29*, 83–120.
- Aramori, I., and Nakanishi, S. (1992). Signal transduction and pharmacological characteristics of a metabotropic glutamate receptor, mGluR1, in transfected CHO cells. *Neuron* *8*, 757–765.
- Atlas, D. (2001). Functional and physical coupling of voltage-sensitive calcium channels with exocytotic proteins: ramifications for the secretion mechanism. *J. Neurochem.* *77*, 972–985.
- Atluri, P.P., and Regehr, W.G. (1996). Determinants of the time course of facilitation at the granule cell to Purkinje cell synapse. *J. Neurosci.* *16*, 5661–5671.
- Atluri, P.P., and Regehr, W.G. (1998). Delayed release of neurotransmitter from cerebellar granule cells. *J. Neurosci.* *18*, 8214–8227.
- Augustine, G.J., Santamaria, F., and Tanaka, K. (2003). Local calcium signaling in neurons. *Neuron* *40*, 331–346.

Bahi, A., Fizia, K., Dietz, M., Gasparini, F., and Flor, P.J. (2012). Pharmacological modulation of mGluR7 with AMN082 and MMP-1P exerts specific influences on alcohol consumption and preference in rats. *Addict Biol* 17, 235–247.

Barbour, B., Keller, B.U., Llano, I., and Marty, A. (1994). Prolonged presence of glutamate during excitatory synaptic transmission to cerebellar Purkinje cells. *Neuron* 12, 1331–1343.

Barclay, J.W. (2008). Munc-18-1 regulates the initial release rate of exocytosis. *Biophys. J.* 94, 1084–1093.

Barmack, N.H., and Yakhnitsa, V. (2008). Functions of interneurons in mouse cerebellum. *J. Neurosci.* 28, 1140–1152.

Batchelor, A.M., and Garthwaite, J. (1993). Novel synaptic potentials in cerebellar Purkinje cells: probable mediation by metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology* 32, 11–20.

Batchelor, A.M., and Garthwaite, J. (1997). Frequency detection and temporally dispersed synaptic signal association through a metabotropic glutamate receptor pathway. *Nature* 385, 74–77.

Batchelor, A.M., Madge, D.J., and Garthwaite, J. (1994). Synaptic activation of metabotropic glutamate receptors in the parallel fibre-Purkinje cell pathway in rat cerebellar slices. *Neuroscience* 63, 911–915.

Battaglia, G., Busceti, C.L., Molinaro, G., Biagioni, F., Traficante, A., Nicoletti, F., and Bruno, V. (2006). Pharmacological activation of mGlu4 metabotropic glutamate receptors reduces nigrostriatal degeneration in mice treated with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J. Neurosci.* 26, 7222–7229.

Berthele, A., Platzer, S., Laurie, D.J., Weis, S., Sommer, B., Zieglgänsberger, W., Conrad, B., and Tölle, T.R. (1999). Expression of metabotropic glutamate receptor subtype mRNA (mGluR1-8) in human cerebellum. *Neuroreport* 10, 3861–3867.

Bessiron T., McLean H., and Daniel H. mGluR4 depresses both evoked and spontaneous synaptic transmission at the parallel fibre – molecular layer interneuron synapse the rat cerebellar cortex (manuscrit en preparation).

Beurrier, C., Lopez, S., Révy, D., Selvam, C., Goudet, C., Lhérondel, M., Gubellini, P., Kerkerian-LeGoff, L., Acher, F., Pin, J.-P., and Amalric, M. (2009). Electrophysiological and behavioral evidence that modulation of metabotropic glutamate receptor 4 with a new agonist reverses experimental parkinsonism. *FASEB J.* 23, 3619–3628.

Binet, V., Duthey, B., Lecaillon, J., Vol, C., Quoyer, J., Labesse, G., Pin, J.-P., and Prézeau, L. (2007). Common Structural Requirements for Heptahelical Domain Function in Class A and Class C G Protein-coupled Receptors. *J. Biol. Chem.* 282, 12154–12163.

Bischofberger, J., Geiger, J.R.P., and Jonas, P. (2002). Timing and Efficacy of Ca²⁺ Channel Activation in Hippocampal Mossy Fiber Boutons. *J. Neurosci.* 22, 10593–10602.

- Bradley, S.R., Levey, A.I., Hersch, S.M., and Conn, P.J. (1996). Immunocytochemical localization of group III metabotropic glutamate receptors in the hippocampus with subtype-specific antibodies. *J. Neurosci.* *16*, 2044–2056.
- Briatore, F., Patrizi, A., Viltono, L., Sassoè-Pognetto, M., and Wulff, P. (2010). Quantitative organization of GABAergic synapses in the molecular layer of the mouse cerebellar cortex. *PLoS ONE* *5*, e12119.
- Brose, N. (2008). For Better or for Worse: Complexins Regulate SNARE Function and Vesicle Fusion. *Traffic* *9*, 1403–1413.
- Brust, T.B., Cayabyab, F.S., Zhou, N., and MacVicar, B.A. (2006). p38 mitogen-activated protein kinase contributes to adenosine A1 receptor-mediated synaptic depression in area CA1 of the rat hippocampus. *J. Neurosci.* *26*, 12427–12438.
- Burkhardt, P., Hattendorf, D.A., Weis, W.I., and Fasshauer, D. (2008). Munc18a controls SNARE assembly through its interaction with the syntaxin N-peptide. *EMBO J.* *27*, 923–933.
- Cain, S.M., Meadows, H.J., Dunlop, J., and Bushell, T.J. (2008). mGlu4 potentiation of K(2P)2.1 is dependant on C-terminal dephosphorylation. *Mol. Cell. Neurosci.* *37*, 32–39.
- Campbell, N.C., and Hesslow, G. (1986). The secondary spikes of climbing fibre responses recorded from Purkinje cell somata in cat cerebellum. *J. Physiol. (Lond.)* *377*, 207–224.
- Carter, A.G., and Regehr, W.G. (2000). Prolonged synaptic currents and glutamate spillover at the parallel fiber to stellate cell synapse. *J. Neurosci.* *20*, 4423–4434.
- Carter, A.G., and Regehr, W.G. (2002). Quantal events shape cerebellar interneuron firing. *Nat. Neurosci.* *5*, 1309–1318.
- Cartmell, J., and Schoepp, D.D. (2000). Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. *J. Neurochem.* *75*, 889–907.
- Castejón, O.J., and Caraballo, A.J. (1980). Light and scanning electron microscopic study of cerebellar cortex of teleost fishes. *Cell Tissue Res.* *207*, 211–226.
- Castro, L.R.V., Gervasi, N., Guiot, E., Cavellini, L., Nikolaev, V.O., Paupardin-Tritsch, D., and Vincent, P. (2010). Type 4 Phosphodiesterase Plays Different Integrating Roles in Different Cellular Domains in Pyramidal Cortical Neurons. *J. Neurosci.* *30*, 6143–6151.
- Catterall, W.A., and Few, A.P. (2008). Calcium channel regulation and presynaptic plasticity. *Neuron* *59*, 882–901.
- Caulfield, M.P., and Brown, D.A. (1992). Cannabinoid receptor agonists inhibit Ca current in NG108-15 neuroblastoma cells via a pertussis toxin-sensitive mechanism. *Br. J. Pharmacol.* *106*, 231–232.
- Chavis, P., Shinozaki, H., Bockaert, J., and Fagni, L. (1994). The metabotropic glutamate receptor types 2/3 inhibit L-type calcium channels via a pertussis toxin-sensitive G-protein in cultured cerebellar granule cells. *J. Neurosci.* *14*, 7067–7076.

- Chen, S.H.A., and Desmond, J.E. (2005). Temporal dynamics of cerebro-cerebellar network recruitment during a cognitive task. *Neuropsychologia* 43, 1227–1237.
- Chiechio, S., and Nicoletti, F. (2012). Metabotropic glutamate receptors and the control of chronic pain. *Curr Opin Pharmacol* 12, 28–34.
- Chung, C., and Raino, J. (2013). Vesicle dynamics: how synaptic proteins regulate different modes of neurotransmission. *J. Neurochem.*
- Clark, B.A., and Cull-Candy, S.G. (2002). Activity-dependent recruitment of extrasynaptic NMDA receptor activation at an AMPA receptor-only synapse. *J. Neurosci.* 22, 4428–4436.
- Clower, D.M., West, R.A., Lynch, J.C., and Strick, P.L. (2001). The Inferior Parietal Lobule Is the Target of Output from the Superior Colliculus, Hippocampus, and Cerebellum. *J. Neurosci.* 21, 6283–6291.
- Cohen, D., and Yarom, Y. (2000). Cerebellar on-beam and lateral inhibition: two functionally distinct circuits. *J. Neurophysiol.* 83, 1932–1940.
- Collin, T., Franconville, R., Ehrlich, B.E., and Llano, I. (2009). Activation of metabotropic glutamate receptors induces periodic burst firing and concomitant cytosolic Ca²⁺ oscillations in cerebellar interneurons. *J. Neurosci.* 29, 9281–9291.
- Conquet, F., Bashir, Z.I., Davies, C.H., Daniel, H., Ferraguti, F., Bordi, F., Franz-Bacon, K., Reggiani, A., Matarese, V., and Condé, F. (1994). Motor deficit and impairment of synaptic plasticity in mice lacking mGluR1. *Nature* 372, 237–243.
- Console, S., Marty, C., García-Echeverría, C., Schwendener, R., and Ballmer-Hofer, K. (2003). Antennapedia and HIV transactivator of transcription (TAT) “protein transduction domains” promote endocytosis of high molecular weight cargo upon binding to cell surface glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* 278, 35109–35114.
- Cooper, R.L., Winslow, J.L., Govind, C.K., and Atwood, H.L. (1996). Synaptic structural complexity as a factor enhancing probability of calcium-mediated transmitter release. *J. Neurophysiol.* 75, 2451–2466.
- Corti, C., Aldegheri, L., Somogyi, P., and Ferraguti, F. (2002). Distribution and synaptic localisation of the metabotropic glutamate receptor 4 (mGluR4) in the rodent CNS. *Neuroscience* 110, 403–420.
- Cosgrove, K.E., Meriney, S.D., and Barrionuevo, G. (2011). High affinity group III mGluRs regulate mossy fiber input to CA3 interneurons. *Hippocampus* 21, 1302–1317.
- Crepel, F. (2007). Developmental changes in retrograde messengers involved in depolarization-induced suppression of excitation at parallel fiber-Purkinje cell synapses in rodents. *J. Neurophysiol.* 97, 824–836.
- Crepel, F., and Daniel, H. (2007). Developmental changes in agonist-induced retrograde signaling at parallel fiber-Purkinje cell synapses: role of calcium-induced calcium release. *J. Neurophysiol.* 98, 2550–2565.

- Crepel, F., Mariani, J., and Delhay-Bouchaud, N. (1976). Evidence for a multiple innervation of Purkinje cells by climbing fibers in the immature rat cerebellum. *J. Neurobiol.* 7, 567–578.
- Crépel, F., Galante, M., Habbas, S., McLean, H., and Daniel, H. (2011). Role of the vesicular transporter VGLUT3 in retrograde release of glutamate by cerebellar Purkinje cells. *J. Neurophysiol.* 105, 1023–1032.
- Crowley, J.J., Carter, A.G., and Regehr, W.G. (2007). Fast vesicle replenishment and rapid recovery from desensitization at a single synaptic release site. *J. Neurosci.* 27, 5448–5460.
- D’Angelo, E., Solinas, S., Mapelli, J., Gandolfi, D., Mapelli, L., and Prestori, F. (2013). The cerebellar Golgi cell and spatiotemporal organization of granular layer activity. *Front Neural Circuits* 7, 93.
- Dale, N., and Kandel, E.R. (1990). Facilitatory and inhibitory transmitters modulate spontaneous transmitter release at cultured *Aplysia* sensorimotor synapses. *J. Physiol. (Lond.)* 421, 203–222.
- Daniel, H., and Crepel, F. (2001). Control of Ca²⁺ influx by cannabinoid and metabotropic glutamate receptors in rat cerebellar cortex requires K⁺ channels. *J. Physiol. (Lond.)* 537, 793–800.
- Daniel, H., Rancillac, A., and Crepel, F. (2004). Mechanisms underlying cannabinoid inhibition of presynaptic Ca²⁺ influx at parallel fibre synapses of the rat cerebellum. *J. Physiol. (Lond.)* 557, 159–174.
- Delaney, A.J., and Jahr, C.E. (2002). Kainate Receptors Differentially Regulate Release at Two Parallel Fiber Synapses. *Neuron* 36, 475–482.
- DeSanty, K.P., and Dar, M.S. (2001). Involvement of the cerebellar adenosine A₁ receptor in cannabinoid-induced motor incoordination in the acute and tolerant state in mice. *Brain Res.* 905, 178–187.
- Dietrich, D., Beck, H., Kral, T., Clusmann, H., Elger, C.E., and Schramm, J. (1997). Metabotropic glutamate receptors modulate synaptic transmission in the perforant path: pharmacology and localization of two distinct receptors. *Brain Res.* 767, 220–227.
- Dieudonné, S., and Dumoulin, A. (2000). Serotonin-driven long-range inhibitory connections in the cerebellar cortex. *J. Neurosci.* 20, 1837–1848.
- Dittman, J.S., and Regehr, W.G. (1996). Contributions of calcium-dependent and calcium-independent mechanisms to presynaptic inhibition at a cerebellar synapse. *J. Neurosci.* 16, 1623–1633.
- Dittman, J.S., and Regehr, W.G. (1997). Mechanism and kinetics of heterosynaptic depression at a cerebellar synapse. *J. Neurosci.* 17, 9048–9059.
- Doi, A., Ishibashi, H., Jinno, S., Kosaka, T., and Akaike, N. (2002). Presynaptic inhibition of GABAergic miniature currents by metabotropic glutamate receptor in the rat CNS. *Neuroscience* 109, 299–311.
- Duvoisin, R.M., Pfankuch, T., Wilson, J.M., Grabell, J., Chhajlani, V., Brown, D.G., Johnson, E., and Raber, J. (2010). Acute pharmacological modulation of mGluR8 reduces measures of anxiety. *Behav. Brain Res.* 212, 168–173.

- Dzubay, J.A., and Otis, T.S. (2002). Climbing Fiber Activation of Metabotropic Glutamate Receptors on Cerebellar Purkinje Neurons. *Neuron* 36, 1159–1167.
- Eggermann, E., Bucurenciu, I., Goswami, S.P., and Jonas, P. (2012). Nanodomain coupling between Ca^{2+} channels and sensors of exocytosis at fast mammalian synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 7–21.
- El Far, O., Airas, J., Wischmeyer, E., Nehring, R.B., Karschin, A., and Betz, H. (2000). Interaction of the C-terminal tail region of the metabotropic glutamate receptor 7 with the protein kinase C substrate PICK1. *European Journal of Neuroscience* 12, 4215–4221.
- El Far, O., Bofill-Cardona, E., Airas, J.M., O'Connor, V., Boehm, S., Freissmuth, M., Nanoff, C., and Betz, H. (2001). Mapping of calmodulin and Gbetagamma binding domains within the C-terminal region of the metabotropic glutamate receptor 7A. *J. Biol. Chem.* 276, 30662–30669.
- Endo, T., and Isa, T. (2001). Functionally different AMPA-type glutamate receptors in morphologically identified neurons in rat superficial superior colliculus. *Neuroscience* 108, 129–141.
- Enz, R. (2002). The actin-binding protein Filamin-A interacts with the metabotropic glutamate receptor type 7. *FEBS Lett.* 514, 184–188.
- Enz, R. (2007). The trick of the tail: protein-protein interactions of metabotropic glutamate receptors. *Bioessays* 29, 60–73.
- Erdmann, E., Rupprecht, V., Matthews, E., Kukley, M., Schoch, S., and Dietrich, D. (2012). Depression of release by mGluR8 alters Ca^{2+} dependence of release machinery. *Cereb. Cortex* 22, 1498–1509.
- Ermolyuk, Y.S., Alder, F.G., Surges, R., Pavlov, I.Y., Timofeeva, Y., Kullmann, D.M., and Volynski, K.E. (2013). Differential triggering of spontaneous glutamate release by P/Q-, N- and R-type Ca^{2+} channels. *Nat Neurosci* 16, 1754–1763.
- Fasshauer, D., Sutton, R.B., Brunger, A.T., and Jahn, R. (1998). Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *PNAS* 95, 15781–15786.
- Fasshauer, D., Antonin, W., Subramaniam, V., and Jahn, R. (2002). SNARE assembly and disassembly exhibit a pronounced hysteresis. *Nat. Struct. Biol.* 9, 144–151.
- Fatt, P., and Katz, B. (1952). Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J. Physiol. (Lond.)* 117, 109–128.
- Fendt, M., Schmid, S., Thakker, D.R., Jacobson, L.H., Yamamoto, R., Mitsukawa, K., Maier, R., Natt, F., Hüsken, D., Kelly, P.H., McAllister, K.H., Hoyer, D., Van Der Putten, H., Cryan, J.F., and Flor, P.J. (2008). mGluR7 facilitates extinction of aversive memories and controls amygdala plasticity. *Mol. Psychiatry* 13, 970–979.
- Ferraguti, F., and Shigemoto, R. (2006). Metabotropic glutamate receptors. *Cell Tissue Res.* 326, 483–504.
- Flor, P.J., and Acher, F.C. (2012). Orthosteric versus allosteric GPCR activation: The great challenge of group-III mGluRs. *Biochemical Pharmacology* 84, 414–424.

- Foster, K.A., Crowley, J.J., and Regehr, W.G. (2005). The influence of multivesicular release and postsynaptic receptor saturation on transmission at granule cell to Purkinje cell synapses. *J. Neurosci.* *25*, 11655–11665.
- Fredriksson, S., Gullberg, M., Jarvius, J., Olsson, C., Pietras, K., Gústafsdóttir, S.M., Ostman, A., and Landegren, U. (2002). Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays. *Nat. Biotechnol.* *20*, 473–477.
- Galante, M., and Diana, M.A. (2004). Group I metabotropic glutamate receptors inhibit GABA release at interneuron-Purkinje cell synapses through endocannabinoid production. *J. Neurosci.* *24*, 4865–4874.
- Gao, W.Q., and Hatten, M.E. (1994). Immortalizing oncogenes subvert the establishment of granule cell identity in developing cerebellum. *Development* *120*, 1059–1070.
- Geppert, M., Goda, Y., Hammer, R.E., Li, C., Rosahl, T.W., Stevens, C.F., and Südhof, T.C. (1994). Synaptotagmin I: a major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell* *79*, 717–727.
- Glitsch, M., Llano, I., and Marty, A. (1996). Glutamate as a candidate retrograde messenger at interneurone-Purkinje cell synapses of rat cerebellum. *J. Physiol. (Lond.)* *497 (Pt 2)*, 531–537.
- Goodman, R.R., and Synder, S.H. (1982). Autoradiographic localization of adenosine receptors in rat brain using [3H]cyclohexyladenosine. *J. Neurosci.* *2*, 1230–1241.
- Goudet, C., Gaven, F., Kniazeff, J., Vol, C., Liu, J., Cohen-Gonsaud, M., Acher, F., Prezeau, L., and Pin, J.P. (2003). Heptahelical domain of metabotropic glutamate receptor 5 behaves like rhodopsin-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *101*, 378–383.
- Goudet, C., Vilar, B., Courtiol, T., Deltheil, T., **Bessiron, T.**, Brabet, I., Oueslati, N., Rigault, D., Bertrand, H.-O., McLean, H., Daniel, H., Amalric, M., Acher, F., and Pin, J.P. (2012). A novel selective metabotropic glutamate receptor 4 agonist reveals new possibilities for developing subtype selective ligands with therapeutic potential. *FASEB J.* *26*, 1682–1693.
- Groffen, A.J., Martens, S., Díez Arazola, R., Cornelisse, L.N., Lozovaya, N., de Jong, A.P.H., Goriounova, N.A., Habets, R.L.P., Takai, Y., Borst, J.G., Brose, N., McMahon, H.T., and Verhage, M. (2010). Doc2b is a high-affinity Ca²⁺ sensor for spontaneous neurotransmitter release. *Science* *327*, 1614–1618.
- Hallonet, M.E., Teillet, M.A., and Douarin, N.M.L. (1990). A new approach to the development of the cerebellum provided by the quail-chick marker system. *Development* *108*, 19–31.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* *391*, 85–100.
- Hampson, D.R., Huang, X.P., Pekhletski, R., Peltekova, V., Hornby, G., Thomsen, C., and Thøgersen, H. (1999). Probing the ligand-binding domain of the mGluR4 subtype of metabotropic glutamate receptor. *J. Biol. Chem.* *274*, 33488–33495.

- Han, G.A., Malintan, N.T., Saw, N.M.N., Li, L., Han, L., Meunier, F.A., Collins, B.M., and Sugita, S. (2011). Munc18-1 domain-1 controls vesicle docking and secretion by interacting with syntaxin-1 and chaperoning it to the plasma membrane. *Mol. Biol. Cell* 22, 4134–4149.
- Hansel, C., and Linden, D.J. (2000). Long-Term Depression of the Cerebellar Climbing Fiber–Purkinje Neuron Synapse. *Neuron* 26, 473–482.
- Harris, J., Moreno, S., Shaw, G., and Mugnaini, E. (1993). Unusual neurofilament composition in cerebellar unipolar brush neurons. *J. Neurocytol.* 22, 1039–1059.
- Hartmann, J., Henning, H.A., and Konnerth, A. (2011). mGluR1/TRPC3-mediated Synaptic Transmission and Calcium Signaling in Mammalian Central Neurons. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.
- Hashimoto, K., and Kano, M. (1998). Presynaptic origin of paired-pulse depression at climbing fibre–Purkinje cell synapses in the rat cerebellum. *The Journal of Physiology* 506, 391–405.
- Heitz, F., Morris, M.C., and Divita, G. (2009). Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Br. J. Pharmacol.* 157, 195–206.
- Herkenham, M., Lynn, A.B., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R., and Rice, K.C. (1991). Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J. Neurosci.* 11, 563–583.
- Hirbec, H., Perestenko, O., Nishimune, A., Meyer, G., Nakanishi, S., Henley, J.M., and Dev, K.K. (2002). The PDZ proteins PICK1, GRIP, and syntenin bind multiple glutamate receptor subtypes. Analysis of PDZ binding motifs. *J. Biol. Chem.* 277, 15221–15224.
- Honigsmann, A., van den Bogaart, G., Iraheta, E., Risselada, H.J., Milovanovic, D., Mueller, V., Müller, S., Diederichsen, U., Fasshauer, D., Grubmüller, H., Hell, S.W., Eggeling, C., Kühnel, K., and Jahn, R. (2013). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate clusters act as molecular beacons for vesicle recruitment. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 679–686.
- Houamed, K.M., Kuijper, J.L., Gilbert, T.L., Haldeman, B.A., O’Hara, P.J., Mulvihill, E.R., Almers, W., and Hagen, F.S. (1991). Cloning, expression, and gene structure of a G protein-coupled glutamate receptor from rat brain. *Science* 252, 1318–1321.
- Hu, E., Demmou, L., Cauli, B., Gallopin, T., Geoffroy, H., Harris-Warrick, R.M., Paupardin-Tritsch, D., Lambolez, B., Vincent, P., and Hepp, R. (2011). VIP, CRF, and PACAP act at distinct receptors to elicit different cAMP/PKA dynamics in the neocortex. *Cereb. Cortex* 21, 708–718.
- Humeau, Y., Vitale, N., Chasserot-Golaz, S., Dupont, J.L., Du, G., Frohman, M.A., Bader, M.F., and Poulain, B. (2001). A role for phospholipase D1 in neurotransmitter release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 15300–15305.
- Iacovelli, L., Bruno, V., Salvatore, L., Melchiorri, D., Gradini, R., Caricasole, A., Barletta, E., De Blasi, A., and Nicoletti, F. (2002). Native group-III metabotropic glutamate receptors are coupled to the mitogen-activated protein kinase/phosphatidylinositol-3-kinase pathways. *J. Neurochem.* 82, 216–223.

- Iacovelli, L., Capobianco, L., Iula, M., Di Giorgi Gerevini, V., Picascia, A., Blahos, J., Melchiorri, D., Nicoletti, F., and De Blasi, A. (2004). Regulation of mGlu4 metabotropic glutamate receptor signaling by type-2 G-protein coupled receptor kinase (GRK2). *Mol. Pharmacol.* *65*, 1103–1110.
- Ide, J.S., and Li, C.R. (2011). A cerebellar thalamic cortical circuit for error-related cognitive control. *Neuroimage* *54*, 455–464.
- Isaac, J.T.R., Ashby, M.C., and McBain, C.J. (2007). The Role of the GluR2 Subunit in AMPA Receptor Function and Synaptic Plasticity. *Neuron* *54*, 859–871.
- Isope, P., and Barbour, B. (2002). Properties of unitary granule cell - Purkinje cell synapses in adult rat cerebellar slices. *J. Neurosci.* *22*, 9668–9678.
- Isope, P., Hildebrand, M.E., and Snutch, T.P. (2012). Contributions of T-type voltage-gated calcium channels to postsynaptic calcium signaling within Purkinje neurons. *Cerebellum* *11*, 651–665.
- Ito, M. (1984). The modifiable neuronal network of the cerebellum. *Jpn. J. Physiol.* *34*, 781–792.
- Ito, M. (2008). Control of mental activities by internal models in the cerebellum. *Nat. Rev. Neurosci.* *9*, 304–313.
- Ito, M. (2013). Error detection and representation in the olivo-cerebellar system. *Front Neural Circuits* *7*, 1.
- Jarvis, S.E., and Zamponi, G.W. (2005). Masters or slaves? Vesicle release machinery and the regulation of presynaptic calcium channels. *Cell Calcium* *37*, 483–488.
- Jeong, H.-J., Jang, I.-S., Nabekura, J., and Akaike, N. (2003). Adenosine A1 receptor-mediated presynaptic inhibition of GABAergic transmission in immature rat hippocampal CA1 neurons. *J. Neurophysiol.* *89*, 1214–1222.
- Johnson, J.W., and Ascher, P. (1987). Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* *325*, 529–531.
- Jones, P.J., Xiang, Z., and Conn, P.J. (2008). Metabotropic glutamate receptors mGluR4 and mGluR8 regulate transmission in the lateral olfactory tract–piriform cortex synapse. *Neuropharmacology* *55*, 440–446.
- Jörntell, H., Bengtsson, F., Schonewille, M., and De Zeeuw, C.I. (2010). Cerebellar molecular layer interneurons – computational properties and roles in learning. *Trends in Neurosciences* *33*, 524–532.
- Kandel, E.R., Schwartz, and Jessell, T.M. (1991). *Principles of neural science* (Elsevier).
- Kano, M., Hashimoto, K., and Tabata, T. (2008). Type-1 metabotropic glutamate receptor in cerebellar Purkinje cells: a key molecule responsible for long-term depression, endocannabinoid signalling and synapse elimination. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* *363*, 2173–2186.
- Karakossian, M.H., and Otis, T.S. (2004). Excitation of cerebellar interneurons by group I metabotropic glutamate receptors. *J. Neurophysiol.* *92*, 1558–1565.

- Katz, B., and Miledi, R. (1963). A study of spontaneous miniature potentials in spinal motoneurons. *J. Physiol. (Lond.)* 168, 389–422.
- Kawamura, Y., Fukaya, M., Maejima, T., Yoshida, T., Miura, E., Watanabe, M., Ohno-Shosaku, T., and Kano, M. (2006). The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum. *J. Neurosci.* 26, 2991–3001.
- Kheradmand, A., and Zee, D.S. (2011). Cerebellum and ocular motor control. *Front Neurol* 2, 53.
- Khuong, T.M., Habets, R.L.P., Kuenen, S., Witkowska, A., Kasprowicz, J., Swerts, J., Jahn, R., van den Bogaart, G., and Verstreken, P. (2013). Synaptic PI(3,4,5)P3 is required for Syntaxin1A clustering and neurotransmitter release. *Neuron* 77, 1097–1108.
- Kim, S.J., Kim, Y.S., Yuan, J.P., Petralia, R.S., Worley, P.F., and Linden, D.J. (2003). Activation of the TRPC1 cation channel by metabotropic glutamate receptor mGluR1. *Nature* 426, 285–291.
- Kitamura, K., and Häusser, M. (2011). Dendritic Calcium Signaling Triggered by Spontaneous and Sensory-Evoked Climbing Fiber Input to Cerebellar Purkinje Cells In Vivo. *J. Neurosci.* 31, 10847–10858.
- Kitazawa, S., and Wolpert, D.M. (2005). Rhythmicity, randomness and synchrony in climbing fiber signals. *Trends in Neurosciences* 28, 611–619.
- Kniazeff, J., Prézeau, L., Rondard, P., Pin, J.-P., and Goudet, C. (2011). Dimers and beyond: The functional puzzles of class C GPCRs. *Pharmacology & Therapeutics* 130, 9–25.
- Knoflach, F., and Kemp, J.A. (1998). Metabotropic glutamate group II receptors activate a G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ current in neurones of the rat cerebellum. *J. Physiol. (Lond.)* 509 (Pt 2), 347–354.
- Kocsis, J.D., Eng, D.L., and Bhisitkul, R.B. (1984). Adenosine selectively blocks parallel-fiber-mediated synaptic potentials in rat cerebellar cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 6531–6534.
- Korbo, L., Andersen, B.B., Ladefoged, O., and Møller, A. (1993). Total numbers of various cell types in rat cerebellar cortex estimated using an unbiased stereological method. *Brain Res.* 609, 262–268.
- Kreitzer, A.C., and Regehr, W.G. (2000). Modulation of transmission during trains at a cerebellar synapse. *J. Neurosci.* 20, 1348–1357.
- Lafon-Cazal, M., Fagni, L., Guiraud, M.J., Mary, S., Lerner-Natoli, M., Pin, J.P., Shigemoto, R., and Bockaert, J. (1999). mGluR7-like metabotropic glutamate receptors inhibit NMDA-mediated excitotoxicity in cultured mouse cerebellar granule neurons. *Eur. J. Neurosci.* 11, 663–672.
- Lainé, J., and 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., and Axelrad, H. (1998). Lugaro cells target basket and stellate cells in the cerebellar cortex. *Neuroreport* 9, 2399–2403.

- Latini, S., and Pedata, F. (2001). Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J. Neurochem.* *79*, 463–484.
- Lee, H.Y., Park, J.B., Jang, I.H., Chae, Y.C., Kim, J.H., Kim, I.S., Suh, P.-G., and Ryu, S.H. (2004). Munc-18-1 inhibits phospholipase D activity by direct interaction in an epidermal growth factor-reversible manner. *J. Biol. Chem.* *279*, 16339–16348.
- Lee, S.-H., Kim, M.-H., Lee, J.-Y., Lee, S.H., Lee, D., Park, K.H., and Ho, W.-K. (2007). Na⁺/Ca²⁺ exchange and Ca²⁺ homeostasis in axon terminals of mammalian central neurons. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1099*, 396–412.
- Lévénès, C., Daniel, H., Soubrié, P., and Crépel, F. (1998). Cannabinoids decrease excitatory synaptic transmission and impair long-term depression in rat cerebellar Purkinje cells. *J. Physiol. (Lond.)* *510* (Pt 3), 867–879.
- Lévénès, C., Daniel, H., and Crépel, F. (2001). Retrograde modulation of transmitter release by postsynaptic subtype 1 metabotropic glutamate receptors in the rat cerebellum. *J. Physiol. (Lond.)* *537*, 125–140.
- Li, X., Li, J., Peng, X.-Q., Spiller, K., Gardner, E.L., and Xi, Z.-X. (2009). Metabotropic glutamate receptor 7 modulates the rewarding effects of cocaine in rats: involvement of a ventral pallidal GABAergic mechanism. *Neuropsychopharmacology* *34*, 1783–1796.
- Lin, K.-H., Erazo-Fischer, E., and Taschenberger, H. (2012). Similar Intracellular Ca²⁺ Requirements for Inactivation and Facilitation of Voltage-Gated Ca²⁺ Channels in a Glutamatergic Mammalian Nerve Terminal. *J. Neurosci.* *32*, 1261–1272.
- Linden, A.-M., Johnson, B.G., Peters, S.C., Shannon, H.E., Tian, M., Wang, Y., Yu, J.L., Köster, A., Baez, M., and Schoepp, D.D. (2002). Increased anxiety-related behavior in mice deficient for metabotropic glutamate 8 (mGlu8) receptor. *Neuropharmacology* *43*, 251–259.
- Llano, I., Marty, A., Armstrong, C.M., and Konnerth, A. (1991). Synaptic- and agonist-induced excitatory currents of Purkinje cells in rat cerebellar slices. *J. Physiol. (Lond.)* *434*, 183–213.
- Llinás, R., and Sugimori, M. (1980). Electrophysiological properties of in vitro Purkinje cell somata in mammalian cerebellar slices. *J. Physiol. (Lond.)* *305*, 171–195.
- Llinás, R., and Welsh, J.P. (1993). On the cerebellum and motor learning. *Curr. Opin. Neurobiol.* *3*, 958–965.
- Lorez, M., Humbel, U., Pflimlin, M.-C., and Kew, J.N.C. (2003). Group III metabotropic glutamate receptors as autoreceptors in the cerebellar cortex. *Br. J. Pharmacol.* *138*, 614–625.
- Lujan, R., Nusser, Z., Roberts, J.D., Shigemoto, R., and Somogyi, P. (1996). Perisynaptic location of metabotropic glutamate receptors mGluR1 and mGluR5 on dendrites and dendritic spines in the rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* *8*, 1488–1500.
- Luján, R., Roberts, J.D., Shigemoto, R., Ohishi, H., and Somogyi, P. (1997). Differential plasma membrane distribution of metabotropic glutamate receptors mGluR1 alpha, mGluR2 and mGluR5, relative to neurotransmitter release sites. *J. Chem. Neuroanat.* *13*, 219–241.

- Ma, C., Su, L., Seven, A.B., Xu, Y., and Rizo, J. (2013). Reconstitution of the vital functions of Munc18 and Munc13 in neurotransmitter release. *Science* 339, 421–425.
- Macek, T.A., Winder, D.G., Gereau, R.W., 4th, Ladd, C.O., and Conn, P.J. (1996). Differential involvement of group II and group III mGluRs as autoreceptors at lateral and medial perforant path synapses. *J. Neurophysiol.* 76, 3798–3806.
- Maejima, T., Hashimoto, K., Yoshida, T., Aiba, A., and Kano, M. (2001). Presynaptic Inhibition Caused by Retrograde Signal from Metabotropic Glutamate to Cannabinoid Receptors. *Neuron* 31, 463–475.
- Mann-Metzer, P., and Yarom, Y. (1999). Electrotonic Coupling Interacts with Intrinsic Properties to Generate Synchronized Activity in Cerebellar Networks of Inhibitory Interneurons. *J. Neurosci.* 19, 3298–3306.
- Marino, M.J., Williams, D.L., Jr, O'Brien, J.A., Valenti, O., McDonald, T.P., Clements, M.K., Wang, R., DiLella, A.G., Hess, J.F., Kinney, G.G., and Conn, P.J. (2003). Allosteric modulation of group III metabotropic glutamate receptor 4: a potential approach to Parkinson's disease treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 13668–13673.
- Martín, R., Durroux, T., Ciruela, F., Torres, M., Pin, J.-P., and Sánchez-Prieto, J. (2010). The metabotropic glutamate receptor mGlu7 activates phospholipase C, translocates munc-13-1 protein, and potentiates glutamate release at cerebrocortical nerve terminals. *J. Biol. Chem.* 285, 17907–17917.
- Masu, M., Tanabe, Y., Tsuchida, K., Shigemoto, R., and Nakanishi, S. (1991). Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. *Nature* 349, 760–765.
- Mateos, J.M., Azkue, J., Sarría, R., Kuhn, R., Grandes, P., and Knöpfel, T. (1998). Localization of the mGlu4a metabotropic glutamate receptor in rat cerebellar cortex. *Histochem. Cell Biol.* 109, 135–139.
- Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C., and Bonner, T.I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346, 561–564.
- Matsui, T., Sekiguchi, M., Hashimoto, A., Tomita, U., Nishikawa, T., and Wada, K. (1995). Functional comparison of D-serine and glycine in rodents: the effect on cloned NMDA receptors and the extracellular concentration. *J. Neurochem.* 65, 454–458.
- Maximov, A., Shin, O.-H., Liu, X., and Südhof, T.C. (2007). Synaptotagmin-12, a synaptic vesicle phosphoprotein that modulates spontaneous neurotransmitter release. *J. Cell Biol.* 176, 113–124.
- Mayer, M.L., and Westbrook, G.L. (1987). Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. *J. Physiol. (Lond.)* 394, 501–527.
- McKay, B.E., and Turner, R.W. (2005). Physiological and morphological development of the rat cerebellar Purkinje cell. *J. Physiol. (Lond.)* 567, 829–850.
- Melik-Musyan, A.B., and Fanardzhyan, V.V. (2004). Morphological characteristics of Lugaro cells in the cerebellar cortex. *Neurosci. Behav. Physiol.* 34, 633–638.

- Middleton, F.A., and Strick, P.L. (1998). Cerebellar output: motor and cognitive channels. *Trends in Cognitive Sciences* 2, 348–354.
- Mintz, I.M., Sabatini, B.L., and Regehr, W.G. (1995). Calcium control of transmitter release at a cerebellar synapse. *Neuron* 15, 675–688.
- Mitoma, H., and Konishi, S. (1999). Monoaminergic long-term facilitation of GABA-mediated inhibitory transmission at cerebellar synapses. *Neuroscience* 88, 871–883.
- Mittmann, W., Koch, U., and Häusser, M. (2005). Feed-forward inhibition shapes the spike output of cerebellar Purkinje cells. *J. Physiol. (Lond.)* 563, 369–378.
- Morishita, W., Kirov, S.A., and Alger, B.E. (1998). Evidence for metabotropic glutamate receptor activation in the induction of depolarization-induced suppression of inhibition in hippocampal CA1. *J. Neurosci.* 18, 4870–4882.
- Moritz, A., Scheschonka, A., Beckhaus, T., Karas, M., and Betz, H. (2009). Metabotropic glutamate receptor 4 interacts with microtubule-associated protein 1B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 390, 82–86.
- Müller, C.S., Haupt, A., Bildl, W., Schindler, J., Knaus, H.-G., Meissner, M., Rammner, B., Striessnig, J., Flockerzi, V., Fakler, B., and Schulte, U. (2010). Quantitative proteomics of the Cav2 channel nano-environments in the mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 14950–14957.
- Munro, S., Thomas, K.L., and Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365, 61–65.
- Muto, T., Tsuchiya, D., Morikawa, K., and Jingami, H. (2007). Structures of the extracellular regions of the group II/III metabotropic glutamate receptors. *PNAS* 104, 3759–3764.
- Nakajima, Y. (2011). Ca²⁺-dependent binding of calcium-binding protein 1 to presynaptic group III metabotropic glutamate receptors and blockage by phosphorylation of the receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 412, 602–605.
- Nakajima, Y., Iwakabe, H., Akazawa, C., Nawa, H., Shigemoto, R., Mizuno, N., and Nakanishi, S. (1993). Molecular characterization of a novel retinal metabotropic glutamate receptor mGluR6 with a high agonist selectivity for L-2-amino-4-phosphonobutyrate. *J. Biol. Chem.* 268, 11868–11873.
- Nakajima, Y., Mochida, S., Okawa, K., and Nakanishi, S. (2009). Ca²⁺-dependent release of Munc18-1 from presynaptic mGluRs in short-term facilitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 18385–18389.
- Napper, R.M., and Harvey, R.J. (1988). Quantitative study of the Purkinje cell dendritic spines in the rat cerebellum. *J. Comp. Neurol.* 274, 158–167.
- Neale, S.A., Garthwaite, J., and Batchelor, A.M. (2001). Metabotropic glutamate receptor subtypes modulating neurotransmission at parallel fibre-Purkinje cell synapses in rat cerebellum. *Neuropharmacology* 41, 42–49.
- Neher, E. (1998). Vesicle Pools and Ca²⁺ Microdomains: New Tools for Understanding Their Roles in Neurotransmitter Release. *Neuron* 20, 389–399.

- Neher, E., and Sakmann, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* *260*, 799–802.
- Neil, K.E., Kendall, D.A., and Alexander, S.P. (1996). Coupling of metabotropic glutamate receptors to phosphoinositide mobilisation and inhibition of cyclic AMP generation in the guinea-pig cerebellum. *Br. J. Pharmacol.* *118*, 311–316.
- Nicoletti, F., Bockaert, J., Collingridge, G.L., Conn, P.J., Ferraguti, F., Schoepp, D.D., Wroblewski, J.T., and Pin, J.P. (2011). Metabotropic glutamate receptors: from the workbench to the bedside. *Neuropharmacology* *60*, 1017–1041.
- O’Hara, P.J., Sheppard, P.O., Thøgersen, H., Venezia, D., Haldeman, B.A., McGrane, V., Houamed, K.M., Thomsen, C., Gilbert, T.L., and Mulvihill, E.R. (1993). The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. *Neuron* *11*, 41–52.
- Ohishi, H., Shigemoto, R., Nakanishi, S., and Mizuno, N. (1993). Distribution of the mRNA for a metabotropic glutamate receptor (mGluR3) in the rat brain: an in situ hybridization study. *J. Comp. Neurol.* *335*, 252–266.
- Oldfield, C.S., Marty, A., and Stell, B.M. (2010). Interneurons of the cerebellar cortex toggle Purkinje cells between up and down states. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 13153–13158.
- Orduz, D., and Llano, I. (2007). Recurrent axon collaterals underlie facilitating synapses between cerebellar Purkinje cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 17831–17836.
- Ozawa, S., and Iino, M. (1993). Two distinct types of AMPA responses in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.* *155*, 187–190.
- Palay, S.L., and Chan-Palay, V. (1974). *Cerebellar cortex: cytology and organization* (Springer).
- Pang, Z.P., and Südhof, T.C. (2010). Cell biology of Ca²⁺-triggered exocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* *22*, 496–505.
- Parisotto, D., Malsam, J., Scheutzow, A., Krause, J.M., and Söllner, T.H. (2012). SNAREpin assembly by Munc18-1 requires previous vesicle docking by synaptotagmin 1. *J. Biol. Chem.* *287*, 31041–31049.
- Parmentier, M.L., Galvez, T., Acher, F., Peyre, B., Pellicciari, R., Grau, Y., Bockaert, J., and Pin, J.P. (2000). Conservation of the ligand recognition site of metabotropic glutamate receptors during evolution. *Neuropharmacology* *39*, 1119–1131.
- Pekhletski, R., Gerlai, R., Overstreet, L.S., Huang, X.P., Agopyan, N., Slater, N.T., Abramow-Newerly, W., Roder, J.C., and Hampson, D.R. (1996). Impaired cerebellar synaptic plasticity and motor performance in mice lacking the mGluR4 subtype of metabotropic glutamate receptor. *J. Neurosci.* *16*, 6364–6373.
- Perroy, J., Prezeau, L., De Waard, M., Shigemoto, R., Bockaert, J., and Fagni, L. (2000). Selective blockade of P/Q-type calcium channels by the metabotropic glutamate receptor type 7 involves a phospholipase C pathway in neurons. *J. Neurosci.* *20*, 7896–7904.

- Petralia, R.S., Wang, Y.X., and Wenthold, R.J. (1994). Histological and ultrastructural localization of the kainate receptor subunits, KA2 and GluR6/7, in the rat nervous system using selective antipeptide antibodies. *J. Comp. Neurol.* *349*, 85–110.
- Petralia, R.S., Wang, Y.X., Niedzielski, A.S., and Wenthold, R.J. (1996). The metabotropic glutamate receptors, mGluR2 and mGluR3, show unique postsynaptic, presynaptic and glial localizations. *Neuroscience* *71*, 949–976.
- Pin, J.P., and Duvoisin, R. (1995). The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* *34*, 1–26.
- Pouzat, C., and Hestrin, S. (1997). Developmental Regulation of Basket/Stellate Cell→Purkinje Cell Synapses in the Cerebellum. *J. Neurosci.* *17*, 9104–9112.
- Pouzat, C., and Marty, A. (1998). Autaptic inhibitory currents recorded from interneurons in rat cerebellar slices. *The Journal of Physiology* *509*, 777–783.
- Pozzi, D., Condliffe, S., Bozzi, Y., Chikhladze, M., Grumelli, C., Proux-Gillardeaux, V., Takahashi, M., Franceschetti, S., Verderio, C., and Matteoli, M. (2008). Activity-dependent phosphorylation of Ser187 is required for SNAP-25-negative modulation of neuronal voltage-gated calcium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 323–328.
- Prather, P.L., Martin, N.A., Breivogel, C.S., and Childers, S.R. (2000). Activation of cannabinoid receptors in rat brain by WIN 55212-2 produces coupling to multiple G protein alpha-subunits with different potencies. *Mol. Pharmacol.* *57*, 1000–1010.
- Priller, J., Persons, D.A., Klett, F.F., Kempermann, G., Kreutzberg, G.W., and Dirnagl, U. (2001). Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo. *J. Cell Biol.* *155*, 733–738.
- Puchkov, D., and Haucke, V. (2013). Greasing the synaptic vesicle cycle by membrane lipids. *Trends Cell Biol.* *23*, 493–503.
- Quetglas, S., Leveque, C., Miquelis, R., Sato, K., and Seagar, M. (2000). Ca²⁺-dependent regulation of synaptic SNARE complex assembly via a calmodulin- and phospholipid-binding domain of synaptobrevin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *97*, 9695–9700.
- Radhakrishnan, A., Stein, A., Jahn, R., and Fasshauer, D. (2009). The Ca²⁺ affinity of synaptotagmin 1 is markedly increased by a specific interaction of its C2B domain with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* *284*, 25749–25760.
- Ramos, C., Chardonnet, S., Marchand, C.H., Decottignies, P., Ango, F., Daniel, H., and Le Maréchal, P. (2012). Native presynaptic metabotropic glutamate receptor 4 (mGluR4) interacts with exocytosis proteins in rat cerebellum. *J. Biol. Chem.* *287*, 20176–20186.
- Rancillac, A., and Barbara, J.G. (2005). Frequency-dependent recruitment of inhibition mediated by stellate cells in the rat cerebellar cortex. *J. Neurosci. Res.* *80*, 414–423.

- Rebola, N., Pinheiro, P.C., Oliveira, C.R., Malva, J.O., and Cunha, R.A. (2003). Subcellular localization of adenosine A(1) receptors in nerve terminals and synapses of the rat hippocampus. *Brain Res.* *987*, 49–58.
- Regehr, W.G., and Atluri, P.P. (1995). Calcium transients in cerebellar granule cell presynaptic terminals. *Biophys. J.* *68*, 2156–2170.
- Regehr, W.G., and Tank, D.W. (1991). Selective fura-2 loading of presynaptic terminals and nerve cell processes by local perfusion in mammalian brain slice. *J. Neurosci. Methods* *37*, 111–119.
- Reim, K., Mansour, M., Varoqueaux, F., McMahon, H.T., Südhof, T.C., Brose, N., and Rosenmund, C. (2001). Complexins regulate a late step in Ca²⁺-dependent neurotransmitter release. *Cell* *104*, 71–81.
- Rettig, J., Sheng, Z.H., Kim, D.K., Hodson, C.D., Snutch, T.P., and Catterall, W.A. (1996). Isoform-specific interaction of the alpha1A subunits of brain Ca²⁺ channels with the presynaptic proteins syntaxin and SNAP-25. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *93*, 7363–7368.
- Rizo, J., and Südhof, T.C. (2002). Snares and munc18 in synaptic vesicle fusion. *Nature Reviews Neuroscience* *3*, 641–653.
- Rizo, J., and Südhof, T.C. (2012). The Membrane Fusion Enigma: SNAREs, Sec1/Munc18 Proteins, and Their Accomplices—Guilty as Charged? *Annual Review of Cell and Developmental Biology* *28*, 279–308.
- Rodkey, T.L., Liu, S., Barry, M., and McNew, J.A. (2008). Munc18a scaffolds SNARE assembly to promote membrane fusion. *Mol. Biol. Cell* *19*, 5422–5434.
- Ruigrok, T.J.H. (2010). Ins and Outs of Cerebellar Modules. *Cerebellum (London, England)* *10*, 464–474.
- Ruigrok, T.J.H., Hensbroek, R.A., and Simpson, J.I. (2011). Spontaneous Activity Signatures of Morphologically Identified Interneurons in the Vestibulocerebellum. *J. Neurosci.* *31*, 712–724.
- Sara, Y., Virmani, T., Deák, F., Liu, X., and Kavalali, E.T. (2005). An isolated pool of vesicles recycles at rest and drives spontaneous neurotransmission. *Neuron* *45*, 563–573.
- Saugstad, J.A., Kinzie, J.M., Shinohara, M.M., Segerson, T.P., and Westbrook, G.L. (1997). Cloning and expression of rat metabotropic glutamate receptor 8 reveals a distinct pharmacological profile. *Mol. Pharmacol.* *51*, 119–125.
- Scanziani, M., Capogna, M., Gähwiler, B.H., and Thompson, S.M. (1992). Presynaptic inhibition of miniature excitatory synaptic currents by baclofen and adenosine in the hippocampus. *Neuron* *9*, 919–927.
- Scanziani, M., Salin, P.A., Vogt, K.E., Malenka, R.C., and Nicoll, R.A. (1997). Use-dependent increases in glutamate concentration activate presynaptic metabotropic glutamate receptors. *Nature* *385*, 630–634.

- Schmahmann, J.D., and Pandya, D.N. (1995). Prefrontal cortex projections to the basilar pons in rhesus monkey: implications for the cerebellar contribution to higher function. *Neuroscience Letters* 199, 175–178.
- Schneggenburger, R., and Neher, E. (2005). Presynaptic calcium and control of vesicle fusion. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 266–274.
- Schoepp, D.D., Jane, D.E., and Monn, J.A. (1999). Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology* 38, 1431–1476.
- Schousboe, A., Frandsen, A., and Drejer, J. (1989). Evidence for evoked release of adenosine and glutamate from cultured cerebellar granule cells. *Neurochem. Res.* 14, 871–875.
- Schwarze, S.R., Ho, A., Vocero-Akbani, A., and Dowdy, S.F. (1999). In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* 285, 1569–1572.
- Seebahn, A., Dinkel, H., Mohrlüder, J., Hartmann, R., Vogel, N., Becker, C.-M., Sticht, H., and Enz, R. (2011). Structural characterization of intracellular C-terminal domains of group III metabotropic glutamate receptors. *FEBS Lett.* 585, 511–516.
- Selvam C., Lemasson I.A., Brabet I., Oueslati N., Rigault D., Courtiol T., Cesarini S., Mony L., **Bessiron T.**, McLean H., Daniel H., Bertrand H.O., Goudet C., Pin J.P., Acher F. A new series of potent group-III metabotropic glutamate receptors agonists (manuscript en révision).
- Sharon, D., Vorobiov, D., and Dascal, N. (1997). Positive and negative coupling of the metabotropic glutamate receptors to a G protein-activated K⁺ channel, GIRK, in *Xenopus* oocytes. *J. Gen. Physiol.* 109, 477–490.
- Sheng, Z.H., Yokoyama, C.T., and Catterall, W.A. (1997). Interaction of the synprint site of N-type Ca²⁺ channels with the C2B domain of synaptotagmin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 5405–5410.
- Shigemoto, R., Kinoshita, A., Wada, E., Nomura, S., Ohishi, H., Takada, M., Flor, P.J., Neki, A., Abe, T., Nakanishi, S., and Mizuno, N. (1997). Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *J. Neurosci.* 17, 7503–7522.
- Sichardt, K., and Nieber, K. (2007). Adenosine A(1) receptor: Functional receptor-receptor interactions in the brain. *Purinergic Signal.* 3, 285–298.
- Simat, M., Parpan, F., and Fritschy, J.-M. (2007). Heterogeneity of glycinergic and gabaergic interneurons in the granule cell layer of mouse cerebellum. *J. Comp. Neurol.* 500, 71–83.
- Slesinger, P.A., Stoffel, M., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (1997). Defective gamma-aminobutyric acid type B receptor-activated inwardly rectifying K⁺ currents in cerebellar granule cells isolated from weaver and *Girk2* null mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 12210–12217.
- De Smet, H.J., Paquier, P., Verhoeven, J., and Mariën, P. The cerebellum: Its role in language and related cognitive and affective functions. *Brain and Language.*
- Smyth, A.M., Duncan, R.R., and Rickman, C. (2010). Munc18-1 and syntaxin1: unraveling the interactions between the dynamic duo. *Cell. Mol. Neurobiol.* 30, 1309–1313.

- Söllner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., and Rothman, J.E. (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362, 318–324.
- Stachowicz, K., Kłak, K., Kłodzińska, A., Chojnacka-Wojcik, E., and Pilc, A. (2004). Anxiolytic-like effects of PHCCC, an allosteric modulator of mGlu4 receptors, in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 498, 153–156.
- Starr, T.V., Prystay, W., and Snutch, T.P. (1991). Primary structure of a calcium channel that is highly expressed in the rat cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 5621–5625.
- Ster, J., de Bock, F., Bertaso, F., Abitbol, K., Daniel, H., Bockaert, J., and Fagni, L. (2009). Epac mediates PACAP-dependent long-term depression in the hippocampus. *J. Physiol. (Lond.)* 587, 101–113.
- Strick, P.L., Dum, R.P., and Fiez, J.A. (2009). Cerebellum and nonmotor function. *Annu. Rev. Neurosci.* 32, 413–434.
- Südhof, T.C. (2004). The synaptic vesicle cycle. *Annu. Rev. Neurosci.* 27, 509–547.
- Südhof, T.C. (2012). Calcium control of neurotransmitter release. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4, a011353.
- Südhof, T.C., and Rothman, J.E. (2009). Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science* 323, 474–477.
- Sutton, R.B., Fasshauer, D., Jahn, R., and Brunger, A.T. (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 395, 347–353.
- Szapiro, G., and Barbour, B. (2007). Multiple climbing fibers signal to molecular layer interneurons exclusively via glutamate spillover. *Nat. Neurosci.* 10, 735–742.
- Takahashi, T., and Momiyama, A. (1993). Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature* 366, 156–158.
- Tanabe, Y., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., and Nakanishi, S. (1992). A family of metabotropic glutamate receptors. *Neuron* 8, 169–179.
- Tanabe, Y., Nomura, A., Masu, M., Shigemoto, R., Mizuno, N., and Nakanishi, S. (1993). Signal transduction, pharmacological properties, and expression patterns of two rat metabotropic glutamate receptors, mGluR3 and mGluR4. *J. Neurosci.* 13, 1372–1378.
- Tang, Z., Far, O.E., Betz, H., and Scheschonka, A. (2005). Pias1 Interaction and Sumoylation of Metabotropic Glutamate Receptor 8. *J. Biol. Chem.* 280, 38153–38159.
- Tank, D.W., Sugimori, M., Connor, J.A., and Llinás, R.R. (1988). Spatially resolved calcium dynamics of mammalian Purkinje cells in cerebellar slice. *Science* 242, 773–777.
- Thach, W.T., Goodkin, H.P., and Keating, J.G. (1992). The cerebellum and the adaptive coordination of movement. *Annu. Rev. Neurosci.* 15, 403–442.

- Thomsen, C., Kristensen, P., Mulvihill, E., Haldeman, B., and Suzdak, P.D. (1992). L-2-amino-4-phosphonobutyrate (L-AP4) is an agonist at the type IV metabotropic glutamate receptor which is negatively coupled to adenylate cyclase. *Eur. J. Pharmacol.* *227*, 361–362.
- Ting, A.Y., Kain, K.H., Klemke, R.L., and Tsien, R.Y. (2001). Genetically encoded fluorescent reporters of protein tyrosine kinase activities in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *98*, 15003–15008.
- Toonen, R.F.G. (2003). Role of Munc18-1 in synaptic vesicle and large dense-core vesicle secretion. *Biochem. Soc. Trans.* *31*, 848–850.
- Trifilieff, P., Rives, M.-L., Urizar, E., Piskorowski, R.A., Vishwasrao, H.D., Castrillon, J., Schmauss, C., Slättman, M., Gullberg, M., and Javitch, J.A. (2011). Detection of antigen interactions ex vivo by proximity ligation assay: endogenous dopamine D2-adenosine A2A receptor complexes in the striatum. *BioTechniques* *51*, 111–118.
- Tsou, K., Brown, S., Sañudo-Peña, M.C., Mackie, K., and Walker, J.M. (1998). Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* *83*, 393–411.
- Tzingounis, A.V., and Wadiche, J.I. (2007). Glutamate transporters: confining runaway excitation by shaping synaptic transmission. *Nat. Rev. Neurosci.* *8*, 935–947.
- Ungar, D., and Hughson, F.M. (2003). SNARE protein structure and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *19*, 493–517.
- Verderio, C., Pozzi, D., Pravettoni, E., Inverardi, F., Schenk, U., Coco, S., Proux-Gillardeaux, V., Galli, T., Rossetto, O., Frassoni, C., and Matteoli, M. (2004). SNAP-25 Modulation of Calcium Dynamics Underlies Differences in GABAergic and Glutamatergic Responsiveness to Depolarization. *Neuron* *41*, 599–610.
- Vincent, P., and Marty, A. (1996). Fluctuations of inhibitory postsynaptic currents in Purkinje cells from rat cerebellar slices. *The Journal of Physiology* *494*, 183.
- Vivès, E., Brodin, P., and Lebleu, B. (1997). A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J. Biol. Chem.* *272*, 16010–16017.
- Voogd, J., and Glickstein, M. (1998). The anatomy of the cerebellum. *Trends Neurosci.* *21*, 370–375.
- Wang, H., Jiang, W., Yang, R., and Li, Y. (2011). Spinal metabotropic glutamate receptor 4 is involved in neuropathic pain. *Neuroreport* *22*, 244–248.
- Washbourne, P., Thompson, P.M., Carta, M., Costa, E.T., Mathews, J.R., Lopez-Bendito, G., Molnár, Z., Becher, M.W., Valenzuela, C.F., Partridge, L.D., and Wilson, M.C. (2002). Genetic ablation of the t-SNARE SNAP-25 distinguishes mechanisms of neuroexocytosis. *Nat Neurosci* *5*, 19–26.
- Weimbs, T., Low, S.H., Chapin, S.J., Mostov, K.E., Bucher, P., and Hofmann, K. (1997). A conserved domain is present in different families of vesicular fusion proteins: A new superfamily. *PNAS* *94*, 3046–3051.

- Wojcik, W.J., and Neff, N.H. (1984). gamma-aminobutyric acid B receptors are negatively coupled to adenylate cyclase in brain, and in the cerebellum these receptors may be associated with granule cells. *Mol. Pharmacol.* 25, 24–28.
- Wu, L., Bauer, C.S., Zhen, X., Xie, C., and Yang, J. (2002). Dual regulation of voltage-gated calcium channels by PtdIns(4,5)P₂. *Nature* 419, 947–952.
- Xu, H.-P., Zhao, J.-W., and Yang, X.-L. (2002). Expression of voltage-dependent calcium channel subunits in the rat retina. *Neurosci. Lett.* 329, 297–300.
- Xu, Y., Piston, D.W., and Johnson, C.H. (1999). A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 151–156.
- Xu, Y., Su, L., and Rizo, J. (2010). Binding of Munc18-1 to synaptobrevin and to the SNARE four-helix bundle. *Biochemistry* 49, 1568–1576.
- Yao, J., Gaffaney, J.D., Kwon, S.E., and Chapman, E.R. (2011). Doc2 is a Ca²⁺ sensor required for asynchronous neurotransmitter release. *Cell* 147, 666–677.
- Zanjani, S.H., Selimi, F., Vogel, M.W., Haeberlé, A.-M., Boeuf, J., Mariani, J., and Bailly, Y.J. (2006). Survival of interneurons and parallel fiber synapses in a cerebellar cortex deprived of Purkinje cells: studies in the double mutant mouse Grid2Lc/+;Bax(-/-). *J. Comp. Neurol.* 497, 622–635.
- Zeniou-Meyer, M., Zabari, N., Ashery, U., Chasserot-Golaz, S., Haeberlé, A.-M., Demais, V., Bailly, Y., Gottfried, I., Nakanishi, H., Neiman, A.M., Du, G., Frohman, M.A., Bader, M.F., and Vitale, N. (2007). Phospholipase D1 production of phosphatidic acid at the plasma membrane promotes exocytosis of large dense-core granules at a late stage. *J. Biol. Chem.* 282, 21746–21757.
- Zhang, C., and Schmidt, J.T. (1998). Adenosine A1 receptors mediate retinotectal presynaptic inhibition: uncoupling by C-kinase and role in LTP during regeneration. *J. Neurophysiol.* 79, 501–510.
- Zhang, L., and Goldman, J.E. (1996). Generation of Cerebellar Interneurons from Dividing Progenitors in White Matter. *Neuron* 16, 47–54.
- Zhang, W., and Linden, D.J. (2009). Neuromodulation at single presynaptic boutons of cerebellar parallel fibers is determined by bouton size and basal action potential-evoked Ca transient amplitude. *J. Neurosci.* 29, 15586–15594.
- Zhong, H., Yokoyama, C.T., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (1999). Reciprocal regulation of P/Q-type Ca²⁺ channels by SNAP-25, syntaxin and synaptotagmin. *Nat. Neurosci.* 2, 939–941.
- Zucker, R.S., and Regehr, W.G. (2002). Short-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Physiol.* 64, 355–405.

Abstract

Glutamate metabotropic receptors (mGluRs) play an important role in the regulation of excitatory neurotransmission. Group III mGluRs, namely mGluR4, 7 and 8, are known to act as autoreceptors, decreasing the vesicular release of glutamate. These G-Protein Coupled Receptors are widely distributed through the brain, and thus are often localised in the same structures, presynaptically, except for mGluR6 only present postsynaptically in the retina. However, mGluR4 are the most highly expressed in the cerebellar cortex, and more precisely in the active zones of the presynaptic terminals of one of the two excitatory afferent inputs, the parallel fibres, where they are the only group III mGluR functional, turning this structure into an ideal model to study these receptors.

In this work, led through electrophysiological (Patch-Clamp) recordings and optical dynamic calcium (fluorometry) measurements, we investigated the mechanisms of action of mGluR4 at both parallel fibre – Purkinje cell synapses and parallel fibre – molecular layer interneuron synapses. We show that activation of mGluR4 inhibits voltage-gated calcium channels by way of a Gq/PLC/PKC-dependent pathway, and that activation of these receptors reduces glutamate release through a complementary mechanism, a more direct interaction with exocytosis proteins.

In addition, we also contributed to the characterization of two new pharmacological tools (orthosteric agonists) selective for mGluR4, which lack constitutes a major limit to the study of these receptors throughout the brain.

Key words: *cerebellum, parallel fibres, molecular layer interneurons, Purkinje cells, glutamate, mGluR4, agonists, signalling pathways, calcium, exocytosis.*

Résumé

Les récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluRs) jouent un rôle important dans la régulation de la neurotransmission excitatrice. Les mGluRs du groupe III (mGluR4, 7 et 8), sont connus pour agir en tant qu'autorécepteurs, diminuant la libération vésiculaire de glutamate. Ces récepteurs couplés aux protéines G ont une vaste distribution cérébrale, et sont ainsi souvent retrouvés au sein des mêmes structures, au niveau présynaptique, (excepté les mGluR6 uniquement présents au niveau postsynaptique dans la rétine). mGluR4 est très fortement exprimé dans le cortex cérébelleux, et plus précisément au sein des zones actives des terminaisons présynaptiques de l'une des deux afférences excitatrices, les fibres parallèles, où ils représentent les seuls mGluRs du groupe III fonctionnels, ce qui fait de cette structure un modèle idéal pour l'étude de ces récepteurs.

Au cours de ce travail de thèse, à l'aide d'enregistrements électrophysiologiques (Patch-Clamp) et de mesures optiques des influx calciques présynaptiques (fluorométrie), nous nous sommes intéressé aux mécanismes d'action des mGluR4 aux synapses fibres parallèles – interneurones de la couche moléculaire, mais aussi fibres parallèles – cellule de Purkinje. Nous montrons que les mGluR4 inhibent les canaux calciques voltage-dépendants par une voie Gq/PLC/PKC-dépendante, et que ces récepteurs mettent également en jeu des mécanismes parallèles moins dépendants du calcium reposant sur des interactions plus directes avec des protéines impliquées dans les processus d'exocytose.

En parallèle, nous avons également contribué à la caractérisation de deux nouveaux outils pharmacologiques (agonistes orthostériques) sélectifs pour mGluR4, dont le manque actuel constitue une limite majeure à l'étude de ces récepteurs dans nombre de structures cérébrales où ils sont exprimés.

Mots clés: *cervelet, fibres parallèles, interneurones de la couche moléculaire, cellules de Purkinje, glutamate, mGluR4, agonistes, voies de signalisation, calcium, exocytose.*

Pharmacologie et Biochimie de la Synapse
Institut de Biochimie et Biophysique Moléculaire et Cellulaire – CNRS UMR 8619
Bâtiment 430 - Université Paris-Sud
91405 Orsay cedex, FRANCE