THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Neurosciences

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Unité de recherche Institut des Neurosciences de Montpellier

Rôle des variants d'épissage de la géphyrine dans la diversité des synapses inhibitrices

Présentée par Raphaël DOS REIS
Le 17 juin 2021

Sous la direction de Fabrice ANGO

Devant le jury composé de

Dr. Sabine LÉVI	Présidente du jury
Dr. Susanne SCHMIDT	Rapporteur
Dr. Alain CHÉDOTAL	Rapporteur
Dr. Éric ALLEMAND	Examinateur
Dr. Fabrice ANGO	Directeur de thèse

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

Remerciements

Je dois d'abord remercier le Dr Fabrice Ango pour m'avoir accueilli lors de ma première année de master, cette expérience a sans aucun doute été ce qui m'a donné la confiance de continuer en thèse, mais aussi bien sûr de m'avoir permis de continuer en thèse. J'ai apprécié toutes nos conversations scientifiques, tous les nombreux conseils prodigués, et l'infini soutien. Je crois avoir été extrêmement chanceux en tombant sur quelqu'un d'aussi patient et passionné.

Je remercie les membres de mon jury, Susanne Schmidt, non seulement pour avoir accepté de présider cette thèse mais aussi pour vos conseils au cours des comités de suivi; Eric Allemand, qui non seulement a accepté d'être examinateur, a été un collaborateur principal pour tous ces travaux; Sabine Lévi et Alain Chédotal, qui ont accepté de m'accorder de leur temps pour être les rapporteurs de ma thèse. Merci également à Patrick Carroll, qui a prodigué de nombreux conseils durant ces comités de suivi.

Merci à Céline Talignani, qui a joué un rôle crucial dans ma formation non seulement à la paillasse, mais aussi sur le plan personnel, tous les conseils sages, les encouragements et les remontrances.

Merci à Alyssa Pereira, ma co-thésarde. Ça a été un plaisir de t'avoir comme stagiaire, et encore plus de t'avoir eu à mes côtés pendant cette thèse. Bon, tu savais déjà que j'étais nul pour les remerciements, mais j'espère quand même que tu sais que c'est ton indéfectible soutien qui m'a permis de tenir bon.

Merci à Laurent Soustelle et Sophie Layalle, avec qui nous avons partagé un bureau. Meilleurs "colocataires", sans comparaison. Merci pour le soutien, tous les conseils, discussions scientifiques ou non.

Merci à l'équipe MRI de l'IGH, Marie-Pierre Blanchard, Amélie Sarrazin, Julio Mateos Langerak, pour leur expertise et leur aide technique dans toutes ces expériences de microscopie.

Merci à Céline Lemmers et Isabelle Bidaud pour votre aide technique pour les expériences de culture cellulaire et utilisation de vecteurs viraux.

Merci à toute l'équipe de l'animalerie à l'IGF, notamment Denis Greuet, Mahéva et Steeve pour toute votre aide sur la gestion des souris et la mise en place des expériences.

Merci à ma petite famille, vous savez tout ce que vous faites pour moi. Mention spéciale pour ma mère qui a su supporter un être si désorganisé, auto-saboteur, procrastinateur et qui aime compliquer les choses autant que possible. Mais ça en a valu la peine, au final.

Merci à tous les collègues doctorants et stagiaires de l'IGF et de l'INM, Angelina, Lucile, Vincent, Anne-Laure, Clémentine, Eloise, et tous les autres, vous avez tous rendu cette expérience plus fun.

Table des matières

Remerciements **3**

Table des matières **5**

Liste des figures et tableaux **7**

Liste des abréviations **9**

Résumé **13**

Abstract **14**

Introduction **15**

Préambule **16**

1-Les acteurs cellulaires du SNC **18**
1.1 - Le neurone, une cellule hautement compartimentalisée 19
1.2 - Les neurones excitateurs 20
1.3 - Les neurones modulateurs 21
1.4 - Les neurones inhibiteurs 22
2 - La synapse **30**
2.1 - Les synapse excitatrices et les synapses inhibitrices 31
2.2 - Mise en place des synapses 32
2.3 - La pré-synapse 35
2.3.1 - Formation et acteurs moléculaires de la pré-synapse 35
2.3.2 - Fonctionnement de la pré-synapse 41
2.4 - La post-synapse 44
2.4.1 - Les protéines d'adhésion 44
2.4.1.1 - Les protéines d'adhésion des synapses excitatrices 46
2.4.1.2 - Les protéines d'adhésion des synapses inhibitrices 53
2.4.2 - Les récepteurs 58
2.4.2.1 - Les récepteurs des synapses excitatrices 61
2.4.2.2 - Les récepteurs des synapses inhibitrices 63
2.4.3 - Les protéines d'échafaudage 71

2.4.3.1 - Les protéines d'échafaudage des synapses excitatrices 73
2.4.3.2 - Les protéines d'échafaudage des synapses inhibitrices 77
3 - La géphyrine 78
3.1 - Introduction générale de la géphyrine, fonctions connues et état de la recherche actuelle 79
3.2 - Description du gène, de la structure et des domaines de la protéine 82
3.3 - Interactions avec les partenaires connus..... 84
3.3.1 - Collybistine 86
3.3.2 - Neuroligine 2..... 91
3.3.3 - Cytosquelette (Pin1-2, RAFT1, Tubuline, Dlc 1-2) ... 95
3.3.4 - Les récepteurs GABAergiques 97
3.3.5 - Les récepteurs glycinergiques..... 98
3.4 - Modifications post traductionnelles 99
3.5 - Epissage alternatif de la géphyrine..... 106
4 - Modèle d'étude : le cervelet..... 109
4.1 - Rôle du cervelet 110
4.2 - L'organisation et types cellulaires composant le cervelet..... 111
4.2.1 L'organisation en couche 111
4.2.2 - Les cellules de Purkinje..... 113
4.2.3 - Les interneurones de la couche moléculaire..... 114
4.2.4 - Les cellules granulaires..... 115
4.2.5 - Les interneurones de la couche granulaire 115
4.3 - Formation du cervelet au cours du développement..... 117
Objectifs de la thèse..... 118
Résultats expérimentaux 122
Discussion et perspectives 166
Conclusion générale..... 167
Discussion générale et perspectives..... 169
Matériel et méthodes..... 175
Annexe..... 196
Insight Article : Sensing how to balance 197
Bibliographie 200

Liste des figures et tableaux

Introduction

Figure 1 : Schémas de différentes formes d'organisations de microcircuits.

Figure 2 : Dimensions multiples de la diversité des interneurones.

Figure 3 : Schémas des différentes morphologies des interneurones GABAergiques.

Figure 4 : Diversité des neurones GABAergiques dans le néocortex.

Figure 5 : Diversité morphologique et connectivité des interneurones de l'hippocampe.

Figure 6 : Taxonomie des types de cellules GABAergiques par scRNA-seq.

Figure 7 : Schéma de 6 populations d'interneurones GABAergiques avec des modèles d'innervation caractéristiques.

Figure 8 : Synapse excitatrice asymétrique et synapse inhibitrice symétrique.

Figure 9 : Les étapes de la mise en place des synapses.

Figure 10 : Les signalisations adhésives trans-synaptiques orchestrent l'assemblage synaptique excitateur et inhibiteur.

Figure 11 : Transport des composants pré-synaptiques.

Figure 12 : Assemblage de la zone active présynaptique.

Figure 13 : Modèle d'organisation du bouton présynaptique et de la zone active.

Tableau 1 : Protéines interagissant avec la géphyrine.

Figure 14 : Le cycle des vésicules synaptiques.

Figure 15 : Structure du domaine des CAMs synaptiques et schéma des interactions protéine-protéine entre les CAMs synaptiques exprimés sur les sites pré- et postsynaptiques.

Figure 16 : Représentation schématique de la structure typique des récepteurs GABA-A et de la composition des sous-unités.

Figure 17 : Structures des 1-GlyR homomères et 1-GlyR hétéromères modélisées.

Figure 18 : Organisation des complexes protéiques dans la densité postsynaptique (PSD).

Figure 19 : Schéma d'un synapse inhibitrice.

Figure 20 : La géphyrine dans les synapses inhibitrices.

Figure 21 : Représentation schématique des domaines de la géphyrine.

Figure 22 : La structure de la collybistine.

Figure 23 : Structure of NLG2 at inhibitory synapses.

Figure 24 : Modifications post-traductionnelles et principaux sites de liaison sur la géphyrine neuronale.

Figure 25 : Les différentes variations de l'épissage alternatif.

Figure 26 : L'organisation en couche et les types cellulaires du cortex cérébelleux.

Figure 27 : La migration neuronale et mise en place des couches au cours du développement.

Résultats

Fig. 1: Repertoire of Gphn alternative transcripts expressed in mouse brain.

Fig.2: Gphn alternative transcripts are translated into GPHN protein isoforms.

Fig.3: GPHN isoforms regulated during neural development displayed distinct synaptic properties.

Fig.4: Heterogeneous GPHN isoforms distribution underlies synaptic diversity and assembly.

Fig.S1: Gphn transcripts expressed in cortex and cerebellum of mouse.

Fig.S2: Gphn transcripts engaged in the translation machinery, and GPHN protein enrichment.

Fig.S3: Exogenous expression of GPHN isoforms in HEK 293 and primary neuronal cells.

Fig.S4: The four GPHN epitopes are differentially localized at specific inhibitory synapses.

Liste des abréviations

5-HT : 5-hydroxytryptamin (sérotonine)

5-HTR : 5-HT Receptor

AMPA : α-Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazolepropionic Acid

AMPAR : AMPA Receptor

ADP : Adenosine Diphosphate

AMPc : cyclic Adenosine Monophosphate

ATP : Adenosine Triphosphate

ATV : Aire Tegmentale Ventrale

BAR : (domaine) Bin/Amphiphysine/Rvs

BiC : Bistratified Cells

CA (1,2,3) : Corne d'Ammon

CAM : Cell Adhesion Molecule

CamKII : Calmodulin-dependent protein Kinase II

Cb : Collybistin

CCK : Cholécystokinine

CCKBC : Cholecystokinine Basket Cell

CDK5 : Cyclin-Dependent Kinase 5

Chodl : Chondrolectin

CR : Calretinin

CVZ : Cerebellar Ventricular Zone

DAT : Dopamin Transporter

DH : (domaine) Dbl Homology

DI : Déficience Intellectuelle

EPSP : Excitatory Post-Synaptic Potential

ERK1/2 : Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2

EVH1 : Ena/VASP Homology 1

GABA : γ-Aminobutyrique Acide

GABA(A/B)R : GABA(A/B) Receptor

GABARAP : GABAR Associated Protein

GAD : Glutamate Decarboxylase

GDC : Glycine Decarboxylase

GDP : Guanosine Diphosphate

GKAP : Guanylate Kinase Associated Protein

Gly : Glycine

GlyR : Glycine Receptor

GLYT : Glycine Transporter

GSK3β : Glycogen Synthase Kinase 3β

GTP : Guanosine Triphosphate

IP3 : Inositol-1,4,5-trisphosphate

IPSP : Inhibitory Post-Synaptic Potential

ISI : Interneuron-Selective Interneurons

KIF : Kinesin Family

LGIC : Ligand-Gated Ion Channel

LRR : Leucine-Rich Repeat

LRRTM : Leucine-Rich Repeat Transmembrane

LTD : Long Term Depression

LTP : Long Term Potentiation

MAP : Microtubule Associated Protein

MAGUK : Membrane-Associated Guanylate Kinase

MLC : Myosin Light Chain

MLCK : Myosin Light Chain Kinase

MPT : Modification Post-Traductionnelle

MT : Microtubule

NCAM : Neuron Cell Adhesion Molecule

NET : Norepinephrin Transporter

NGL : Netrin-G Ligand

NLG : Neuroligin

NMDA : N-methyl-D-aspartate

NMDAR : NMDA Receptor

NOS : Nitric Oxyde Synthase

NPY : Neuropeptide Y

NRX : Neurexin

O-LM : Oriens Lacunosum-Moleculare (interneuron)

PAJ : Puncta Adherentia Junctions

PDZ : Post synaptic density protein, Drosophila disc large tumor suppressor, and Zonula occludens-1 protein

PH : (domain) Pleckstrin Homology

PICK1 : Protein Interacting with C Kinase 1

PI3P : Phosphatidylinositol 3-Phosphate

PIN1 : Peptidyl-prolyl Isomerase 1

PKA : Protein Kinase A

PMAT : Plasma Membrane Monoamine Transporter

ProSAP : Proline-rich Synapse-Associated Protein

PSD : Post-Synaptic Density

PV : Parvalbumin

PVBC : Parvalbumin Basket Cells

RNA : Ribonucleic Acid

RCPG : Récepteurs couplés aux Protéines G

SALM : Synaptic Adhesion-Like Molecule

SAP : Synapse Associated Protein

SH3 : (domain) Src Homology 3

Shank : SH3 domain with Ankyrin repeat

SHMT : Serin Hydroxymethyltransferase

SNX27 : Sorting Nexin 27

SiRNA : short interfering RNA

SNC : Système Nerveux Central

S-SCAM : Synaptic Scaffolding Molecule

SST : Somatostatin

s.l.m. : stratum lacunosum moleculare

s.o. : stratum oriens

s.p. : stratum pyramidale

s.r. : stratum radiatum

SUMO: Small Ubiquitin-like Modifier

SynCAM : Synaptic Cell Adhesion Molecule

TLE : Temportal Lobe Epilepsy

TSA : Troubles du Spectre de l'Autisme

TRPC : Transient Receptor Potential Cation Channel

VGAT : Vesicular GABA Transporter

VGLUT : Vesicular Glutamate Transporter

VIP : Vasoactive Intestinal Peptide

VMAT : Vesicular Monoamines Transporter

Résumé

La diversité des synapses inhibitrices est soutenue par de multiples classes d'interneurones aux morphologies, schémas de connectivité et propriétés physiologiques distincts. Pourtant, les déterminants moléculaires spécifiques de la diversité des synapses inhibitrices restent largement inconnus. Nous avons étudié la géphyrine (Gphn), considérée comme la protéine d'échafaudage principale des synapses inhibitrices qui contrôle notamment la localisation et la fonction des récepteurs inhibiteurs, mais est également responsable de l'organisation des différents acteurs de la post-synapse inhibitrice. De précédentes études ont révélé que la géphyrine est soumise à l'épissage alternatif, bien qu'une quantité limitée de variants avaient été recensés, et que l'expression de variants d'épissage aberrants de la GPHN a été identifiée comme un facteur de risque pour différents troubles neurologiques, comme la schizophrénie, l'autisme, ou encore l'épilepsie. Au cours de nos travaux, nous avons à l'aide d'une technique de séquençage découvert 277 variantes d'épissage de la Gphn exprimées au cours du développement du cerveau, générant un protéome de la Gphn complexe, visiblement régulé selon la localisation mais aussi selon le stade de développement. Nos études d'immunohistochimie ont mis en évidence une localisation mais aussi des propriétés de clustering distinctes entre les différents variants. Nos données *in vivo* des ont révélé comment les changements d'expression des isoformes de Gphn contrôlent la formation des synapses inhibitrices dans le cortex cérébelleux, démontrant ainsi que la complexité des isoformes d'une seule protéine d'échafaudage postsynaptique contribue à la diversité moléculaire des synapses inhibitrices dans le cerveau.

Abstract

Inhibitory synapse diversity is supported by multiple classes of interneurons with distinct morphologies, connectivity patterns and physiological properties. Yet, the specific molecular determinants of inhibitory synapse diversity remain largely unknown. We studied gephyrin (Gphn), which is considered the major scaffolding protein of inhibitory synapses that controls the localization and function of inhibitory receptors, but is also responsible for the organization of the different actors of the inhibitory post-synapse. Previous studies have revealed that gephyrin is subject to alternative splicing, although a limited number of variants had been identified, and that the expression of aberrant splicing variants of GPHN has been identified as a risk factor for different neurological disorders, such as schizophrenia, autism, or epilepsy. In the course of this study, we have discovered 277 splice variants of Gphn expressed during brain development, generating a complex Gphn proteome, visibly regulated depending on the localization but also on the developmental stage. Our immunohistochemistry studies revealed distinct localization but also clustering properties between the different variants. Our *in vivo* data showed how changes in Gphn isoform expression control the formation of inhibitory synapses in the cerebellar cortex, demonstrating that the complexity of isoforms of a single postsynaptic scaffolding protein contributes to the molecular diversity of inhibitory synapses in the brain.

INTRODUCTION

Préambule

Le système nerveux central est constitué de plusieurs milliards de neurones, des cellules spécialisées qui interagissent entre eux par l'intermédiaire de contacts spécialisés appelés synapses. Les synapses, qui sont les unités fondamentales de traitement de l'information des circuits neuronaux, constituent la base de toutes les fonctions cérébrales. C'est via ces interactions que les neurones échangent des informations, et ces processus sont la base sur laquelle repose la fonction du système nerveux, qui est de traiter les influx sensoriels, composer une réponse appropriée et l'acheminer vers les organes cibles. Ces réseaux neuronaux sont donc essentiels à la fonction du système nerveux et par extension de l'organisme. La mise en place de ces circuits met en jeu des processus finement régulés, depuis la génération de neurones à partir de précurseurs, la migration de de ces neurones, leur maturation impliquant la pousse de neurites, la croissance et le guidage axonal ainsi que la synaptogenèse.

Lors de la synaptogenèse, les synapses se forment via un processus coordonné qui orchestre une variété d'événements cellulaires régulés de façon dynamique. Elle peut se décomposer en 2 étapes clés, une étape de reconnaissance entre la pré-synapse et la post-synapse, où l'élément pré-synaptique va entrer en contact avec un élément post-synaptique. Ce contact précoce est généralement contrôlé par des protéines d'adhésions spécifiques. Ces protéines forment un complexe d'adhésion trans-synaptique qui va stabiliser ce contact. Par la suite, les éléments pré et post-synaptiques vont se différencier. La pré-synapse va accumuler des vésicules synaptiques qui contiennent les neurotransmetteurs, alors qu'au niveau de la post-synapse, les récepteurs pour ces neurotransmetteurs vont s'accumuler. Les mécanismes moléculaires qui vont conduire cette différentiation sont très

largement étudiés et un des facteurs clés est l'hétéro-complexe neuroligine (NLG) –neurexin (NRX) qui est présent de manière ubiquitaire à de nombreuses synapses et est suffisant pour induire la synaptogenèse. Au niveau de la post-synapse, NLG est capable de s'associer par son domaine intracellulaire à de nombreuses protéines dont des protéines d'échafaudage qui sont capables d'organiser et de recruter les protéines nécessaires à la fonction synaptique. À la pré-synapse, NRX contrôle l'architecture et la fonction de la zone active.

Le système nerveux central contient plusieurs milliards de synapses qui vont se former de manière spécifique entre les divers neurones, ces synapses vont avoir des caractéristiques uniques aussi bien dans leurs compositions moléculaires que leurs fonctions, l'étude des synapses reste encore aujourd'hui un énorme défi. Quels sont les mécanismes moléculaires qui régulent la formation spécifique de ces contacts, à l'échelle du cerveau, d'une structure corticale ou encore à l'échelle cellulaire et même au niveau subcellulaire (dendrite proximaux et distaux, les épines dendritiques, le corps cellulaire, le segment initial de l'axone ou même sur les boutons présynaptiques). Comment est régulé l'assemblage spécifique de chaque synapse qui va permettre sa fonction avec ses récepteurs spécifiques ? Comment est maintenu cette diversité synaptique ?

Alors que la compréhension des grandes fonctions du cerveau et le rôle des structures qui la composent sont aujourd'hui bien décrits, plusieurs aspects moléculaires fondamentaux restent encore à être découverts. Ainsi au sein du système nerveux central et de manière réductionniste, il existe deux classes principales de neurones. Les neurones principaux, majoritairement excitateurs, qui portent l'information neuronale et les neurones inhibiteurs qui contrôlent le passage de cette information. Le récent développement

d'approche méthodologique pour analyser le transcriptome des neurones à l'échelle de la cellule unique a révélé une très grande hétérogénéité génétique, aussi bien des neurones principaux que des interneurones inhibiteurs. Par exemple, dans l'hippocampe et le cortex, il a été découvert plus de 60 sous-types d'interneurones inhibiteurs avec des morphologies, des caractéristiques biochimiques et des propriétés électrophysiologiques uniques. Cette grande diversité cellulaire rend compte de la complexité fonctionnelle du système nerveux et de la puissance computationnelle d'un tel système. Un des défis des neurosciences est de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires qui vont conduire à l'établissement d'un réseau neuronal fonctionnel capable de traiter toutes sortes d'information sensorielle. À l'échelle de ma thèse, je me suis intéressé aux mécanismes qui pourraient être impliqués dans la diversité moléculaire des synapses inhibitrices en utilisant comme modèle d'étude le cervelet.

1 - Les acteurs cellulaires du SNC

Comme énoncé plus haut, la classification des différents types de neurones évolue considérablement et régulièrement. En plus des deux types majeurs qui sont les neurones excitateurs et les neurones inhibiteurs, nous pouvons également ajouter les neurones dits modulateurs dont la fonction principale et de moduler l'efficacité et la plasticité de la transmission synaptique Ces différents types interagissent entre eux et chacun est essentiel pour la fonction du système nerveux. Ils sont eux-mêmes divisés en sous-groupes selon divers critères comme la composition en neurotransmetteur, la morphologie, la connectivité ou encore la localisation.

Un autre acteur majeur du fonctionnement du système nerveux est la cellule gliale. On retrouve également une très grande diversité de formes et de fonctions de ces cellules qui forment un environnement nécessaire à la fonction physiologique du système nerveux. Elles assurent diverses fonctions telles que la myélinisation des axones , par les oligodendrocytes dans le SNC et les cellules de Schwann dans le SNP, la défense immunitaire par les microglies, l'interface fonctionnelle avec le liquide céphalo-rachidien par les cellules épendymaires, mais encore des fonctions liées au soutien des neurones, comme la recapture de neurotransmetteur et la distribution de glucose et autre nutriment aux neurones, par les astrocytes. Parmi les cellules gliales, les astrocytes ont également une fonction dans la synapse (Perez-Catalan, Doe, et Ackerman, 2021). Ils jouent un rôle dès la synaptogénèse et dans l'étape d'élimination des synapses. Dans la synaptogénèse ils génèrent des signaux, Hevin et NRCAM, nécessaires à la formation des synapses excitatrices et inhibitrices respectivement. Ils sont aussi impliqués dans la fonction de la synapse, et jouent également un rôle dans la plasticité synaptique (Perez-Catalan, Doe, et Ackerman, 2021).

1.1 - Le neurone, une cellule hautement compartimentalisée

Une particularité des neurones est leur extrême compartimentalisation. En effet, à partir du corps cellulaire, chaque neurone va développer plusieurs prolongements neuritiques. Les dendrites forment un réseau de branches dont la forme varie grandement selon le type de neurone, au niveau de la taille de la dendrite, de son orientation par rapport au corps cellulaire ou de l'espace occupé par un arbre dendritique. Sur ces dendrites même on peut trouver des épines dendritiques, compartiments encore plus spécialisés sur

lesquels les synapses majoritairement excitatrices peuvent se former. L'axone est le compartiment ayant pour rôle de transmettre l'information vers d'autres cellules, il s'agit de filaments fins pouvant atteindre des régions extrêmement éloignées du corps cellulaire. Sa forme peut également varier selon le type cellulaire, certains axones forment de nombreux branchements, d'autres se divisent et contactent des régions différentes. A la naissance de l'axone se trouve le segment initial, un compartiment spécifique où sont générés les potentiels d'action et qui s'avère être également une cible intéressante pour réguler l'activité du neurone.

1.2 - Les neurones (principaux ou de projection) excitateurs

Les neurones excitateurs utilisent principalement le glutamate comme neurotransmetteur. Les cellules principales ou neurones de projection sont dans la majeure partie des régions du cerveau des neurones excitateurs. Leur particularité est leur axone long qui sort de la structure contenant le soma du neurone et part innerver d'autres régions du système nerveux, ils ont donc un rôle crucial dans la formation du réseau communiquant entre les différentes structures du système nerveux. Les neurones excitateurs sont généralement classés selon leur morphologie et localisation dans les couches de la structure concernée. Plus récemment, des analyses transcriptomiques en cellule unique sont utilisées pour caractériser ou confirmer les différentes classes de neurones. Une étude, en effectuant un séquençage ARN sur cellule unique dans le cortex et l'hippocampe, ont révélé 47 sous-classes présentant des distinctions moléculaires (Zeisel et al., 2015). Une étude utilisant la même approche mais se focalisant sur le néocortex a également vérifié que ces sous-classes pouvaient différer dans leur propriétés

électrophysiologiques (Tasic et al., 2016) Cette étude a été poursuivie et a révélé un lien entre les sous-classes transcriptionnelles des neurones principaux et leur zones de projections spécifiques (Tasic et al., 2017).

1.3 - Les neurones modulateurs

Les neurones modulateurs ont pour rôle de réguler une population de neurones en altérant leur propriétés électrophysiologiques ou synaptiques, par exemple en augmentant ou diminuant les courants voltage-dépendant. Les neuromodulateurs sont des substances qui n'activent pas directement les récepteurs des canaux ioniques mais qui, en agissant conjointement avec les neurotransmetteurs, renforcent les réponses excitatrices ou inhibitrices des récepteurs. De manière générale, la neuromodulation est basée sur la liaison de ces neuromodulateurs sur des récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G, et la cascade de signalisation induit un changement dans le fonctionnement du neurone cible de manière plus globale mais également dans la durée. Cette action médiée par les récepteurs métabotropiques n'exempte toutefois pas les neurones modulateurs d'avoir un effet sur des récepteurs ionotropiques. C'est le cas par exemple du récepteur à la sérotonine 5-HT3, un récepteur ionotropique connu pour moduler la libération de dopamine dans le striatum (Thompson et Lummis, 2006 ; Nayak et al., 1999). Outre la sérotonine, qui est connue pour moduler l'activité neuronale et un large éventail de processus neuropsychologiques, les neurotransmetteurs utilisés par les neurones modulateurs comprennent aussi la dopamine, qui joue un rôle essentiel dans la récompense et la régulation des mouvements, ou encore l'adrénaline et la noradrénaline, impliquées dans la réaction de "combat ou fuite".

1.4 - Les neurones inhibiteurs

Les interneurones sont des neurones dont l'axone et les dendrites, à l'inverse des cellules principales, reste dans la même structure que le soma. La majorité des interneurones sont inhibiteurs et utilisent principalement l'acide γ-aminobutyrique (GABA) et/ou a glycine comme neurotransmetteurs. Leur rôle consiste souvent en l'inhibition par hyperpolarisation des cellules principales régulant ainsi leur activité et plus généralement la région qu'ils occupent. Ils peuvent recevoir des inputs par le neurone principal, formant une boucle d'inhibition par feed-back, ou ils peuvent être activés par des neurones de régions différentes créant ainsi une inhibition par feed-forward. Le résultat de ce contrôle exercé par les interneurones inhibiteurs est la coordination et la synchronisation de l'activité d'une population de cellules principales.

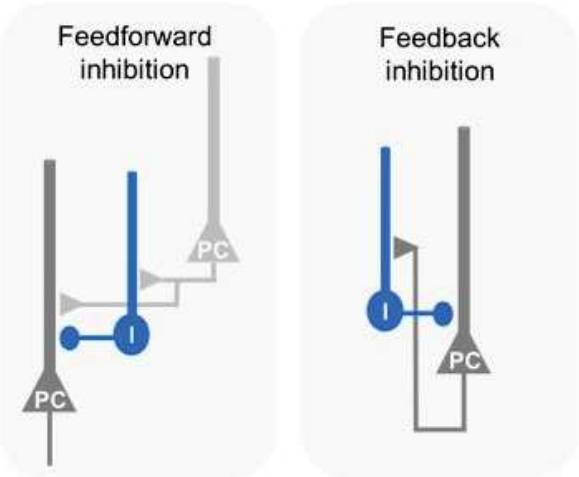


Figure 1 : Schémas de différentes formes d'organisations de microcircuits: Inhibition en feed-forward et en feedback. Neurone gris : cellule pyramidale (PC) ; bleu : interneurone (Muller et Remy, 2014).

Présents dans la majeure partie du système nerveux central, mais moins représentés que les cellules principales, les interneurones présentent néanmoins une grande diversité tant au niveau de la morphologie, localisation, composition moléculaire et fonction. Étant donné que ce projet s'intéresse à la diversité des synapses inhibitrices, il est important de comprendre l'origine de cette diversité et les paramètres qui sont impliqués.

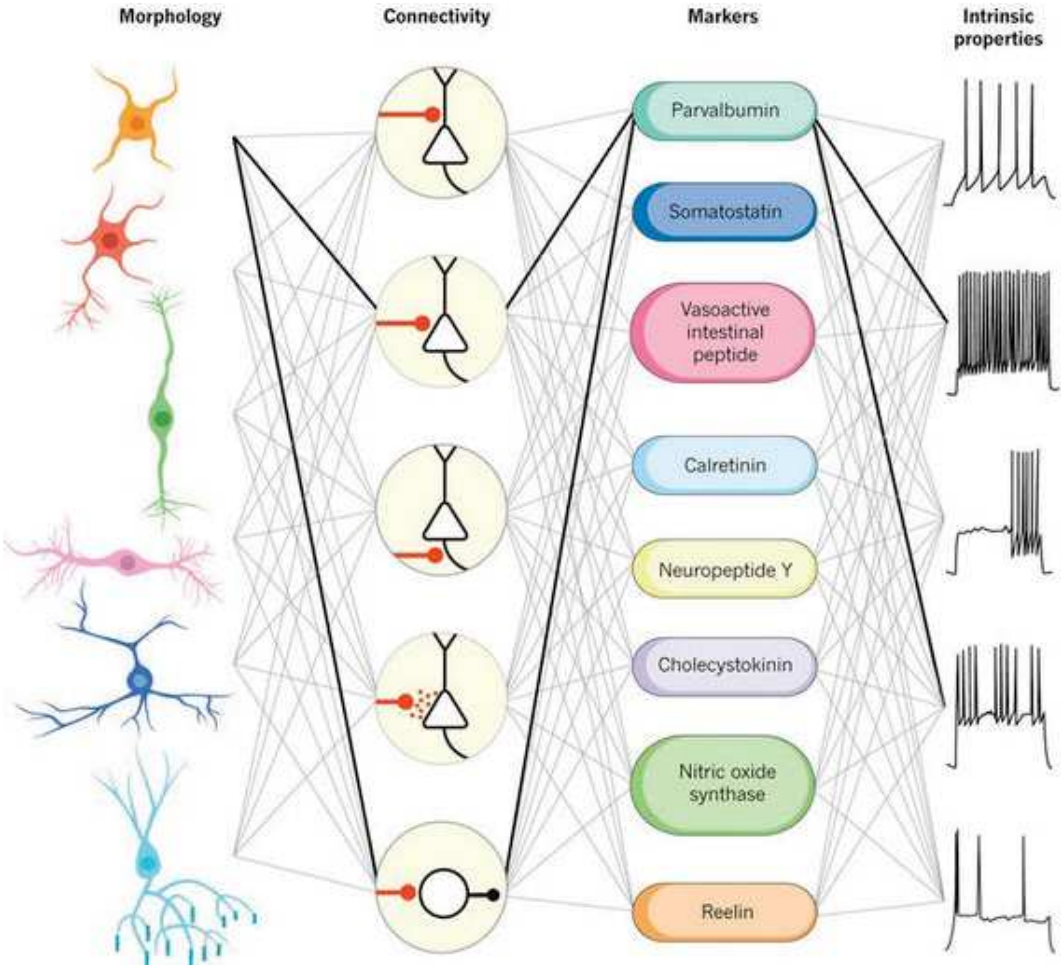


Figure 2 : Dimensions multiples de la diversité des interneurones.

Les types de cellules d'interneurones sont généralement définis à l'aide d'une combinaison de critères basés sur la morphologie, le schéma de connectivité, les propriétés synaptiques, l'expression des marqueurs et les propriétés de tir intrinsèques (Kepecs et Fishell, 2014).

Alors que les interneurones ne représentent que 20% des neurones du système nerveux central, ils possèdent une très grande diversité. Cette diversité est caractérisée par des morphologies, des propriétés biophysiques, des marqueurs moléculaires et des rôles fonctionnels variés (Markram et al. 2004 ; Monyer et Markram 2004). Par conséquent, la manière la plus courante de classer les cellules inhibitrices implique une combinaison de ces paramètres (Figure 2), et les approches de souris transgéniques constituent un moyen précieux d'identifier et de manipuler les différents sous-types d'interneurones.

Alors que la classification des sous-types d'interneurones est encore très débattue, certains ont proposé un schéma de classification basé principalement sur les modèles d'arborisation axonale (DeFelipe et al., 2013). Cette première classification a le mérite d'identifier simplement différentes familles d'interneurones (Figure 3). Nous pouvons ainsi en distinguer 8 classes : arcade, Cajal-Retzius, chandelier, en panier, en queue de cheval, panier large , de Martinotti et neurogliaforme.

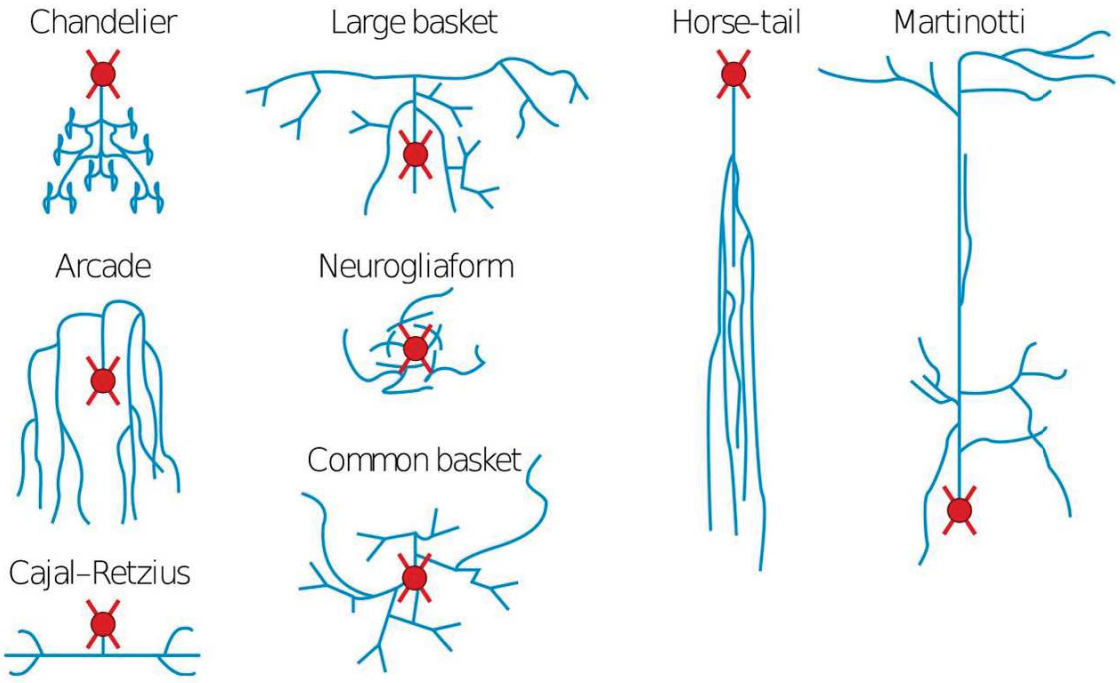


Figure 3 : Schémas des différentes morphologies des interneurones GABAergiques (DeFelipe et al., 2013 ; Mihaljević et al., 2019).

Un autre paramètre important de la diversité des neurones inhibiteurs est leur composition moléculaire et plus précisément les marqueurs spécifiques qu'ils expriment. Ainsi, la plus grande classe d'interneurones corticaux est caractérisée par l'expression de la paravalbumine (PV), tandis qu'une deuxième classe d'interneurones est caractérisée par l'expression du neuropeptide somatostatine (SST). Plusieurs marqueurs peuvent intervenir pour spécifier encore un sous-type d'interneurone, avec comme exemple dans le néocortex une population de neurones de projection GABAergiques SST+ aux propriétés d'activation adaptatives et irrégulières, qui coexpriment fréquemment l'oxyde nitrique synthase (NOS), la chondrolectine (Chodl) et le neuropeptide Y (NPY) (He et al., 2016 ; Figure 4).

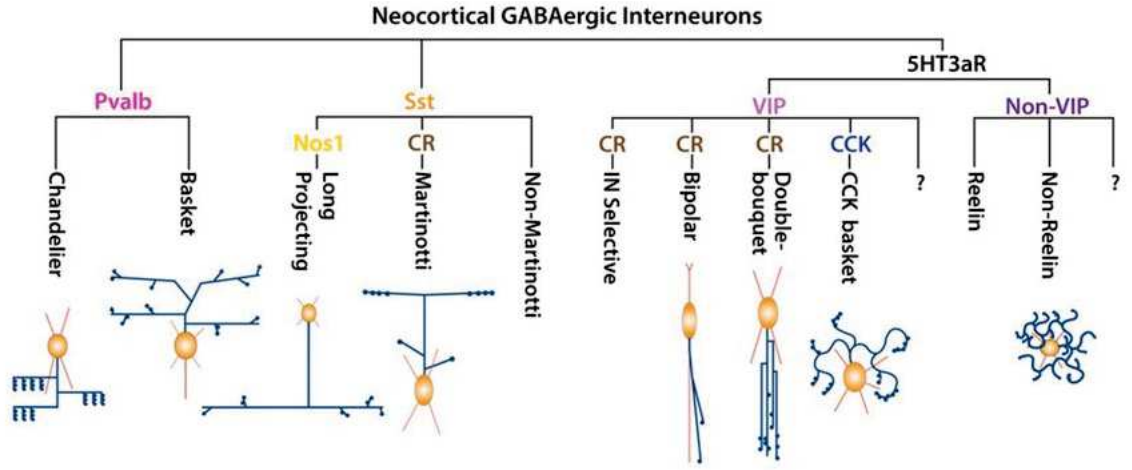


Figure 4 : Diversité des neurones GABAergiques dans le néocortex. Schémas décrivant les principales classes d'interneurones dans le néocortex de la souris. Les interneurones peuvent être organisés en trois grandes classes basées sur l'expression de PV, SST et du récepteur de la sérotonine 5HT3a (Lim et al., 2018).

L'utilisation récente de la transcriptomique à l'échelle de la cellule unique a révélé la très grande diversité moléculaire des différents types d'interneurones. Ainsi dans l'hippocampe jusqu'à 29 sous-types (Figure 5) ont été identifiés et dans le cortex (Paul et al., 2017) plus de 60 (Figure 6).

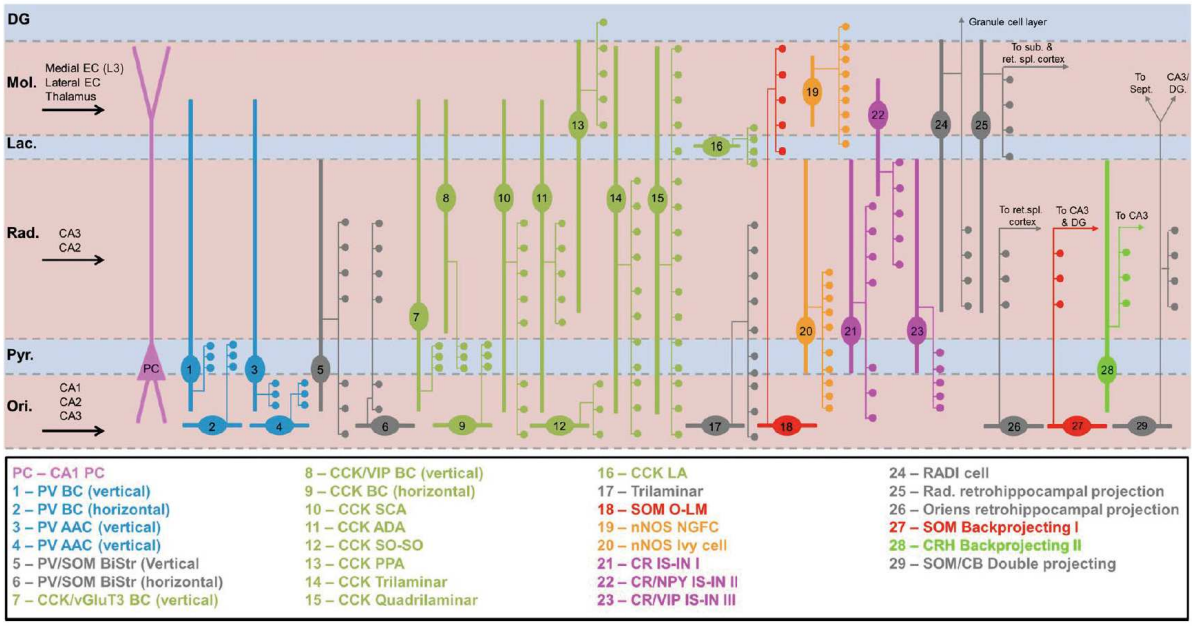


Figure 5 : Diversité morphologique et connectivité des interneurones de l'hippocampe. Schéma des sous-types d'interneurones morphologiques et neurochimiques connus dans la CA. Les domaines somatodendritiques (lignes épaisses), les prolongements axonales (lignes fines) et les principales régions terminales (cercles) sont représentés par rapport aux couches (pointillés). Les entrées afférentes sont indiquées par des flèches noires. Couches : Ori, str. oriens ; Pyr, str. pyramidale ; Rad., str. radiatum ; Lac., str. lacunosum ; Mol., str. moleculare ; DG, gyrus denté (Booker et Vida, 2018).

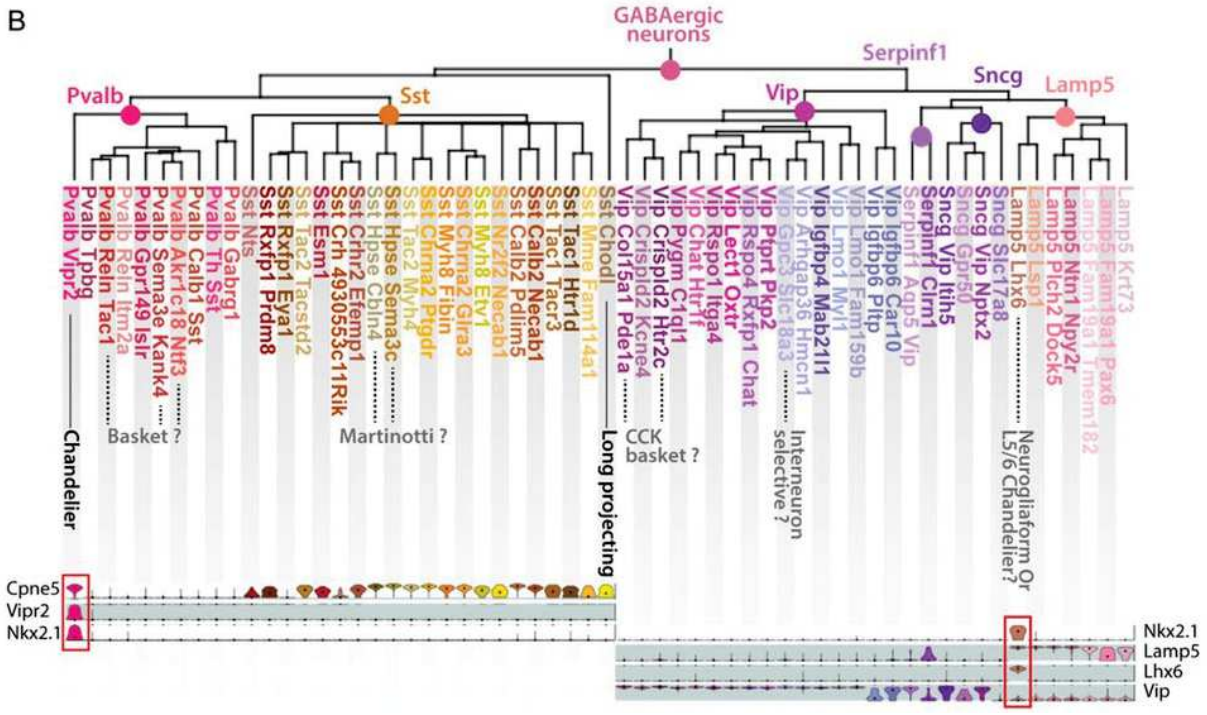


Figure 6 : Taxonomie des types de cellules GABAergiques par scRNA-seq. Les classes et sous-classes de cellules sont indiquées aux points de branchement du dendrogramme. Les distributions de l'expression des gènes marqueurs dans chaque groupe sont représentées en violin-plot sur la partie basse du schéma (Paul et al., 2017).

Au-delà de cette diversité morphologique et moléculaire, une caractéristique étonnante des interneurones GABAergiques est leurs capacités à innerver un domaine subcellulaire spécifique de leur cellule cible (dendrite distaux, proximaux, corps cellulaire ou segment initial de l'axone ; Figure 7).

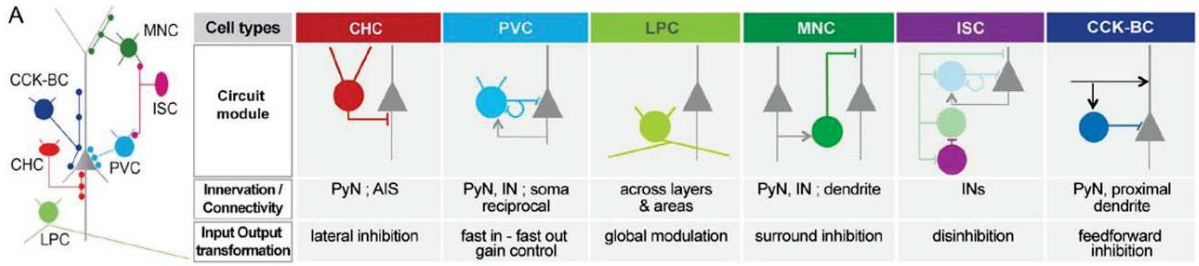


Figure 7 : Schéma de 6 populations d'interneurones GABAergiques avec des modèles d'innervation caractéristiques. (Paul et al., 2017).

Comme expliqué plus haut, le neurone est une cellule très compartimentalisée, il y a donc un des différences fonctionnelles entre les synapses effectuées en différents endroits du neurone cible. Parmi toutes les régions sur lesquelles peuvent s'établir des synapses, les plus notables sont sur les dendrites, à la fois sur des épines ou sur la dendrite même, sur le corps cellulaire ou au niveau du segment initial de l'axone. Les effets de la localisation de la synapses sont divers (Kubota et al., 2016 ; Boivin et Nedivi, 2018). L'inhibition dendritique peut atténuer localement les inputs excitateurs (Liu, 2004). Le voltage est régulé de manière différente entre les épines et le dendrite (DeFelipe et Fariñas, 1992 ; Chen et al., 2012). Les cellules en chandelier, que l'on trouve dans le cortex et l'hippocampe, sont également appelées neurones axo-axoniques pour leur tendance à innerver l'axone et plus précisément le segment initial de l'axone des cellules

pyramidales (Somogyi et al., 1982). Un autre exemple caractéristique sont les cellules en panier, retrouvées dans de nombreuses structures, elles innervent préférentiellement le soma et les dendrites proximaux des neurones cibles (Hu et al., 2014). Les cellules bistratifiées de l'hippocampe (BiC pour Bistratified Cells) sont nommées ainsi pour leurs arborisations axonales denses avec de fines collatérales divisées au-dessus et au-dessous de la stratum pyramidale (s.p.) innervant simultanément les territoires dendritiques basaux et apicaux des cellules pyramidales dans une proportion presque égale.

Enfin, le dernier paramètre de diversité des interneurones que nous voulons mentionner sont les propriétés électrophysiologiques. Ces propriétés sont immédiatement liées à la fonction du neurone et découlent en partie de plusieurs paramètres décrits plus haut, tels que la localisation des synapses ou l'expression de marqueurs synaptiques. Ainsi par exemple, les neurones SST+ mentionnés plus haut ont pour caractéristique majeure d'avoir de très haut niveau d'activité spontanée (Urban-Ciecko et Barth, 2016). Parmi les neurones SST+, les cellules de Martinotti du cortex ont un potentiel de membrane au repos plus élevé et un fréquence d'excitation plus faible que les cellules SST+ non-Martinotti (Nigro et al., 2018 ; Xu et al., 2006). La calrétinine (CR) est un autre exemple de marqueur commun ayant un impact sur la fonction d'un neurone, étant une protéine se liant au calcium, a été impliquée dans la modulation de l'excitabilité intrinsèque des neurones et dans l'induction de la LTP (pour potentialisation à long terme ; Camp et Wijesinghe, 2009). Les cellules neurogliales également présentées plus haut expriment la rééline et le NPY et sur le plan électrophysiologique, ont des propriétés de déclenchement de pics tardifs (Lee et al., 2010).

Ce chapitre avait pour but de présenter les acteurs cellulaires du SNC et de mettre l'accent sur leur diversité, ainsi que sur les paramètres responsables de cette diversité. Cette diversité se traduit évidemment au niveau synaptique, donnant naissance à un nombre de type de synapse incalculable, une diversité synaptique pour laquelle les mécanismes de mise en place et de régulations sont encore difficilement compris. Il a été décrit qu'autant les neurones excitateurs que les neurones inhibiteurs présentent une grande diversité, et c'est dans le chapitre suivant, portant sur les synapses et leur composition moléculaire, que le problème principal au centre de ce projet - à savoir la conciliation entre la diversité des synapses inhibitrices et les composants moléculaires qui supportent cette diversité - va devenir apparent.

2 - La synapse

L'existence de la synapse a été très débattue au cours de l'histoire des neurosciences, c'est à la fin du XIXème siècle que Ramon y Cajal propose l'existence des synapses qui formeraient des connections polarisées entre deux neurones. La preuve de l'existence des synapses a été apportée bien plus tard dans les années 1950, d'une part en Argentine par De Robertis et Bennet, d'autre part aux États-Unis par Georges Palade et Sanford Palay par la microscopie électronique. Ils ont montré que la synapse était composée de deux parties: le bouton pré-synaptique, la partie de l' axone qui contient les vésicules synaptiques contenant les molécules de neurotransmetteurs, et la

structure post-synaptique, une spécialisation membranaire du dendrite, des épines ou encore du corps cellulaire qui expriment les récepteurs aux neurotransmetteurs.

Aujourd'hui, nous savons qu'il existe deux grandes familles de synapse, les synapses excitatrices et les synapses inhibitrices.

2.1 - Les synapse excitatrices et les synapses inhibitrices

Comme nous allons le voir dans les chapitres suivants, il existe un grand nombre de molécules d'adhésions et de signalisation qui vont réguler la formation des synapses excitatrices et inhibitrices et conduire à la différentiation pré- et post-synaptique.



Figure 8 : Synapse excitatrice asymétrique et synapse inhibitrice symétrique. Image de microscopie électronique montrant la différence d'épaisseur entre la post-synapse inhibitrice et excitatrice (Nakamoto et al., 2014).

D’un point de vue morphologique, les synapses excitatrices et inhibitrices diffèrent sur plusieurs plans. Alors que les synapses excitatrices sont majoritairement effectuées sur les épines dendritiques des neurones cibles, les synapses inhibitrices se forment sur différents compartiments subcellulaire (dendrite, corps cellulaire, segment initial de l’axone) du neurone cible. Observées au microscope électronique les synapses présentent un aspect différent, la densité post-synaptique des synapses excitatrices est très large et dense (asymétrique par rapport à la pré-synapse), fait que l’on n’observe pas chez les synapses inhibitrices (symétriques, Figure 8). Au niveau de la pré-synapse, les vésicules contenant le glutamate ont une forme arrondie alors que ceux contenant le GABA sont plutôt oblongues.

2.2 - Mise en place des synapses

Dans la maturation des neurones, la mise en place des synapses intervient après la différenciation et la pousse des neurites, et peut se découper en trois grandes étapes. La première fait suite à la pousse axonale et correspond à la reconnaissance du neurone cible par l’axone du neurone émetteur. La seconde étape est la différenciation synaptique, et consiste en la réorganisation du cytosquelette et la mise en place des composants moléculaires essentiels à la liaison physique et à la fonction de la pré- et post-synapse. La troisième étape est la maturation de la synapse au cours de laquelle l’activité de la synapse va impacter sa stabilité et aboutir au maintien de la synapse, ou à sa disparition (Figure 9).

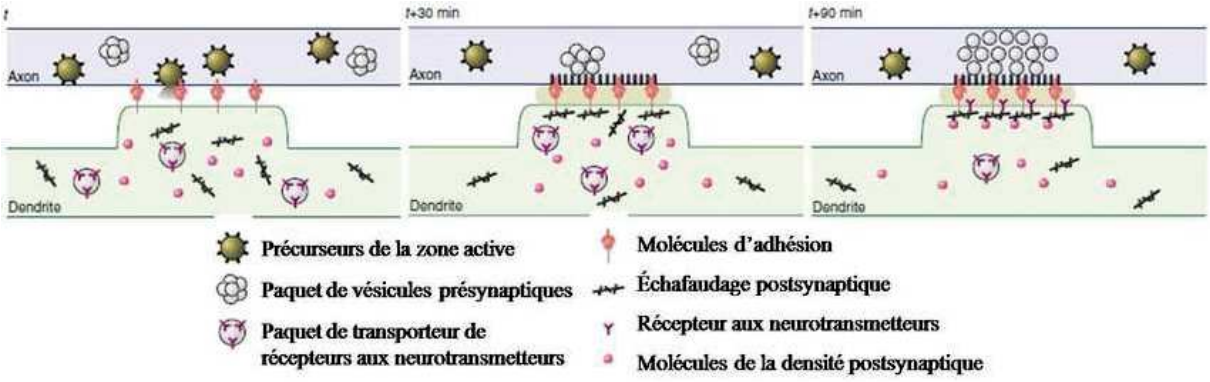


Figure 9 : Les étapes de la mise en place des synapses.

Lors du contact entre l'axone et son neurone cible, des molécules d'adhésion sont recrutées pour stabiliser le contact. Les compartiments pré- et post-synaptiques se différencient ensuite (Ziv et Garner, 2001).

Au cours de la première étape les molécules d'adhésions ont pour rôle d'établir et consolider les contacts entre la membrane de l'axone et celle du neurone post-synaptique (Figure 10) (Wit et al., 2009 ; Ko et al., 2009 ; Siddiqui et al., 2010).

Pour la seconde étape, les protéines d'adhésions et le cytosquelette de la pré-synapse s'organisent pour acheminer notamment les vésicules de neurotransmetteurs, les enzymes de synthèse relevante et les transporteurs servant à la recapture. Au niveau de la post-synapse, les protéines d'échafaudage se mettent en place, rassemblent sous forme de clusters les récepteurs acheminés, et se relient au cytosquelette de la post-synapse (Ziv et Garner, 2001 ; McAllister, 2007).

La dernière étape permet enfin de former à partir de ces contacts initiaux des synapses fonctionnelles. Cette étape repose sur l'activité de la synapse concernée, est notamment nécessaire à la formation des épines dendritiques, et permet ainsi alternativement de consolider la synapse ou bien de

l'éliminer. Cette sélection, régulée en partie par les molécules de la cascade du complément (Stevens et al., 2007) est une étape cruciale du développement, permettant l'élimination de synapses redondantes ou non-relevantes.

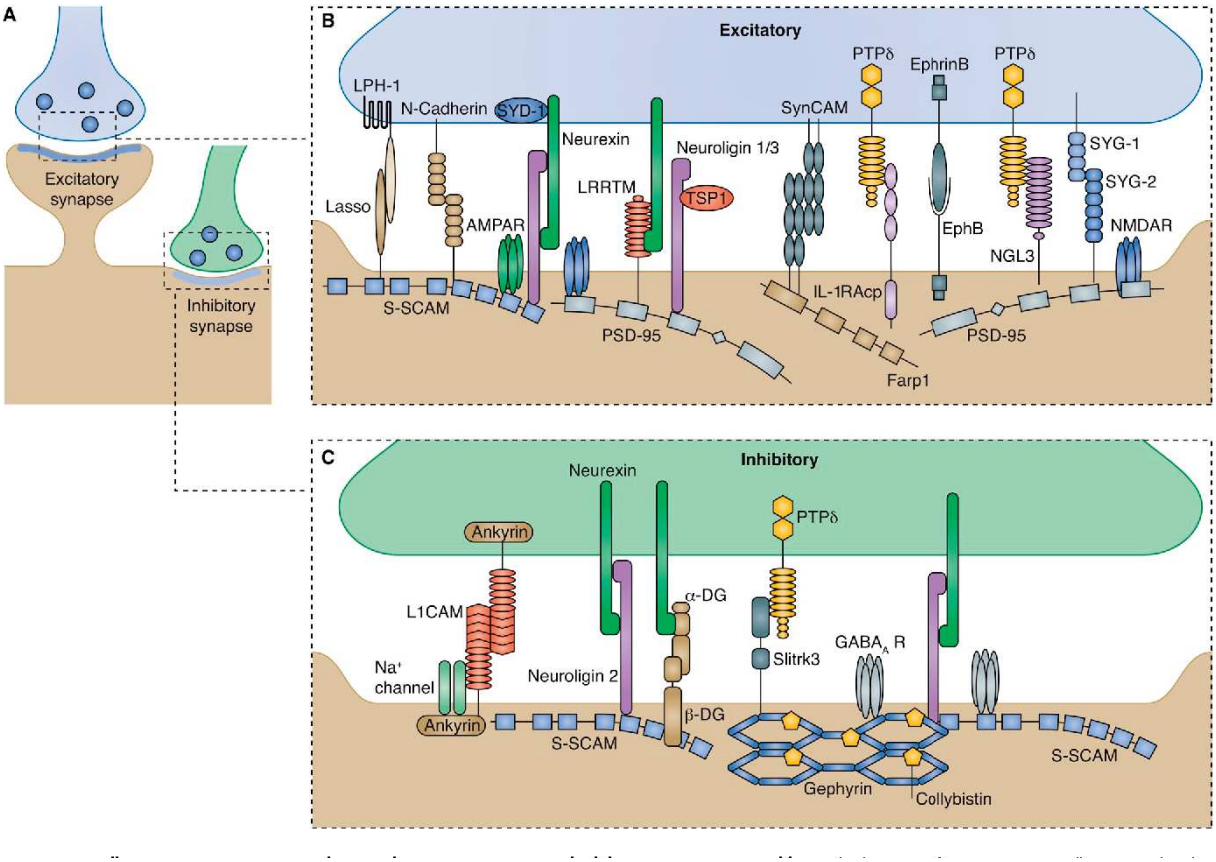


Figure 10 : Les signalisations adhésives trans-synaptiques orchestrent l'assemblage synaptique excitateur et inhibiteur. De multiples paires de molécules d'adhésion trans-synaptiques organisent la différenciation et la fonction synaptiques sur les sites pré- et postsynaptiques. Différentes molécules d'adhésion sont utilisées au niveau des synapses excitatrices et inhibitrices. LPH1, latrophiline 1 ; -DG, -dystroglycane ; S-SCAM, molécule d'échafaudage synaptique ; Lasso, organisateur de surface synaptique associé à LPH1 ; IL-1RAcp, protéine accessoire du récepteur de l'interleukine-1 (Chia, Li, et Shen, 2013).

2.3 - La pré-synapse

Bien que mon projet se focalise sur une protéine post-synaptique, il est utile de s'intéresser à la mise en place et le fonctionnement de la pré-synapse, et plus spécifiquement de noter les différentes protéines qui la composent, pour enfin comparer cette composition moléculaire entre la pré-synapse excitatrice et inhibitrice.

2.3.1 - Formation et acteurs moléculaires de la pré-synapse

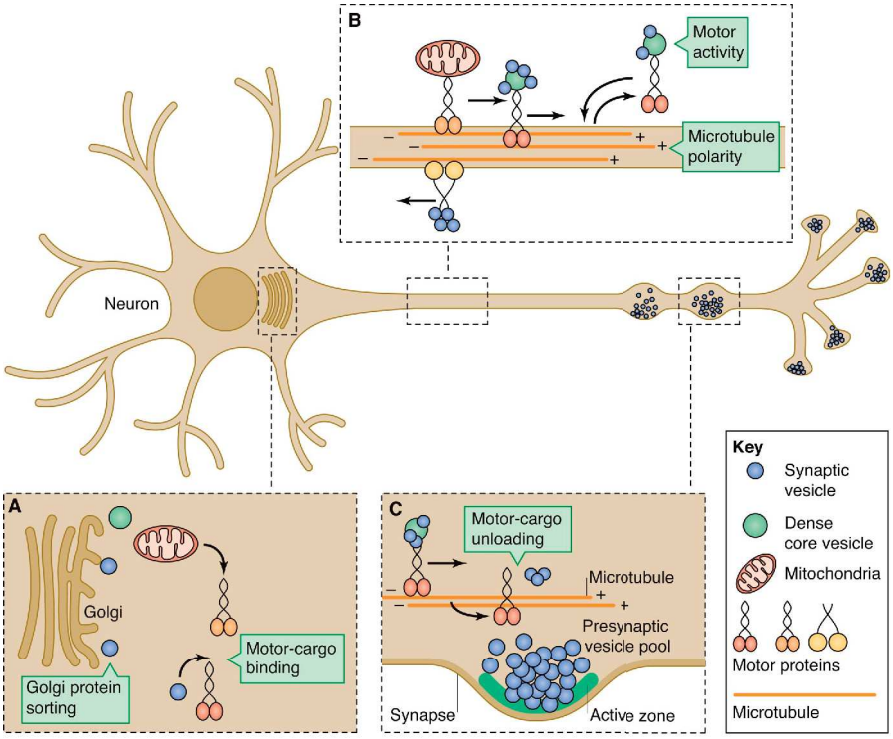


Figure 11 : Transport des composants pré-synaptiques (Chia et al., 2013). (A) Au niveau de l'appareil de Golgi, les protéines synaptiques doivent être triées dans des vésicules appropriées. Ces vésicules et d'autres marchandises telles que les mitochondries sont chargées sur des protéines motrices spécifiques. (B)

L'établissement d'une polarité microtubulaire appropriée le long de l'axone détermine le trafic antérograde et rétrograde par des protéines motrices dirigées vers l'extrémité positive et l'extrémité négative, comme les kinésines et la dynéine. (C) À la destination appropriée, le déchargement des cargaisons de moteurs se produit de manière régulée pour obtenir la distribution appropriée des boutons synaptiques. Au niveau des synapses, les précurseurs des vésicules synaptiques donnent naissance à des vésicules synaptiques matures. Les protéines requises pour le cycle SV et l'adhésion trans-synaptique se regroupent dans la zone active (AZ) sous la membrane plasmique juxtaposée à la membrane postsynaptique (Chia, Li, et Shen, 2013).

La formation de la pré-synapse repose en grande partie sur le réseau de microtubules (MT) formé dans l'axone, les molécules qui régulent la formation et l'orientation des MT et les divers moteurs moléculaires qui reposent sur les MT, telles que kinésin-1, UNC-33 (Seeger and Rice, 2010 ; Yan et al., 2013 ; Maniar et al., 2011). Le transport de vésicules synaptiques est également affecté par des protéines clefs telles que la doublecortine ou la synaptobrévine. La régulation précise du transport par les moteurs moléculaires spécifiques garantit que les cargos synaptiques sont acheminés et maintenus au niveau des synapses. Plusieurs études récentes ont apporté la preuve que deux kinases dépendantes de la cycline post-mitotiques sont des régulateurs importants du trafic antérograde et rétrograde des cargaisons présynaptiques. La kinase CDK-5 est requise dans de nombreux aspects de la fonction du système nerveux. Dans le contexte du développement et de la fonction présynaptique, il a été démontré que la CDK-5 régule le transport des vésicules synaptiques qui contiennent des neuropeptides (Ou et al., 2010 ; Goodwin et al., 2012). Le système de transport requiert également des

informations spatiales pour déterminer où l'accumulation du matériel présynaptique doit se faire. Plusieurs protéines (ARL-8, Rab3) identifiées chez le nématode et la drosophile ont cette fonction critique, et leur absence cause une diminution du nombre et de la taille des sites présynaptiques (Wu et al., 2013 ; Graf et al., 2009). Des études ont suggéré que les composants de la zone active présynaptique sont transportés sous une forme préassemblée par des vésicules de transport Piccolo-Bassoon qui peuvent contenir plusieurs composants nécessaires à la construction d'une synapse (Zhai et al., 2001 ; Shapira et al., 2003). Des études récentes ont montré que les vésicules de transport dérivées du Golgi contiennent de nombreuses protéines de la zone active, notamment Piccolo, Bassoon, RIM1α et ELKS2/CAST. Outre le matériel synaptique, les mitochondries constituent une autre cargaison importante d'organelles souvent présentes au niveau du terminal présynaptique. Le complexe Milton-Miro fonctionne comme un adaptateur entre la kinésine-1 et les mitochondries pour soutenir le transport axonal des mitochondries. Dans la zone active, les mitochondries produisent non seulement de l'ATP, mais elles sont également impliquées dans certaines formes de plasticité synaptique à court terme en tant que tampon du calcium (Billups et Forsythe 2002 ; Levy et al. 2003 ; Tang et Zucker 1997 ; Yang et al. 2003).

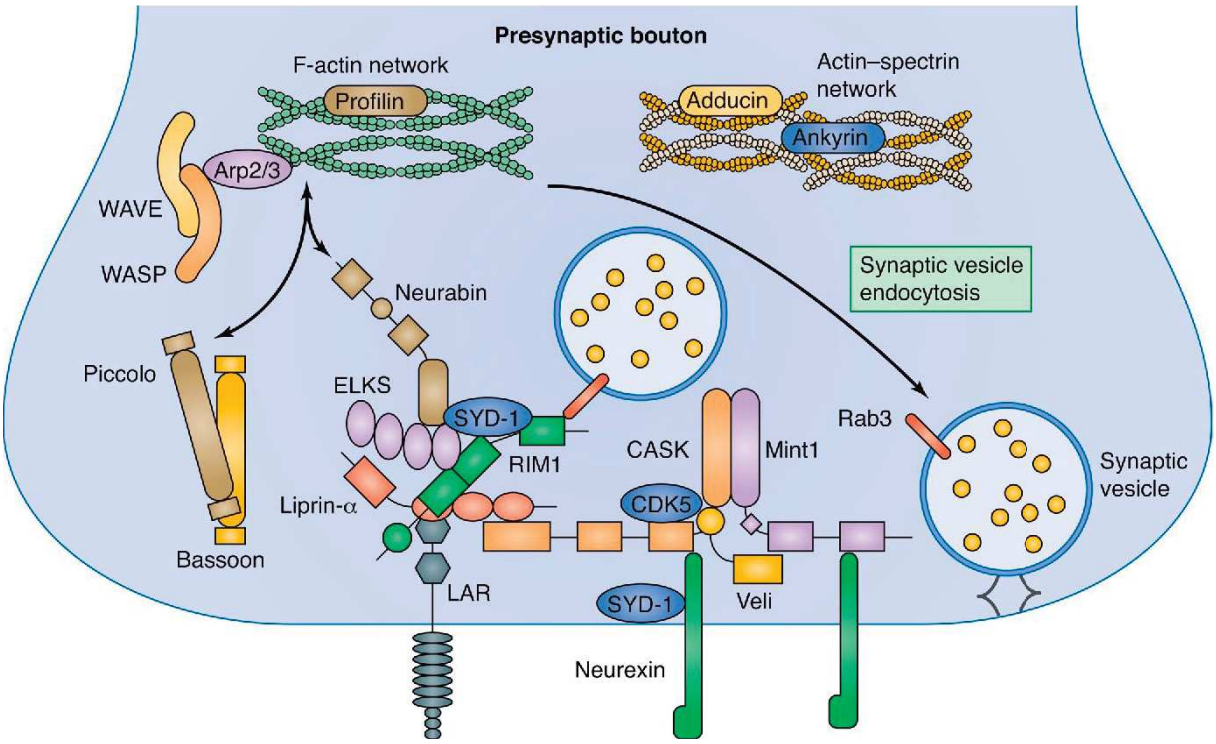


Figure 12 : Assemblage de la zone active présynaptique. Les protéines d'échafaudage, notamment Liprin, SYD-1, ELKS, Neurabin, Piccolo et Bassoon, forment un réseau protéique dense dans la cytomatrice présynaptique qui facilite l'amarrage et la fusion des vésicules synaptiques. Les réseaux présynaptiques de F-actine sont nécessaires à l'assemblage et à la maintenance présynaptiques (Chia, Li, et Shen, 2013).

Les mécanismes basés sur l'actine organisent souvent des complexes protéiques locaux dans des domaines subcellulaires. De nombreux travaux ont décrit le rôle du cytosquelette d'actine dans la structure et la fonction postsynaptique (Schubert et Dotti, 2007 ; Hotulainen et Hoogenraad, 2010). La F-actine est nécessaire à l'assemblage présynaptique pendant les premiers stades de la synaptogenèse. L'un des rôles proposés pour la F-actine est d'agir comme un échafaudage pour d'autres protéines présynaptiques (Sankaranarayanan et al., 2003). Bien que la F-actine puisse contribuer à initier le processus d'assemblage présynaptique, de nombreuses autres

interactions moléculaires sont nécessaires pour former l'appareil présynaptique mature. La zone active présynaptique est constituée d'un ensemble de protéines d'échafaudage qui fonctionnent comme des plaques tournantes de liaison protéique pour d'autres composants présynaptiques. Piccolo et Bassoon sont d'importantes protéines à multi-domaines de vertébrés qui ont traditionnellement été largement utilisées comme marqueurs de la zone active, car ces molécules ne sont pas nécessaires à la transmission synaptique mais affectent le regroupement des vésicules synaptiques (Figures 12 et 13) (Mukherjee et al., 2010). Les liprines sont également cruciales pour la formation de la pré-synapse. Au niveau de la pré-synapse, l'assemblage de complexe protéique organisé par de multiples protéines d'échafaudages jouent un rôle fondamental pour la spécificité fonctionnelle de cet élément.

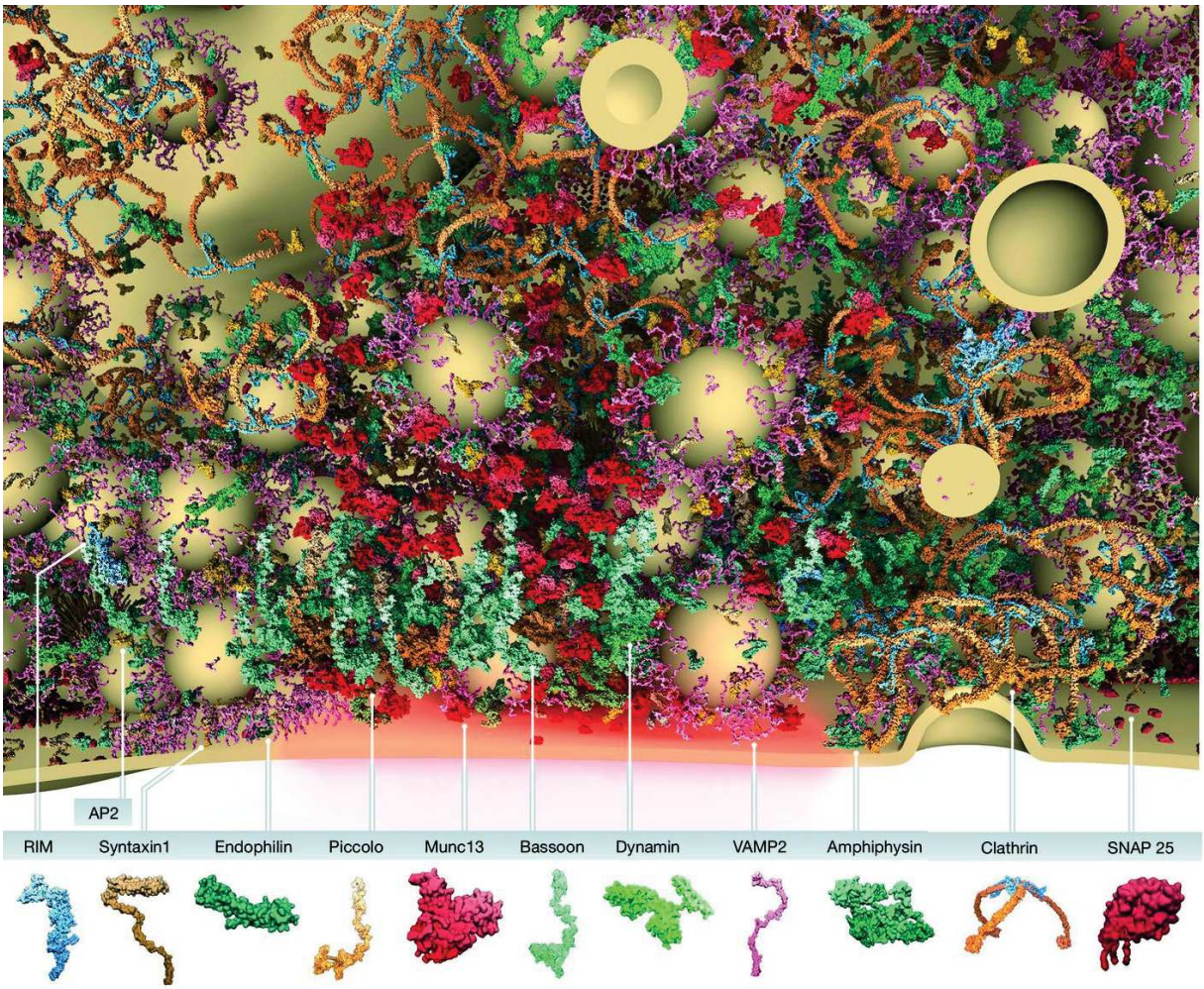


Figure 13 : Modèle d'organisation du bouton présynaptique et de la zone active. Une section à travers les zones actives d'une synapse de vertébré indiquant la distribution spatiale et le nombre de copies des protéines présynaptiques qui aident à définir la zone active présynaptique comme le site de l'exocytose des vésicules synaptiques et de l'endocytose médiée par la clathrine (Ackermann, Waites, et Garner, 2015).

2.3.2 Fonctionnement de la pré-synapse

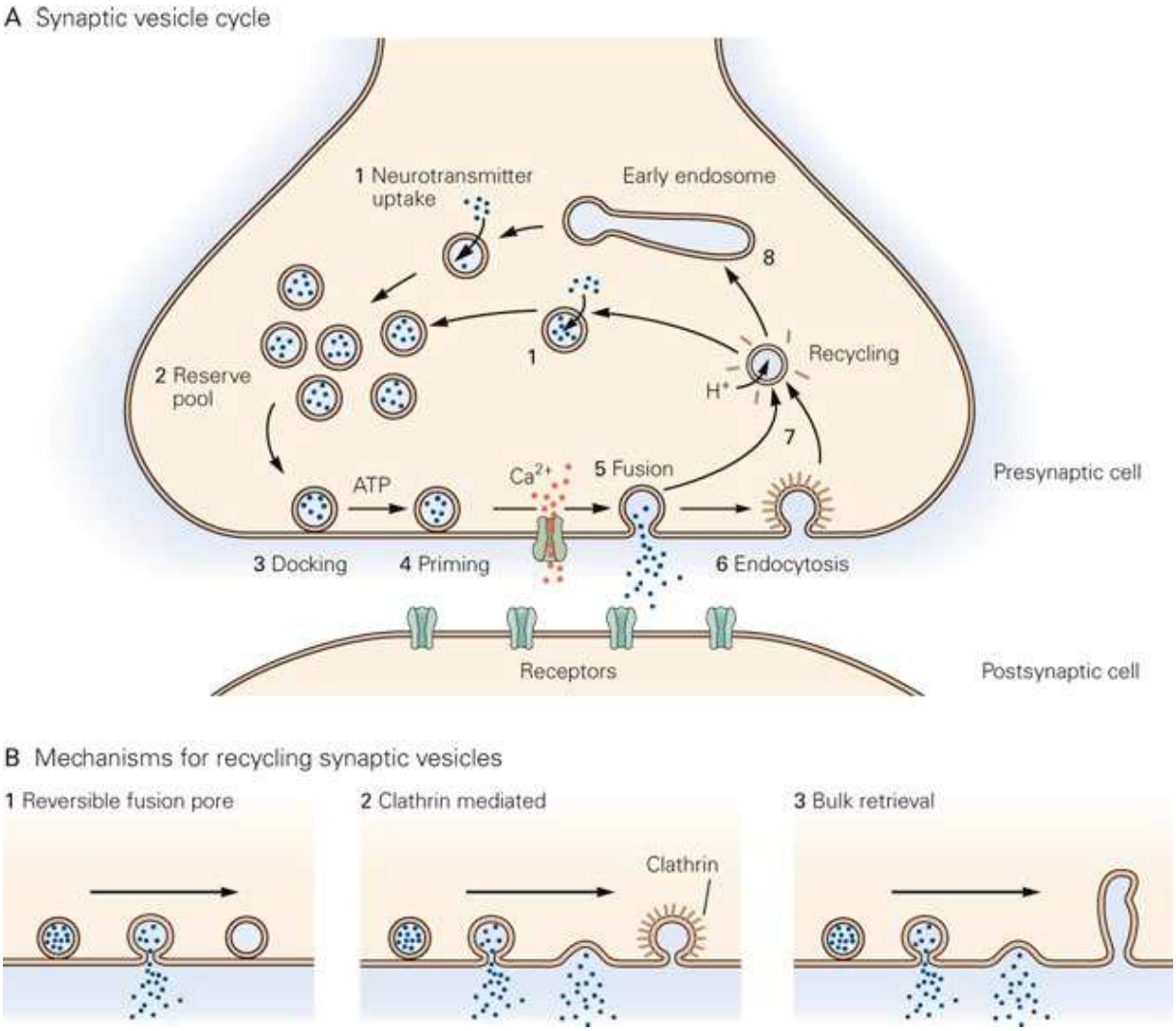


Figure 14 : Le cycle des vésicules synaptiques. (Volker et al., 2011)

Dans la synapse, la libération du neurotransmetteur est limitée à des compartiments spécialisés de la membrane présynaptique appelés zones actives. Dans ces régions denses en électrons de la membrane plasmique présynaptique, l'exocytose des vésicules synaptiques a lieu de manière hautement coordonnée dans le temps et l'espace. Généralement, seule une petite sous-population des 100 à 200 vésicules synaptiques d'une synapse est attachée et arrimée à la membrane plasmique au niveau de la zone active.

Les vésicules amarrées doivent arriver à maturité et atteindre un état de fusion compétente avant que leur fusion avec la membrane plasmique puisse être déclenchée par l'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca2þ.

La taille de ce pool de vésicules amorcées, qui détermine la fidélité et la capacité de signalisation d'une synapse, est étroitement régulée par des processus spécifiques à la zone active. En outre, les changements dynamiques de la taille du pool de vésicules amorcées constituent la base des propriétés adaptatives et plastiques des synapses, qui sont à leur tour essentielles pour de nombreux processus cérébraux complexes tels que l'adaptation sensorielle, la génération de rythmes, ou l'apprentissage et la mémoire (Rettig et Neher, 2002 ; Südhof, 1995 ; Brunger, 2000).

Pour assurer un fonctionnement fiable pendant les périodes d'activité synaptique continue, les synapses recyclent les neurotransmetteurs et autres éléments libérés d'une manière coordonnée et dépendante de l'activité. L'un des principaux processus de recyclage de la membrane des vésicules synaptiques est l’endocytose médiée par la clathrine. Ce processus a lieu dans les zones péri-synaptiques de la membrane plasmique présynaptique et il semble être couplé à un compartiment endosomal d'où partent les nouvelles vésicules synaptiques pour un nouveau cycle d'exocytose (Wucherpfennig, Wilsch-Bräuninger, et González-Gaitán, 2003). D'autres voies d'endocytose incluent le recyclage direct et la réutilisation des vésicules synaptiques par un mécanisme de type "kiss-and-run" ou "kiss-and-stay". Indépendamment du mécanisme sous-jacent, l'activité endocytotique dans les synapses semble être étroitement couplée à l'activité exocytotique dans les zones actives.

-Comparaison entre la pré-synapse inhibitrice et excitatrice :

La fonction de la pré-synapse est relativement similaire entre les deux types de synapses. Le principe d'exocytose des neurotransmetteurs ainsi que la recapture fonctionnent sur la même base. Les différences majeures relèvent d'abord du neurotransmetteur en lui-même. En dehors du neurotransmetteur, et de la machinerie impliquée dans sa synthèse, transport et recapture, la composition moléculaire de la pré-synapse est pour la majorité identique. Certaines différences notables se trouvent dans les protéines d'adhésion. Certaines molécules d'adhésion sont plus spécifiquement associées à la synapses excitatrice, comme LPH1 et Lasso, la N-Cadhérine, les Éphrines et leurs récepteurs et la famille des LRRTM (Chia, Li, et Shen, 2013). Nombre de protéines d'adhésion associées à la synapse excitatrice peuvent également se retrouver à la synapse inhibitrice, mais seulement une partie de ces protéines ont été identifiées comme ayant un rôle actif dans la synapse inhibitrice. Parmi celles-ci se trouve la Neuroligine 2, qui contrairement aux autres isoformes, joue un rôle prévalent dans la synapse inhibitrice notamment via son interaction avec la géphyrine (Poulopoulos et al., 2009). Le couple PTPδ et Slitrk3 régule spécifiquement la mise en place des synapses inhibitrices (Takahashi et al., 2012). Les SALM, notamment SALM5, bien qu'essentielle à la mise en place des synapses inhibitrices, joue un rôle moins important dans son organisation (Mah et al., 2010). En somme, bien que certains éléments de la pré-synapse soient similaires entre les synapses excitatrices et inhibitrices, il existe un nombre important de molécules variées ayant un rôle spécifique dans un des deux types de synapses, depuis la spécification jusqu'à l'organisation de la pré-synapse. Certaines molécules d'adhésion, par l'intermédiaire de partenaire d'interaction, impactent également la post-synapse.

2.4 - La post-synapse

La libération des neurotransmetteurs au niveau présynaptique va activer divers récepteurs localisés au niveau postsynaptique. L'organisation de ces récepteurs au niveau de la membrane postsynaptique est régulée par des protéines intracellulaires appelées protéines d'échafaudage.

- Comparaison entre la post-synapse excitatrice et inhibitrice :

Au niveau de la post-synapse, la différence entre synapses excitatrices et inhibitrices est encore plus flagrante qu'à la pré-synapse. Hormis S-SCAM, une isoforme de la famille des MAGUK, aucune des molécules d'échafaudage des synapses excitatrices n'a été trouvée dans les synapses inhibitrices. Outre cette spécificité, la diversité des protéines d'échafaudage des synapses excitatrices s'avère être largement supérieure par rapport à la synapse inhibitrice, où l'on retrouve l'unique protéine organisatrice qu'est la géphyrine. Cette différence est d'autant plus difficile à comprendre qu'elle ne se concilie pas avec la grande diversité des synapses inhibitrices, qui, au même titre que les synapses excitatrices, devraient nécessiter une variété de molécules d'échafaudage capable de supporter cette diversité.

2.4.1 - Les protéines d'adhésion

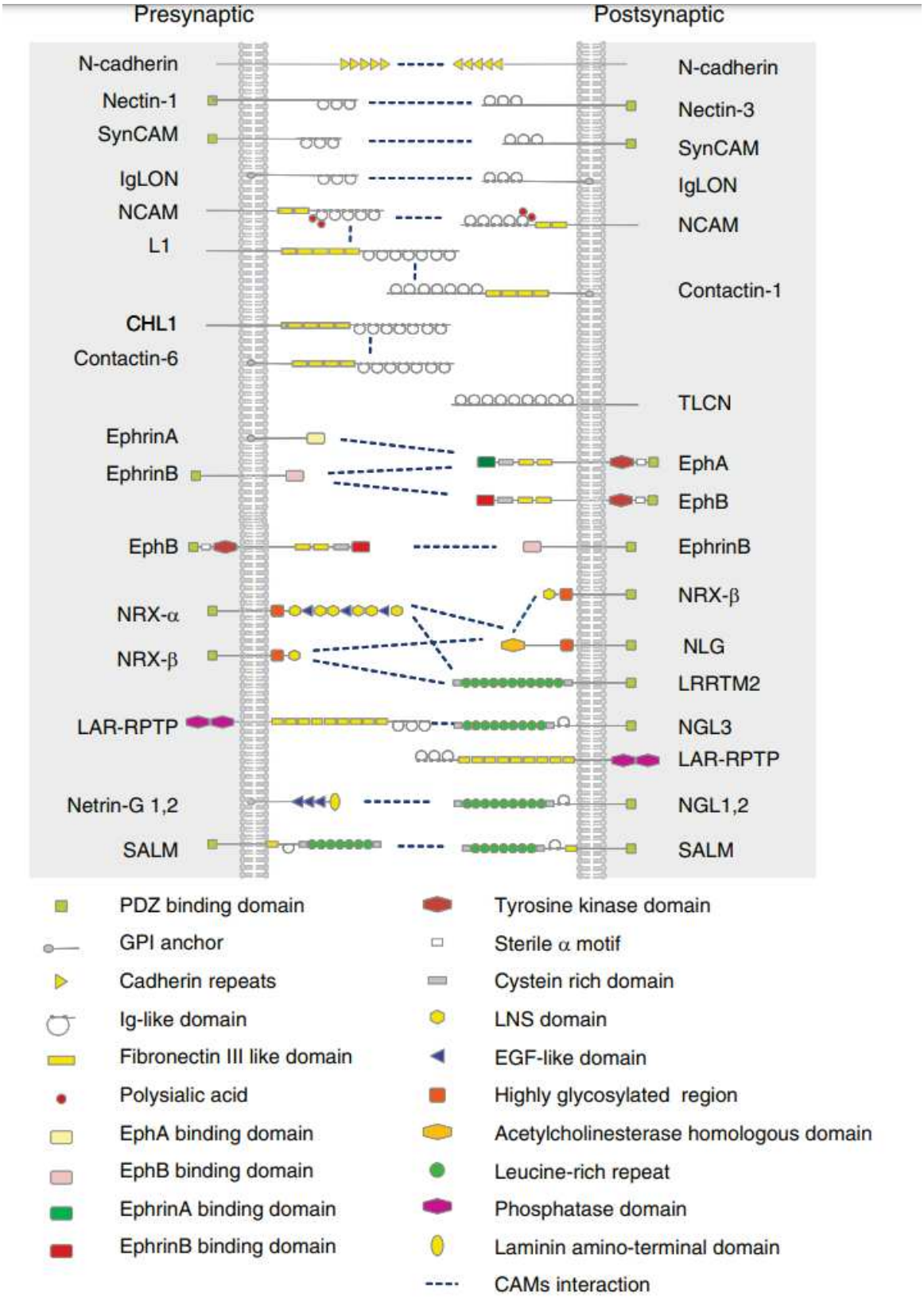


Figure 15 : Structure du domaine des CAMs synaptiques et schéma des interactions protéine-protéine entre les CAMs synaptiques exprimés sur les sites pré- et postsynaptiques. (Bukalo et al., 2012)

Dans le cerveau, les molécules d'adhésion cellulaire (CAM) permettent la reconnaissance cellule-cellule et sont responsables de la stabilisation mécanique des contacts synaptiques, ainsi que de l'organisation des synapses par l'assemblage de molécules de signalisation, de récepteurs de neurotransmetteurs et du cytosquelette d'actine. De nombreuses études indiquent que les CAM localisés au niveau synaptique ne sont pas seulement impliquées dans l'adhésion physique mais peuvent contrôler la formation des synapses, réguler la morphologie des épines dendritiques et modifier la fonction des récepteurs synaptiques en fonction de l'activité. Selon le type de CAM considéré, les paramètres tels que l'adhésion homo-ou hétérophile, la sensibilité au calcium et la localisation synaptique ou extra-synaptique diffère. Certaines CAM agissent spécifiquement dans différents processus, tels que la reconnaissance de domaines cibles spécifiques au sein d'un neurone, la différenciation synaptique, la stabilité synaptique et la plasticité synaptique.

2.4.1.1 - Les protéines d'adhésion des synapses excitatrices

- N-Cadhérine

Les cadhérines forment une grande superfamille de CAM Ca2+-dépendantes médiant des interactions principalement homophiles et sont regroupées en sous-familles de cadhérines classiques et de protocadhérines. La forte adhésion des cadhérines dépend de leur capacité à se dimériser en orientation cis, qui se lie ensuite en trans. La N-cadhérine, la cadhérine classique la plus étudiée, est exprimée au niveau des synapses excitatrices. Elle se localise

dans les zones actives des synapses en développement, et la maturation des synapses s'accompagne du regroupement de la N-cadhérine au niveau des jonctions puncta adherentia (PAJ), la région qui flanque la zone active (Benson et al. 1998 ; Tallafuss et al. 2010). Plusieurs sources de données indiquent que l'adhésion homophile de la N-cadhérine contribue à la stabilisation des synapses, tant au cours du développement précoce (formation des synapses) qu'à l'âge adulte (plasticité synaptique), en fournissant un support structurel au complexe synaptique et/ou en activant la signalisation intracellulaire qui régule la physiologie neuronale. L'adhésion médiée par la N-cadhérine n'est pas statique, mais peut être régulée en fonction de l'activité, soit par la dimérisation des molécules de N-cadhérine, soit par la redistribution de la N-cadhérine et de la b-caténine des tiges dendritiques aux épines (Murase et al. 2002 ; Tanaka et al. 2000 ; Yasuda et al. 2007). Par conséquent, en réponse à l'activité, les changements dans l'adhésion médiée par la N-cadhérine peuvent affecter la morphologie des épines dendritiques et la transmission synaptique. La stabilisation des épines par la N-cadhérine en fonction de l'activité a été démontrée, plus précisément, l'élargissement des épines associé au LTP et la stabilisation des épines induite par la plasticité dépendent de la N-cadhérine (Bozdagi et al. 2010 ; Mendez et al. 2010).

- NCAM

La molécule d'adhésion des cellules neurales (NCAM), membre de la famille des Ig-CAM, est exprimée à la fois sur la membrane pré- et postsynaptique, où elle peut interagir avec la NCAM et d'autres molécules membranaires en cis ou en trans. La NCAM régule la formation, la maturation et la fonction des synapses par des interactions homo- et hétérophiles. Au cours des

premiers stades de la formation des synapses, la NCAM est regroupée au niveau des contacts synaptiques naissants, où elle interagit avec la b1-spectrine, et recrute les organelles dérivées du réseau trans-golgi, transformant ces contacts en synapses fonctionnelles (Sytnyk et al. 2002). Au niveau de la pré-synapse, la NCAM est observée non seulement au niveau de la plaque terminale mais aussi dans la partie préterminale de l'axone, comme cela a été constaté précédemment dans les axones immatures (Polo-Parada et al. 2001). Une voie impliquant la NCAM, la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLCK), probablement la MLC (chaîne légère de la myosine) et la myosine II est nécessaire pour reconstituer les vésicules synaptiques pendant les niveaux élevés d'exocytose en facilitant l'acheminement par la myosine des vésicules synaptiques vers les zones actives pour une exocytose ultérieure (Polo-Parada et al. 2005).

- L1-CAM

La famille L1 des molécules d'adhésion des cellules neurales (L1-CAM) contient des récepteurs transmembranaires ayant des fonctions critiques dans le neurodéveloppement. Il a été démontré que le domaine intracellulaire L1 se lie aux protéines ankyrine, FERM et 14-3-3, ce qui suggère que L1 pourrait être impliqué dans l'organisation synaptique (Hortsch et al. 2009 ; Ramser et al. 2010). D’autres études indiquent qu’elle joue un rôle dans la densité des synapses péri-somatiques et dans la structure des terminaux synaptiques.

- Contactines

Les contactines sont des Ig-CAM liées au GPI qui exercent des activités de liaison hétérophiles, interagissant avec les membres des L1-CAM et les

composants de la matrice extracellulaire (Shimoda et Watanabe 2009). Des études de microscopie électronique ont détecté la contactine-1 comme un composant de la densité post-synaptique dans les cellules pyramidales CA1 (Murai et al. 2002). La contactine-1 semble jouer un rôle dans la LTD (dépression à long terme) dans les cellules pyramidales CA1. La contactine-6, connue pour être exprimée dans l'hippocampe et le cervelet, semble être impliquée dans le nombre de terminaux présynaptiques excitateurs formés dans ces régions (Sakurai et al. 2009).

- Nectines

Les nectines sont des Ig-CAM transmembranaires qui interagissent en trans, de manière indépendante du Ca2+, par l'intermédiaire de leurs domaines extracellulaires, entre elles ou avec d'autres Ig-CAM. Par l'intermédiaire de leur domaine PDZ, les nectines se lient à la protéine de liaison à l'actine afadine qui interagit avec α-caténine, ancrant ainsi les nectines au cytosquelette d'actine et au complexe d'adhésion cadhérine/caténine (Giagtzoglou et al. 2009). Au stade précoce du développement, le complexe nectine-1/afadine est présent à la fois dans les synapses excitatrices et inhibitrices (Benson et al. 1998 ; Lim et al. 2008). Cependant, après la maturation synaptique, la localisation de la nectine-1 est limitée aux synapses excitatrices (Benson et al. 1998 ; Lim et al. 2008). Des études sur culture hippocampique suggèrent le rôle des nectines dans la synaptogénèse notamment sur la taille et le nombres de synapses (Mizoguchi et al. 2002).

- SynCAM (Synaptic cell adhesion molecules)

Les SynCAM représentent une famille de quatre Ig-CAM transmembranaires indépendantes du Ca2+ qui sont exprimées

majoritairement dans tout le cerveau au niveau des neurones excitateurs et inhibiteurs (Thomas et al. 2008). Aux premiers stades du développement, SynCAM1 est impliqué dans la différenciation des synapses par contact (Stagi et al. 2010). Pendant la maturation des synapses, les protéines SynCAM sont enrichies dans les membranes plasmatiques pré- et postsynaptiques et sont engagées dans des interactions adhésives homo- et hétérophiles spécifiques (Biederer et al. 2002 ; Fogel et al. 2007).

- Ephrines et récepteurs Eph

Les récepteurs Eph représentent une famille de récepteurs à tyrosine kinase qui ont été divisés en deux sous-classes EphA et EphB. Les récepteurs EphA se lient à l'éphrine A ancrée au GPI, et les EphB se lient aux ligands transmembranaires de l'éphrine B. En raison de la capacité de signalisation des éphrines, la liaison Eph-éphrine entraîne une transduction bidirectionnelle du signal à la fois dans la cellule exprimant le récepteur (signalisation directe) et dans la cellule exprimant le ligand (signalisation inverse). Les Eph et les éphrines peuvent être exprimées soit au niveau de la membrane pré- et postsynaptique, ainsi que de manière extra synaptique ; l'expression d'EphA4 et d'Ephrine A3 ont également été détectées sur les astrocytes (Klein 2009). Plusieurs études indiquent que l'activation d'EphA par l'éphrine A est impliquée dans la rétraction des épines dans les neurones hippocampiques (Fu et al. 2007 ; Murai et al. 2003). L'activation de la signalisation EphB-ephrineB favorise la synaptogenèse excitatrice, comme cela a été démontré à la fois in vitro et in vivo pour EphB1-B3 et ephrinB1-B3 (Aoto et al. 2007 ; Bouzioukh et al. 2007 ; Henkemeyer et al. 2003 ; Kayser et al. 2008 ; Kayser et al. 2006 ; Penzes et al. 2003). La signalisation

EphB est également impliquée dans la régulation du trafic et de la fonction des récepteurs glutamatergiques.

- Neurexines et Neuroligines

Les neuroligines (NLG) constituent une famille de protéines d'adhésion cellulaire qui interagissent de manière trans-synaptique avec les neurexines (NRX) de manière Ca2+-dépendante. Quatre gènes de neuroligines (NLG1-4) et trois gènes de neurexines (NRX1-3) sont largement exprimés dans le cerveau des souris. In vitro, le rôle de l'interaction NLG-NRX semble être le contrôle de la formation de synapses excitatrices et inhibitrices (Chih et al. 2005 ; Dean et al. 2003 ; Graf et al. 2004). In vivo il semblerait que leur effet touche plutôt au recrutement de récepteurs à la post-synapse (Varoqueaux et al. 2006). De manière générale, les NLG et les NRX sont essentiels à la bonne maturation des synapses par la stabilisation des contacts synaptiques transitoires. Un autre aspect important du système d'adhésion NLG-NRX est sa capacité à déterminer la spécification des synapses excitatrices ou inhibitrices de manière dépendante de l'activité (Chubykin et al. 2007 ; Graf et al. 2004). La signalisation NLG-NRX participe à l'organisation présynaptique des synapses excitatrices et des synapses inhibitrices. Le domaine PDZ de NRXb interagit avec plusieurs protéines de la machinerie de libération synaptique, y compris les synapsines, CASK-Mint1, et CASK-caskin1, reliant NRXb au cytosquelette d'actine (Biederer and Sudhof 2001 ; Dean et al. 2003 ; Tabuchi et al. 2002).

- NGL (Netrin-G Ligand)

Les protéines NGL forment une famille de CAMs contenant des répétitions riches en leucine (LRR), qui compte trois membres : NGL-1, NGL-2 et

NGL-3. NGL-1 et NGL-2 se lient à la nétrine-G1 ou à la nétrine-G2 ancrée au GPI d'une manière isoforme spécifique (Kim et al. 2006), tandis que NGL-3 interagit avec les protéines de la famille des récepteurs tyrosine phosphatases (LAR-RPTP), y compris LAR, PTPs et PTPd (Kwon et al. 2010 ; Woo et al. 2009). Les NGL sont principalement détectés aux sites postsynaptiques des synapses excitatrices, où ils interagissent avec PSD-95 (Kim et al. 2006). Des études de surexpression et KO ont révélé le rôle des NGL dans la synaptogénèse. Le mécanisme semble reposer sur le fait que l'agrégation des NGLs à la surface des dendrites recrute des protéines postsynaptiques à la surface des dendrites, notamment les protéines d'échafaudage PSD-95, GKAP (Protéine Associée à la Guanylate Kinase) et Shank, mais pas la géphyrine (Kim et al. 2006 ; Woo et al. 2009).

- LRRTM (Leucine-Rich Repeat Transmembrane)

Les protéines LRRTM forment une famille de quatre récepteurs de surface cellulaire contenant des LRR (répétitions riches en leucine) qui sont enrichis dans la fraction PSD et qui sont exprimés de manière dynamique dans les systèmes nerveux en développement et adultes (Lauren et al. 2003). Bien que tous les LRRTM exprimés soient capables d'initier la formation de terminaux présynaptiques dans des neurones hippocampiques cultivés en coculture, LRRTM1 et LRRTM2 présentent l'activité synaptogène la plus élevée (Linhoff et al. 2009). Deux études indépendantes (de Wit et al. 2009 ; Ko et al. 2009) démontrent que NRXa1 et NRXb1 sont des récepteurs pour LRRTM2 et que les quatre LRRTMs peuvent se lier à NRXb1. Les NLG et les LRRTM semblent impliqués dans le recrutement des protéines présynaptiques Sassoon et synaptophysine aux terminaux présynaptiques, ce qui suggère que ces récepteurs fonctionnent de manière coopérative pour

favoriser le développement des synapses glutamatergiques (Siddiqui et al. 2010).

- SALM (Synaptic Adhesion-Like Molecules)

Les SALM sont des CAM transmembranaires contenant à la fois des domaines LRR et de type Ig dans leur région extracellulaire et un motif de liaison PDZ qui interagit avec PSD-95 à l'extrémité C-terminale. Les membres de la famille SALM régulent la formation des synapses excitatrices et inhibitrices par des mécanismes distincts. SALM1 via son domaine PDZ est capable de recruter les récepteurs NMDA (GluN1, GluN2B, et GluN2A) et PSD-95 à la membrane postsynaptique, mais pas les récepteurs AMPA (Wang et al. 2006). SALM2 est également impliqué dans la synaptogenèse excitatrice en régulant la différenciation et la fonction postsynaptiques, peut-être via le regroupement de PSD-95, GKAP, GluA1 et, dans une moindre mesure, GluN1 à la surface de la membrane postsynaptique (Ko et al. 2006).

2.4.1.2 - Les protéines d’adhésion des synapses inhibitrices

- Neuroligine et Neurexine

Le couple NLG-NRX a également la capacité à déterminer la spécification des synapses excitatrices ou inhibitrices (Chubykin et al. 2007 ; Graf et al. 2004). Nommés plus haut, les quatre membres de la famille des neuroligines chez la souris (NLG1, 2, 3 et 4) régulent chacun la fonction synaptique au niveau d'un sous-ensemble de synapses distinct, bien que se chevauchant partiellement. Un aspect clé de leur spécificité fonctionnelle provient de leurs effets différentiels sur les synapses excitatrices et les synapses

inhibitrices. La NLG2, identifiée pour la première fois en 1996, a la particularité d'être le seul membre de la famille à se localiser exclusivement dans les synapses inhibitrices.

Comme tous les membres de la famille des neuroligines, NLG2 est une protéine transmembranaire de type I avec un large domaine extracellulaire qui assure la liaison trans-synaptique aux neurexines présynaptiques ainsi que la dimérisation des neuroligines, un domaine transmembranaire α-hélicoïdal à passage unique, et un domaine intracellulaire qui agit comme une plaque tournante pour le recrutement des récepteurs de neurotransmetteurs et les voies de signalisation en aval

La structure cristalline du domaine extracellulaire de NLG2 révèle qu'il contient deux sites d'interaction primaires situés sur les côtés opposés de la molécule : un site de liaison à la neurexine et une interface de dimérisation de la neuroligine. Le site de liaison de la neurexine régule l'interaction avec le seul partenaire d'interaction présynaptique connu de NLG2, la famille des neurexines, des molécules d'adhésion présynaptique. Cette interaction est régulée par un code très complexe d'épissage alternatif, qui régit la localisation différentielle des neuroligines aux synapses glutamatergiques et GABAergiques. Les neurexines sont exprimées sous la forme d'une isoforme α longue et d'une isoforme β courte qui contiennent chacune plusieurs sites d'épissage alternatifs, dont le site d'épissage SS4, qui est localisé au niveau du site de liaison avec les neuroligines. Les α-neurexines et les SS4(+)-neurexines présentent une association plus forte avec la NLG2 et une localisation plus importante aux synapses GABAergiques que les β-neurexines et les SS4(-)-neurexines. De même, les membres de la famille des neuroligines contiennent deux sites d'épissage, A et B, qui ont des effets différentiels sur la localisation aux synapses GABAergiques. L'inclusion du

site d'épissage A et l'exclusion du site d'épissage B (qui n'est jamais présent dans la NLG2) favorisent la localisation aux synapses GABAergiques. Il est important de noter que ces interactions extracellulaires avec les neurexines sont les principaux déterminants de la localisation spécifique de NLG2 aux synapses inhibitrices et que les interactions du domaine intracellulaire sont nécessaires pour le recrutement ultérieur des composants postsynaptiques GABAergiques mais pas pour la localisation initiale de NLG2.

- SynCAM (Synaptic cell adhesion molecules)

Décrites plus haut, les SynCAM sont retrouvées au niveau des neurones excitateurs mais également dans les neurones inhibiteurs (Thomas et al. 2008). Au cours de la synaptogénèse dans le cervelet, SynCAM1, 2 et 4 se retrouvent colocalisés à GAD-67 uniquement dans les cellules de Purkinje mais pas dans les interneurones des couches moléculaire et granulaire interne, tandis que SynCAM 3 ne se retrouve que dans les cellules granulaires excitatrices (Thomas et al. 2008).

- SALM (Synaptic Adhesion-Like Molecules)

Les SALM régulent la formation des synapses excitatrices et inhibitrices par différents mécanismes. Alors que SALM1 et SALM2 sont essentielles seulement pour les synapses excitatrices, SALM3 et SALM5 sont impliquées à la fois dans les synapses excitatrices et inhibitrices, en induisant le regroupement des protéines présynaptiques, notamment les protéines marqueurs pré-synaptiques excitateurs et inhibiteurs VGluT et VGAT, la protéine vésiculaire présynaptique synaptophysine, et la protéine de la zone active présynaptique, Piccolo (Mah et al. 2010). En culture, alors

que les agrégats de SALM3 induisent un clustering de PSD-95, les agrégats de SALM5 n'ont aucun impact sur la géphyrine (Mah et al., 2010). Ceci indique que bien que certaines SALM soient nécessaires à la synaptogénèse inhibitrice, elles ne sont pas autant impliquées dans l'organisation de la synapse inhibitrice qu'elles le sont dans la synapse excitatrice.

-Ankyrine et L1-CAM

Les ankyrines comprennent trois membres : ankyrine-R, ankyrine-B et ankyrine-G. Ankyrine-B et -G ont été reconnues comme ayant un rôle dans la synapse. Des deux, l'ankyrine-G a été trouvée enrichie au niveau du segment initial de l'axone où elle joue le rôle d'organisateur, plusieurs protéines dépendent en effet de l'ankyrine-G pour leur agrégation dans l'AIS (Galiano et al., 2012 ; Nelson et Jenkins, 2017 ; Rasband, 2010). Une de ces protéines est la neurofascine, un membre de la famille des L1-CAM dont la fonction a été décrite plus haut. La neurofascine 186 a été impliquée dans le développement de l'innervation GABAergique des cellules de Purkinje cérébelleuses, et sa fonction dépend également de l'interaction avec l'ankyrine (Ango et al. 2004). Des études récentes ont suggéré des rôles importants pour les ankyrines également au niveau des synapses des dendrites neuronales (Smith et al., 2014 ; Tseng et al., 2015). Une isoforme (à 480kDa) de l'ankyrine-G est présente au niveau des synapses inhibitrices dans le compartiment somato-dendritique des neurones pyramidaux. L'ankyrine-G forme des agrégats qui s'associent aux GABAAR extra-synaptiques, ce qui suggère qu'elle n'est pas directement associée à la densité post-synaptique (Tseng et al., 2015). Sur le plan fonctionnel, il est supposé que ce pool d'ankyrine-G contribue à la stabilité des synapses GABAergiques en s'opposant à l'endocytose des GABAAR, via une

interaction avec GABARAP (GABAAR associated protein ; Tseng et al., 2015).

-Slitrk3 (Slit and NTRK-like family member 3) et PTPδ

Les membres de la famille Slitrk ont diverses fonctions dans l'établissement et la spécification des synapses, mais une étude a révélé que Slitrk3 pourrait être capable d'induire la différenciation en synapse inhibitrice. Cette même étude a démontré que Slitrk3 est capable de se lier au PTPδ présent dans la pré-synapse et induit ainsi l'accumulation de VGAT à la pré-synapse, induisant ainsi la différenciation en synapse inhibitrice (Takahashi et al., 2012). Avec NLG2, Slitrk3 s'avère à ce jour être la seule molécule d'adhésion capable d'influencer la différenciation de la pré-synapse vers l'inhibition.

-α/β Dystroglycane

Le dystroglycane a été la première macromolécule d'adhésion identifiée au niveau des synapses GABAergiques matures. Elle s'accumule aux sites synaptiques après l'arrivée de GAD, des GABAAR, et de la géphyrine (Kneussel et al., 1999 ; Lévi et al., 2002). Le dystroglycane est composé d'une sous-unité α extracellulaire et d'une sous-unité β transmembranaire. Le dystroglycane se lie à plusieurs molécules de la matrice extracellulaire telles que l'agrin, la laminine et le perlecan, et se lie en intracellulaire à la dystrophine et l'utrophine (Williamson et al., 1997). Le dystroglycane se lie également à deux protéines impliquées dans la synaptogénèse, l'agrin et la β-neurexin (Sugiyama, Bowen, et Hall, 1994 ; Sugita et al., 2001). Malgré le potentiel du dystroglycane en tant que protéine d'adhésion des synapses inhibitrices, des études ont montré que l'absence de cette protéine ne

perturbe pas la formation ni l'organisation des synapses inhibitrices (Williamson et al., 1997). Ces résultats suggèrent que le dystroglycane jouerait un rôle plus proéminent dans la maturation des contacts pour les synapses inhibitrices.

2.4.2 - Les récepteurs

Avant de s'intéresser aux différents types de récepteurs présents à la post-synapse excitatrice et inhibitrice, il est important de connaître les deux grands types de récepteurs et leur fonctionnement général.

Les récepteurs des neurotransmetteurs sont divisés en deux grandes classes : les récepteurs des canaux ioniques à libération par ligand (LGIC pour ligand-gated ion channel) et les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Les récepteurs LGIC sont des protéines spécialisées dans la transduction rapide du signal chimique du neurotransmetteur directement en une réponse électrique (Brunton et al. 2005 ; Kandel et al. 2000). Une partie de la protéine est spécialisée pour lier la molécule de neurotransmetteur. Ce site de liaison se trouve sur le côté extracellulaire de la protéine. La partie de la protéine qui est enfouie dans la membrane de la surface cellulaire forme un pore ionique, qui est en fait un trou rempli de fluide dans la membrane à travers lequel les ions chargés peuvent passer (les ions ne peuvent pas traverser les lipides ou d'autres constituants solides de la membrane). Le temps entre la liaison du neurotransmetteur et l'ouverture du pore ionique est de l'ordre de quelques microsecondes à quelques millisecondes. Ainsi, au niveau des synapses utilisant des canaux gérés par des ligands, le temps entre la dépolarisation du potentiel d'action de la borne de l'axone et le début du courant circulant dans le LGIC postsynaptique est de l'ordre de 1 à 2

millisecondes. Ce type de transmission synaptique produit une influence rapide et forte sur la fonction du neurone postsynaptique. Les réponses synaptiques médiées par les LGIC sont dites excitatrices ou inhibitrices, selon que leur effet net est de rendre plus ou moins probable le déclenchement d'un potentiel d'action par le neurone postsynaptique (Kandel et al. 2000). En général, la transmission synaptique excitatrice forte est médiée par les LGIC contenant un pore ionique qui permet aux cations de traverser la membrane. L'activation d'un tel récepteur entraîne principalement un afflux de sodium dans la cellule, ce qui provoque une dépolarisation du potentiel de la membrane, la rapprochant du seuil du potentiel d'action. La transmission synaptique inhibitrice rapide est généralement médiée par des récepteurs dont les canaux sont perméables aux anions chargés négativement. Lorsqu'ils sont activés, ces récepteurs hyperpolarisent le potentiel de la membrane et/ou fixent le potentiel de la membrane à des tensions inférieures au seuil du potentiel d'action. Les récepteurs ionotropiques comprennent les récepteurs GABAA, les récepteurs NMDA (N-methyl-D-aspartate) et AMPA (α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid), les récepteurs du kaïnate, les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine, le récepteur de la sérotonine 5-HT3.

Les RCPG sont des protéines spécialisées dans la liaison de la molécule de neurotransmetteur et dans la production subséquente de réactions biochimiques intracellulaires qui peuvent influencer diverses fonctions cellulaires (Brunton et al. 2005 ; Kandel et al. 2000). Les protéines des RCPG se lient directement à de petites protéines intracellulaires, appelées protéines G, comme leur nom l'indique. Les protéines G sont ainsi nommées

car elles peuvent lier les nucléotides GTP (Guanosine triphosphate) et GDP (Guanosine diphosphate). Lorsqu'un neurotransmetteur se lie au récepteur, l'échange du GTP contre le GDP du côté intracellulaire de la protéine est accéléré, ce qui entraîne la séparation de la protéine G en deux parties (les sous-unités α et β/γ), qui se dissocient de la protéine réceptrice. Les sous-unités α- et β/γ libérées sont alors libres d'interagir avec différentes protéines à l'intérieur de la cellule. Les deux types de sous-unités peuvent agir sur des protéines effectrices pour modifier la biochimie, la physiologie et l'expression génétique cellulaires. Un exemple notable, la sous-unité αS se lie à une protéine enzymatique appelée adénylyl cyclase et l'active. La fonction de l'adénylyl cyclase est de convertir la molécule d'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine monophosphate cyclique (AMPc), et l'AMPc résultant peut agir sur des enzymes qui modifient la fonction des protéines cellulaires par un mécanisme appelé phosphorylation. Dans un autre exemple, les sous-unités β/γ libres peuvent se lier directement à un type de canal ionique qui permet sélectivement un flux de potassium à travers la membrane neuronale et l'activer (le canal potassique rectifiant vers l'intérieur étant activé par la protéine G [GIRK]). L'activation de cette voie Gβ/γ-GIRK produira une inhibition neuronale, bien que sur une échelle de temps plus lente que celle produite par les LGICs inhibiteurs. En général, les réponses produites par les RCPG sont plus lentes et plus durables que celles produites par les LGIC, car plusieurs étapes moléculaires sont nécessaires pour passer de la protéine réceptrice à l'effecteur final (contrairement à la signalisation intra-protéique directe dans les LGIC). Les effets des RCPG sur la physiologie neuronale sont aussi souvent plus subtils que ceux produits par les LGIC car ils n'activent généralement pas directement les courants ioniques dans les neurones. Ainsi, la transmission synaptique

médiée par les RCPG est souvent qualifiée de neuromodulatrice. Les récepteurs métabotropiques comprennent les récepteurs adrénergiques, les récepteurs de la dopamine, les récepteurs GABAB, les récepteurs mGluR, les récepteurs de l'histamine, les récepteurs muscariniques de l'acétylcholine, les récepteurs aux opioïdes, les autres récepteurs sérotoninergiques (excepté 5-HT3).

2.4.2.1 - Les récepteurs des synapses excitatrices

Il existe de nombreux types de récepteurs au glutamate qui peuvent se ranger dans les deux catégories décrites plus haut, ionotropique et métabotropique. Les récepteurs ionotropiques du glutamate regroupent les canaux ioniques qui s'activent et s'ouvrent lorsque le glutamate se lie au récepteur. Les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR) agissent sur la cellule par le biais d'une cascade de transduction du signal. Ils peuvent être principalement activateurs (mGlur1/5) ou principalement inhibiteurs (mGlur2/3 et mGlur4/6/7/8).

-Les récepteurs ionotropiques du glutamate

-Récepteurs NMDA

Les récepteurs NMDA existent principalement dans la membrane postsynaptique, mais sont également exprimés dans les membranes pré-synaptiques. Les récepteurs NMDA fonctionnels sont constitués de deux sous-unités GluN1 et de deux sous-unités GluN2 ou d'une combinaison de sous-unités GluN2 et GluN3. Ils ont besoin de glycine ou de D-sérine

comme co-agoniste pour être activés. Dans la transmission synaptique, l'activation des récepteurs NMDA est lente et prolongée en raison de la nécessité d'une dépolarisation de la membrane, en plus des cinétiques d'activation et de désensibilisation plus lentes. Ainsi, le canal du récepteur NMDA possède un mécanisme complexe contrôlant l'activité du récepteur, ce qui suggère qu'il pourrait avoir une fonction physiologique différente de celle du récepteur AMPA.

-Récepteurs AMPA

Les récepteurs AMPA sont directement activés par la liaison du glutamate ; aucun autre ligand endogène n'a été découvert à ce jour. Ils sont principalement exprimés à la membrane neuronale postsynaptique et jouent un rôle dans la neurotransmission excitatrice rapide dans le réseau neuronal. Les récepteurs AMPA sont des tétramères composés de quatre types de sous-unités (GluA1 à GluA4), et peuvent être homo- ou hétéro-tétramériques. La sous-unité GluA2 est le déterminant de la perméabilité au calcium ; les récepteurs AMPA imperméables au calcium contenant GluA2 sont principalement exprimés dans les neurones de projection excitateurs, tandis que les récepteurs AMPA perméables au calcium (dépourvus de la sous-unité GluA2) sont principalement exprimés dans les interneurones inhibiteurs.

-Les récepteurs métabotropiques du glutamate

Les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR) sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) de la famille C qui, après stimulation, favorisent le découplage G, entraînant des augmentations des niveaux de seconds messagers intracellulaires médiées par G, la régulation des canaux

ioniques, ainsi que la stimulation de voies indépendantes des protéines G. Les mGluR forment des dimères constitutifs composés de deux sous-unités réticulées par un pont disulfure et la formation du dimère est cruciale pour la fonction des mGluR. Jusqu'à présent, huit sous-types de mGluR ont été identifiés et caractérisés et sont divisés en trois sous-groupes sur la base de l'homologie de séquence et de l'activation de la signalisation cellulaire.
mGluR1 et mGluR5 font partie du groupe I des mGluRs et se couplent à Gq/11, favorisant la libération de Ca2+ des réserves intracellulaires. mGluR2 et mGluR3 appartiennent au groupe II et mGluR4, mGluR6, mGluR7 et mGluR8 font partie du groupe III des mGluRs. Les mGluRs des groupes II et III régulent négativement l'adénylyl cyclase via Gi et sont principalement localisés en présynaptique, agissant comme des autorécepteurs pour inhiber la libération de glutamate ou d'acide gamma-aminobutyrique (GABA). Les mGluRs du groupe I sont principalement localisés au niveau des éléments post-synaptiques dans une zone péri-synaptique entourant les récepteurs ionotropiques, où ils ont pour fonction de moduler l'excitabilité neuronale.

2.4.2.2 - Les récepteurs des synapses inhibitrices

- Les récepteurs GABAergiques :
Il existe deux types de récepteurs GABAergiques. Les récepteurs GABAA sont des canaux ionotropiques et les récepteurs GABAB sont des récepteurs métabotropiques. Les récepteurs GABAA s’ouvrent sous l’effet du GABA permettant un passage d’ions chlorure entraînant une hyperpolarisation du neurone cible. Les récepteurs GABAA sont les principaux récepteurs de

neurotransmetteurs inhibiteurs dans le cerveau des mammifères. Chaque isoforme est constituée de cinq sous-unités homologues ou identiques entourant un canal central sélectif des ions chlorure déclenché par le GABA. Les récepteurs GABAA, situés dans la membrane postsynaptique assurent l'inhibition neuronale à l'échelle de la milliseconde ; ceux situés dans la membrane extra-synaptique répondent au GABA ambiant et confèrent une inhibition à long terme. Les récepteurs GABAA sont sensibles à une grande variété de médicaments, comme les benzodiazépines, qui sont souvent utilisés pour leurs effets sédatifs/hypnotiques et anxiolytiques.

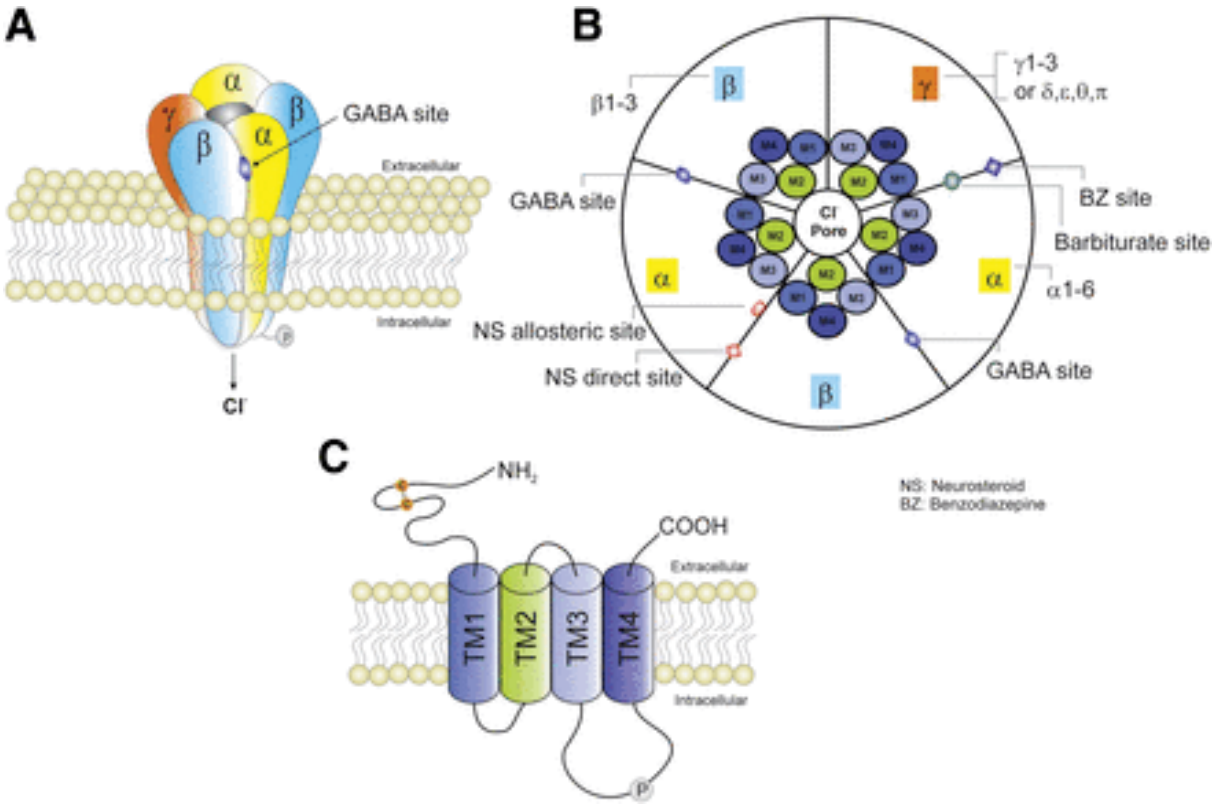


Figure 16 : Représentation schématique de la structure typique des récepteurs GABA-A et de la composition des sous-unités. (A) Les GABA-AR sont des hétéro-pentamères formant un canal perméable au passage des ions chlorure. (B) Une vue de dessus du pentamère. Les GABA-AR sont fabriqués à partir d'un répertoire de 19 sous-unités connues : α1-6, β1-3, γ1-3, δ, ε, θ, π et ρ1-

3. Les sites de liaison du GABA sont situés à la jonction entre les sous-unités α et β, tandis que les benzodiazépines (BZ) se fixent à l'interface entre les sous-unités α et γ. Les neurostéroïdes (NS) ont deux sites de liaison putatifs. (C) Les GABA-AR appartiennent à la famille Cys-loop des canaux ioniques dépendant des ligands (Chuang et Reddy, 2018).

Structure des récepteurs GABAA

Les récepteurs GABAA sont des protéines comportant plusieurs sous-unités. Les sous-unités ont une longueur de 450 résidus d'acides aminés et partagent une organisation topologique commune. Environ la moitié de la sous-unité consiste en un domaine extracellulaire hydrophile N-terminal contenant la boucle Cys, suivi de quatre séquences transmembranaires (M1-M4). M2 délimite le canal ionique. Entre M3 et M4 se trouve une grande boucle intracellulaire impliquée dans la modulation par phosphorylation. Un certain nombre de protéines étudiées interagissent avec la boucle intracellulaire entre M3 et M4 des certaines sous-unités spécifiques des récepteurs GABAA (Chen et Olsen, 2007 ; Jacob, Moss, et Jurd, 2008). Il a été démontré que ces protéines jouent un rôle important dans le trafic des récepteurs, leur liaison avec le cytosquelette et leur ancrage dans la membrane postsynaptique. Les extrémités N et C des sous-unités sont toutes deux situées à l'extérieur des cellules. Les mêmes sous-unités contribuant à la formation des canaux peuvent être disposées différemment. Alors que les sous-unités alpha et bêta semblent se combiner dans des arrangements de sous-unités définis (Tretter et al., 1997 ; Baumann, Baur, et Sigel, 2002 ; Baur, Minier, et Sigel, 2006), les sous-unités epsilon et gamma semblent avoir des propriétés d'assemblage différentes (Bollan et al., 2008 ; Kaur, Baur, et Sigel, 2009 ; Baur, Kaur, et Sigel, 2009). Les propriétés

fonctionnelles des récepteurs dépendent à la fois de la composition des sous-unités (Sigel et al., 1990) et de leur agencement (Minier et Sigel, 2004).

Mécanisme et modulation des récepteurs GABAA

Dans un premier temps, l'agoniste GABA se lie à ses deux sites de liaison situés aux interfaces des sous-unités alpha/beta, qui présentent des affinités apparentes légèrement différentes pour l'ouverture du canal (Baumann, Baur, et Sigel, 2003). L'occupation du site agoniste est ensuite suivie d'un changement de conformation qui verrouille l'agoniste dans la poche de liaison (Wagner et Czajkowski, 2001). La protéine modifie sa conformation et entre dans un ou plusieurs états fermés appelés "flipped states" (Lape, Colquhoun, et Sivilotti, 2008). D'autres changements de conformation conduisent à l'ouverture du pore ionique.

Les récepteurs GABAA sont également soumis à des modifications post-traductionnelles, notamment des phosphorylations par différentes protéines kinases qui modifient leur activité, leur stabilité à la membrane ou leur transport (Kittler et Moss, 2011). Outre ces modifications, le récepteur est sensible à un large panel de molécules exogènes (Sieghart, 1995). Les exemples courants sont les benzodiazépines, barbituriques, la bicuculline, un antagoniste compétitif et la picrotoxine qui bloque le canal.

- Les récepteurs glycinergiques

Les récepteurs glycinergiques (GlyR) sont des canaux ioniques à médiation par ligand (LGIC) du groupe I qui appartiennent à la famille des récepteurs à boucle Cys. Ils s’ouvrent sous l’effet de la glycine et permettent un échange d’ions chlorures. Ils sont plus particulièrement représentés dans le tronc cérébral et la moelle épinière mais se retrouvent dans tout le SNC.

Structure des GlyR

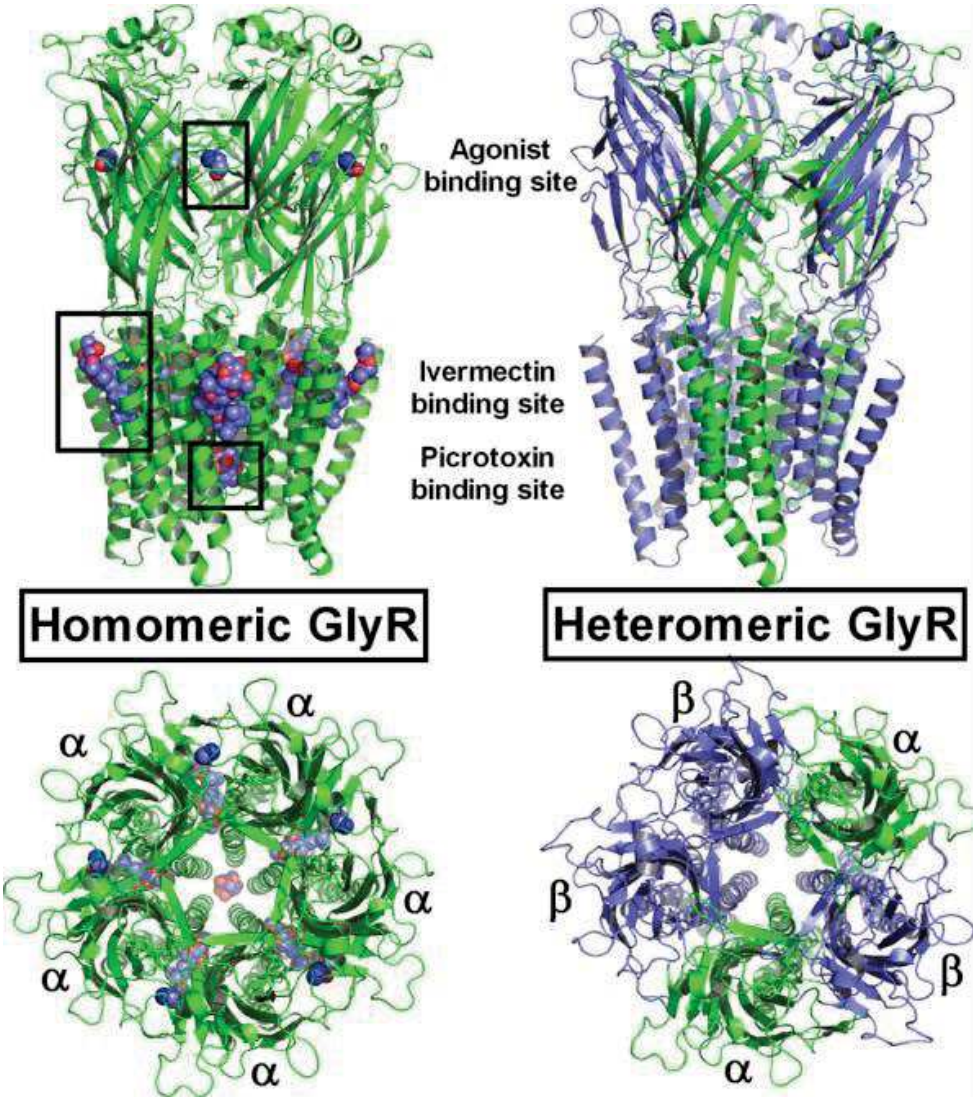


Figure 17 : Structures des 1-GlyR homomères et 1-GlyR hétéromères modélisées. À gauche, 1-GlyR représenté avec cinq molécules de glycine et d'ivermectine chacune et une seule molécule de picrotoxine liée (ligands représentés par des sphères de van der Waals). À droite, 1 -GlyR hétéromère non lié avec les différentes interfaces indiquées (Dutertre, Becker, et Betz, 2012).

Des expériences de cross-linking ont révélé que ces récepteurs sont hétéropentamériques, et les préparations de GlyR purifiées par affinité montrent qu'ils sont composés de deux sous-unités (Pfeiffer, Graham, et Betz, 1982) : les sous-unités GlyRα (48 kDa) et GlyRβ (58 kDa). La stœchiométrie des sous-unités, précédemment établie comme 3 alpha et 2 beta (Langosch, Thomas, et Betz, 1988 ; Burzomato et al., 2003) a été révisée et serait plutôt 2 alpha et 3 beta (Grudzinska et al., 2005 ; Yang et al., 2012). Quatre sous-unités alpha codées par quatre gènes différents et une seule sous-unité beta ont été découvertes (Grenningloh et al., 1990 ; Grenningloh et al., 1987 ; Grenningloh et al., 1990 ; Kuhse, Schmieden, et Betz, 1990 ; Matzenbach et al., 1994). Par marquage de photo-affinité avec la [3H]strychnine, il a été démontré que les sous-unités GlyRα possèdent des domaines nécessaires à la liaison au ligand (Graham, Pfeiffer, et Betz, 1983). GlyRβ présente des différences de séquence significatives par rapport aux sous-unités α (<50% d'identité), et bien que contrairement aux sous-unités alpha, elle ne peut former de récepteurs fonctionnels à elle-seule, la sous-unité GlyRβ est plus qu'une simple sous-unité structurelle car elle contribue à la liaison agoniste (Grudzinska et al., 2005) et joue un rôle essentiel dans le trafic intracellulaire et le regroupement synaptique des GlyR postsynaptiques (Kneussel et Betz, 2000 ; Maas et al., 2006). Sa boucle cytoplasmique se lie à la géphyrine avec une grande affinité (Kneussel et Betz, 2000 ; Grenningloh et al., 1990) et interagit avec Vps35 et la neurobeachine, des protéines impliquées dans le transport intracellulaire des protéines membranaires (del Pino et al., 2011). Comme toutes les protéines du groupe LGIC I, les sous-unités des GlyR contiennent un grand domaine extracellulaire N-terminal, quatre segments transmembranaires (TM1-TM4), une longue boucle intracellulaire reliant TM3 et TM4, et une courte

terminaison C extracellulaire. Les homologies de séquence sont particulièrement élevées au sein des segments transmembranaires et d'un motif conservé à liaison disulfure de 15 acides aminés (boucle Cys) situé dans le domaine extracellulaire. Bien que le nombre de gènes de sous-unités GlyR semble être modeste par rapport à ceux trouvés dans les familles de mammifères nAChR (n = 17) et GABAAR (n = 20), l'épissage alternatif des exons codant pour des segments des régions extracellulaires N-terminales ou de la boucle intracellulaire étend encore l'hétérogénéité des sous-unités GlyR (Betz et Laube, 2006 ; Lynch, 2004 ; Oertel et al., 2007). Dans le cas de GlyRα2, il a été démontré que les variants d'épissage dans le domaine extracellulaire diffèrent dans les efficacités agonistes (Miller, Harvey, et Smart, 2004), et il a été constaté que les variantes de la boucle intracellulaire de GlyRα3 diffèrent dans la désensibilisation du récepteur (Nikolic et al., 1998) et le ciblage subcellulaire (Melzer et al., 2010). En outre, les modifications post-transcriptionnelle d'une fraction mineure de l'ARNm GlyRα3 à une seule position nucléotidique a été signalée comme entraînant un gain de fonction du récepteur (Meier et al., 2005).

Fonction et modulation

Les agonistes et les antagonistes compétitifs sont connus pour se lier au DEC au niveau de l'interface entre deux sous-unités adjacentes (Betz et Laube, 2006 ; Lynch, 2004 ; Corringer, Le Novère, et Changeux, 2000). La poche de liaison GlyR est formée par des régions en boucle distinctes des surfaces de la sous-unité principale et complémentaire. Les résidus dont la substitution affecte la liaison agoniste et antagoniste ont été identifiés dans les boucles D, B, E et C (Betz et Laube, 2006 ; Lynch, 2004 ; Laube et al., 2002). De plus, le lien disulfure entre α1Cys-198 et α1Cys-209 contraignant

la boucle C semble être critique à la fois pour l'expression du récepteur à la surface cellulaire et la liaison du ligand (Rajendra et al., 1995). L'ancrage de l'agoniste glycine et de l'antagoniste strychnine dans des modèles d'homologie des interfaces α1-α1 et α1-β a donné lieu à des structures complexes qui s'accordent avec les données mutationnelles précédentes (Grudzinska et al., 2005). Le domaine extracellulaire des GlyR lie non seulement des agonistes et des antagonistes compétitifs, mais aussi des composés qui modulent de manière allostérique les réponses agonistes de différents LGIC. Les neurostéroïdes, les anesthésiques généraux et l'éthanol potentialisent les courants GlyR, tandis que le cation divalent Zn2+, les tropéines et les cannabinoïdes endogènes, tels que l'anandamide et le 2-arachidonylglycérol, ont à la fois des effets potentialisateurs (à faible concentration) et inhibiteurs (à forte concentration). En revanche, les modulateurs hydrophobes, tels que les neurostéroïdes et les endocannabinoïdes (Miller, Da Silva, et Smart, 2005) ainsi que les anesthésiques et l'éthanol (Mihic et al., 1997), semblent tous agir en se liant au domaine transmembranaire, bien que des résidus situés dans le domaine extracellulaire et/ou la grande boucle intracellulaire puissent également contribuer à la modulation du courant (Perkins et al., 2010 ; Yévenes et Zeilhofer, 2011). De plus, il a été rapporté que le glutamate, le principal transmetteur excitateur, potentialisait de manière allostérique les GlyR natifs et recombinants ; ceci peut être important pour équilibrer l'excitation et l'inhibition dans le SNC (Liu, Wu, et Wang, 2010).

La liaison d'un agoniste au domaine extracellulaire des GlyRs déclenche l'ouverture du canal sélectif des anions qui traverse la membrane plasmique.

Le canal GlyR est bloqué par un certain nombre d'antagonistes non compétitifs, tels que la picrotoxine, le ginkgolide B et le borate de cyanotriphényle (Betz et Laube, 2006 ; Lynch, 2004).

2.4.3 - Les protéines d'échafaudage

Les protéines d'échafaudage jouent un rôle central dans l'assemblage physique de différents composants moléculaires sur des sites pertinents. Dans les neurones, les protéines d'échafaudage sont des composants abondants et essentiels de la densité postsynaptique. Elles jouent un rôle majeur dans de nombreuses fonctions synaptiques, notamment le trafic, l'ancrage et le regroupement des récepteurs et des molécules d'adhésion. Elles relient les récepteurs à des protéines de signalisation en aval et régulent la dynamique des structures cytosquelettiques (Verpelli et al., 2012). Plus spécifiquement, elles assurent l'accumulation précise de récepteurs en aval des sites de libération présynaptiques, une apposition qui est nécessaire pour une transmission synaptique fonctionnelle. Les protéines d'échafaudage interagissent également avec les éléments d'ancrage cytosquelettiques pour fournir une plate-forme physique permettant de maintenir les récepteurs aux synapses, et régulent les voies de signalisation en aval pour ajuster la composition moléculaire des composants post-synaptiques en fonction des besoins (plasticité, potentialisation à long terme : LTP).

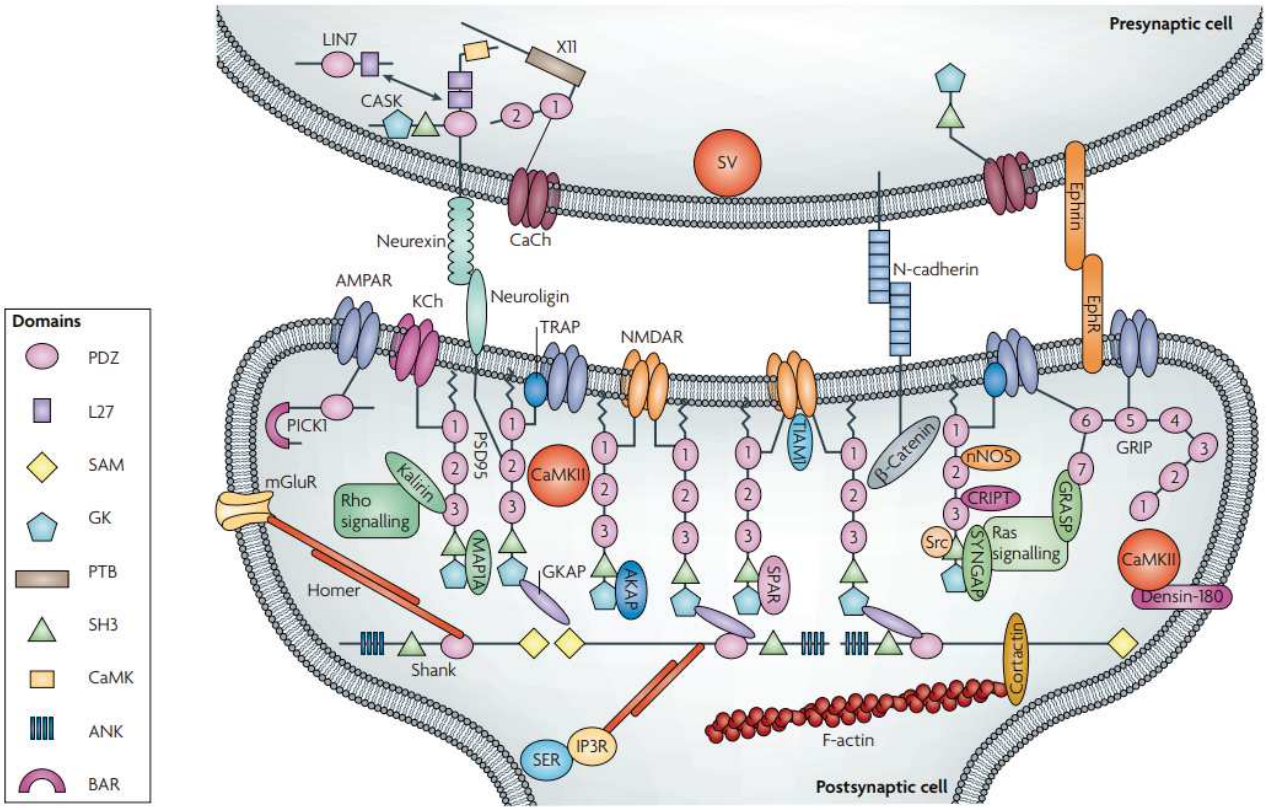


Figure 18 : Organisation des complexes protéiques dans la densité postsynaptique (PSD). Les protéines de la famille Shank forment un réseau protéique à deux couches sous la membrane postsynaptique, qui est ponté par la protéine associée à la guanylate kinase (GKAP). Les domaines de PSD95 et de Shank (PDZ, SH3, guanylate kinase (GK), motif stérile-alpha (SAM) et répétitions d'ankyrine (ANK)) sont représentés ; les autres protéines sont représentées par des formes simples et sont légendées. AKAP, adenylate-kinase anchoring protein; CRIPT, cysteine-rich PDZ-binding protein; GKAP, guanylate kinase-associated protein; GRASP, GRIP-associated protein; GRIP, glutamate receptor interacting protein; IP3R, inositol-1,4,5-trisphosphate receptor; MAP1A, microtubule-associated protein 1A; nNOS, neuronal nitric oxide synthase; PICK1, protein interacting with PRKCA1; SER, smooth endoplasmic reticulum; SPAR, spine-associated RAPGAP; SV, vésicule synaptique; SyNGAP, synaptic Ras GTPase-activating protein; TIAM1, T-cell lymphoma invasion and metastasis 1; TRAP, C-terminal receptor-binding region (Feng et Zhang, 2009).

2.4.3.1 - Les protéines d'échafaudage des synapses excitatrices

- MAGUK (Membrane-Associated Guanylate Kinase)

Des études génétiques et biochimiques menées au cours des 20 dernières années ont permis d'identifier les guanylate kinases associées à la membrane (MAGUK), comme des molécules d'échafaudage ubiquitaires concentrées sur les sites de contact cellule-cellule tels que les synapses (Craven et Bredt 1998 ; Kornau et al. 1997 ; Sheng et Sala 2001 ; Sheng et Kim 2002). Les membres de MAGUK incluent SAP90/PSD-95, SAP102, SAP97, Chapsyn 110/PSD93, et p55 (SAP ¼ synapse-associated protein). Ils représentent une superfamille de protéines multi domaines qui sont liées par la présence d'un ensemble partagé de domaines structurels. Elles partagent une région homologue à la guanylate kinase de la levure qui est cependant inactive (Olsen et Bredt 2003). Elle est toujours accompagnée soit d'un domaine SH3 (homologie 3 de Src) précédent, soit suivie de près par un motif WW (deux résidus Trypsine conservés). En outre, les MAGUK contiennent toujours des domaines PDZ (PSD-95/DLG/ZO-1). Tous ces domaines sont impliqués dans les interactions protéiques.

Ils sont localisés au niveau des synapses glutamatergiques (Garner et al. 2000 ; Aoki et al. 2001) ainsi qu'au niveau des synapses cholinergiques (Conroy et al. 2003). Il a été établi que les PSD-MAGUK sont des organisateurs centraux des synapses du système nerveux central des vertébrés. Elles sont, en fait, des protéines d'échafaudage clés qui déterminent l'état d'équilibre ainsi que les changements dépendants de l'activité du nombre de récepteurs du glutamate dans les synapses excitatrices (Elias et Nicoll 2007).

- ProSAP/Shank (proline-rich synapse-associated protein/SH3 domain with Ankyrin repeats)

La famille ProSAP/Shank des protéines d'échafaudage est composée de trois membres, tous fortement enrichis dans le PSD et localisés à l'interface entre les récepteurs membranaires et les éléments du cytosquelette : Shank1, ProSAP1/Shank2, et ProSAP2/Shank3 (Boeckers et al. 1999 ; Naisbitt et al. 1999 ; Yao et al. 1999). Ces molécules contiennent plusieurs domaines qui sont essentiels pour diverses interactions protéine-protéine au sein du PSD : des répétitions ankyrine N-terminales, un domaine SH3, un domaine PDZ, un domaine riche en proline et un domaine de motif alpha stérile (SAM). Situés sous la membrane postsynaptique, les échafaudages ProSAP/Shank sont principalement impliqués dans le recrutement, le regroupement et le couplage fonctionnel de protéines transmembranaires comme les récepteurs post-synaptiques du glutamate. L'interaction dynamique de l'échafaudage protéique ProSAP/Shank avec le cytosquelette de l'épine dendritique se fait par l'intermédiaire de protéines (a-fodrine, cortactine, Abp1, SPIN90) directement attachées ou indirectement impliquées dans la régulation de l'actine (Du et al. 1998 ; Boeckers et al. 1999 ; Bockers et al. 2001 ; Qualmann et al. 2004). La plateforme ProSAP/Shank est un élément central de la densité post-synaptique qui regroupe principalement les complexes de récepteurs postsynaptiques en les réticulant au cytosquelette d'actine des épines dendritiques, ils servent de maillage pour l'intégration de nombreuses autres molécules dans la densité post-synaptique, et ils sont des modulateurs essentiels du remodelage des contacts synaptiques dépendant de l'activité.

- SAPAP/GKAP (Protéine Associée à SAP / Protéine Associée à la Guanylate Kinase)

La famille GKAP comprend quatre membres, ce sont des protéines qui ont été identifiées à l'origine par leur capacité à interagir avec le domaine GK de PSD-95 (Kim et al. 1997 ; Takeuchi et al. 1997). Le domaine N-terminal de GKAP se lie à PSD-95 tandis que le reste de la protéine présente des domaines de liaison pour la molécule d'échafaudage synaptique (S-SCAM), nArgBP2 et la chaîne légère de la dynéine, suggérant ainsi une fonction de protéine d'échafaudage qui relie les complexes protéiques PSD aux protéines motrices (Naisbitt et al. 2000). Ils sont également un substrat d'une ubiquitine ligase E3 (TRIM3) et jouent ainsi un rôle dans la dégradation de Shank1, qui à son tour semble être impliqué dans le processus de consolidation et de reconsolidation de la mémoire (Hung et al. 2010 ; Lee et al. 2008).

- Homer

Les protéines Homer sont codées par trois gènes (Homer1-3) et sont structurellement formées par un domaine N-terminal Ena/VASP homology 1 (EVH1) suivi d'un domaine coiled-coil qui sert de médiateur à la dimérisation avec d'autres protéines Homer. Le domaine EVH1 de Homer1 se lie à un motif dans ProSAP/Shank, mGluR1/5, le récepteur de l'inositol-1,4,5-trisphosphate (IP3), le récepteur de la ryanodine, différents membres de la famille TRPC (Transient Receptor Potential Cation Channel), PLCb (Nakamura et al. 2004), des isoformes sélectives de canaux Ca^{2+} de type L (Yamamoto et al. 2005 ; Huang et al. 2007) et l'oligophrénine (Govek et al. 2004). Grâce à leur capacité d'auto-association, les isoformes d'Homer contenant le domaine coiled-coil peuvent lier physiquement et fonctionnellement les protéines et les récepteurs qui se lient au domaine EVH1, ce qui facilite l'association entre les mGluRs de type I ou TRPC1

avec l'IP3R, permettant ainsi à ces récepteurs de répondre aux signaux (Yuan et al. 2003 ; Sala et al. 2005). Il a également été démontré qu'ils sont impliqués dans l'induction de la LTP (Fagni et al. 2002).

- GRIP

Contrairement aux récepteurs NMDA, les AMPAR sont classiquement liés à un ensemble différent de protéines d'échafaudage, notamment GRIP/ABP et la protéine interagissant avec la C kinase 1 (PICK1). Ces interactions peuvent expliquer le comportement dynamique des AMPAR au niveau des synapses. Plusieurs preuves suggèrent que les protéines GRIP sont impliquées dans le trafic synaptique et/ou la stabilisation des AMPAR et d'autres protéines d'interaction. GRIP est composé de sept domaines PDZ, et interagit avec de nombreuses protéines, y compris les récepteurs Eph et leurs ligands éphrine, RasGEF, liprine-a, PICK1, les récepteurs de glutamate métabotropiques et de type kaïnate (Dong et al. 1997 ; Bruckner et al. 1999 ; Dong et al. 1999 ; Ye et al. 2000 ; Hirbec et al. 2002 ; Setou et al. 2002 ; Wyszynski et al. 2002 ; Takamiya et al. 2008). Les protéines GRIP peuvent participer aux fonctions synaptiques et neuronales telles que la morphogenèse des épines dendritiques, par l'intermédiaire des récepteurs et des ligands Eph, et le transport des AMPAR vers la synapse, par l'intermédiaire de kinésines telles que KIF5 (Shin et al. 2003 ; Hoogenraad et al. 2005).

- PICK1 (Protein Interacting with C-Kinase 1)

La protéine PICK1, contenant des domaines BAR (bin/amphiphysine/rvs) et PDZ, se lie directement aux sous-unités GluR2/3 des AMPAR (Dev et al. 1999 ; Xia et al. 1999). PICK1 est présente dans les sites synaptiques et non synaptiques des neurones. Elle se lie également à de nombreux autres partenaires tels que le récepteur de la nétrine UNC5H (Williams et al. 2003), divers sous-types de récepteurs métabotropiques du glutamate (Hirbec et al. 2002 ; Perroy et al. 2002) et le transporteur de la dopamine sur la membrane plasmique (Torres et al. 2001). PICK1 joue également un rôle clair et important dans l'expression de surface, le trafic et le ciblage synaptique des AMPAR (Jin et al. 2006 ; Hanley 2008). PICK1 participe à la plasticité homéostatique en régulant la composition des sous-unités, l'abondance et le trafic des AMPARs contenant des GluR2 (Anggono et al. 2011). Enfin, il a été démontré que PICK1 est nécessaire uniquement pour certaines formes de LTP et LTD (Volk et al. 2010).

2.4.3.2 - Les protéines d'échafaudage des synapses inhibitrices

-S-SCAM (MAGI2)

Faisant partie de la famille des MAGUK, et plus spécifiquement des MAGI (MAGUK with an inverted arrangement of protein-protein interaction domains), l'isoforme MAGI2 aussi appelée S-SCAM (Synaptic Scaffolding Molecule) a la particularité d'être présente à la fois dans les synapses excitatrices et inhibitrices. Les interactions classiques des MAGUK ont déjà été discutés plus haut, mais il est intéressant de noter que S-SCAM est notamment capable de se lier à la Neuroligine 2 et au β-dystroglycane, deux

protéines d'adhésion trouvées dans les synapses inhibitrices (Nagashima et al., 2015) et joue donc un rôle d'organisation similaire.

- Géphyrine

La géphyrine est la protéine d'échafaudage principale des synapses inhibitrices. Le chapitre suivant traite exclusivement de la géphyrine.

3 - La géphyrine

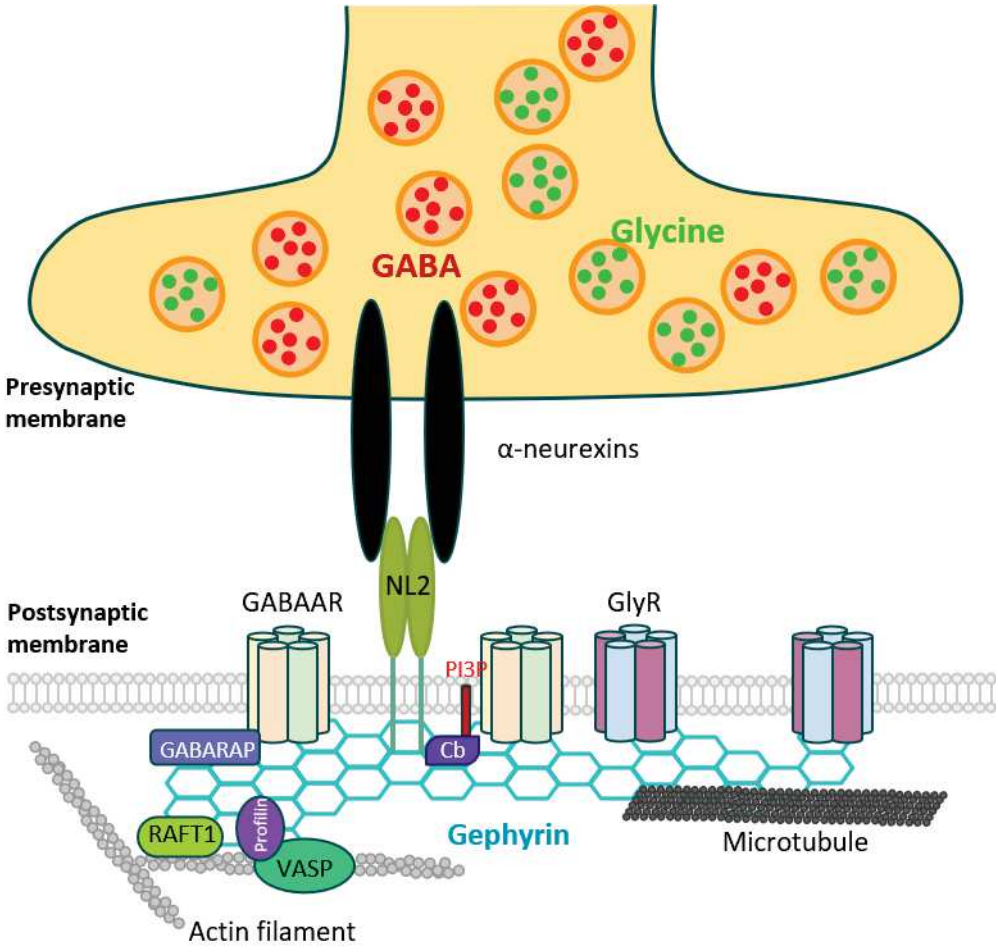


Figure 19 : Schéma d'un synapse inhibitrice

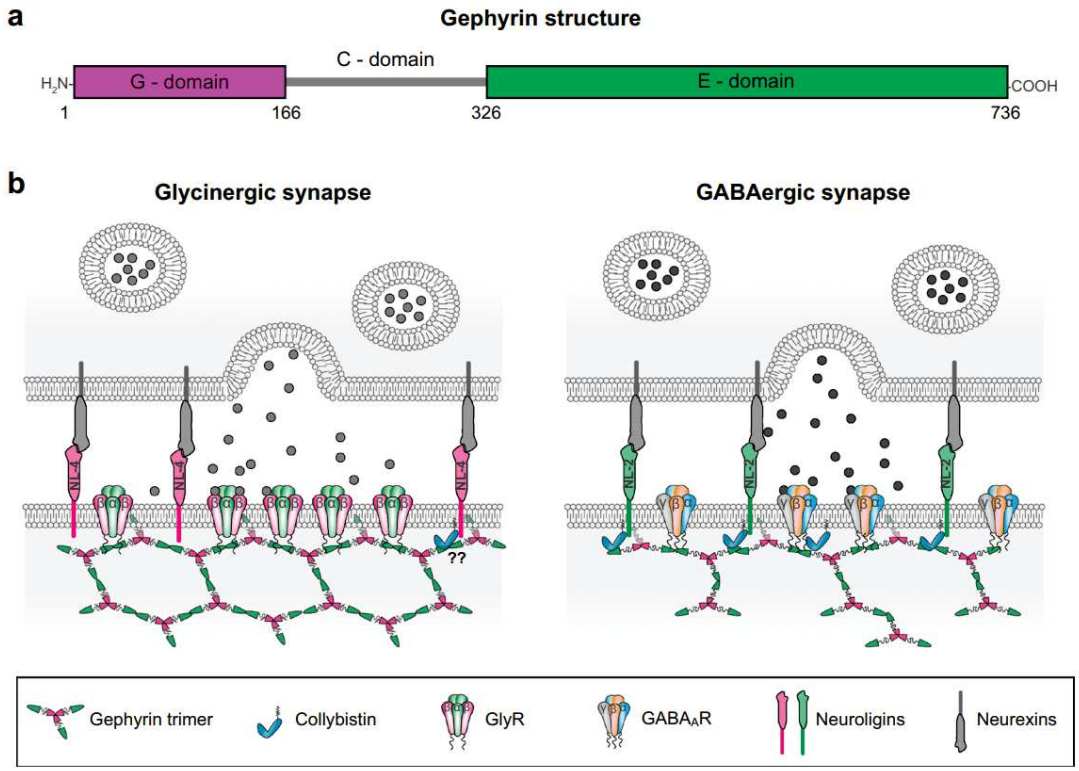


Figure 20 : La géphyrine dans les synapses inhibitrices. (a) Organisation des domaines de la géphyrine. (b) Schéma des radeaux de géphyrine sous la post-synapse glycinergique et GABAergique (Groeneweg et al., 2018).

3.1 - Introduction générale de la géphyrine, fonctions connues et état de la recherche actuelle

La géphyrine est la protéine d'échafaudage des synapses inhibitrices et est considérée comme étant responsable de l'organisation de la densité post-synaptique inhibitrice (Choii et Ko, 2015). Elle est essentielle pour le regroupement et l'accumulation des récepteurs glycinergiques et des récepteurs GABAA; elle orchestre ainsi la transmission synaptique

inhibitrice et est également impliquée dans la potentialisation à long terme. Depuis la découverte de la géphyrine en 1982, ses propriétés biochimiques et cellulaires ont été largement étudiées (Pfeiffer, Graham, et Betz, 1982). Il a été démontré que la protéine se lie à diverses classes de molécules synaptiques inhibitrices, régissant ainsi les processus dynamiques de formation, de fonction et de plasticité des synapses inhibitrices.

Après sa découverte initiale par des expériences de chromatographie d'affinité comme co-purifiant avec le récepteur inhibiteur postsynaptique de la glycine, la protéine a été nommée "géphyrine" du terme grec pour "pont", du fait de son activité comme molécule intermédiaire reliant les récepteurs au cytosquelette postsynaptique. Des expériences ultérieures ont démontré que le regroupement et la localisation postsynaptique des deux principaux types de récepteurs inhibiteurs dépendent des interactions protéine-protéine directes de la géphyrine avec des sous-unités, en particulier du récepteur de la glycine et du récepteur GABAA. Le regroupement de la géphyrine est essentiel pour la stabilité de la synapse de GABAergique Feng et al.,1998 ; Kneussel et al., 1999).

Une analyse par Northern blot a permis d'identifier les transcrits de l'ARNm de la géphyrine dans divers tissus. Il est intéressant de noter qu'une grande diversité de transcrits de la géphyrine a été observée dans le muscle squelettique, le cœur, le foie et le cerveau, qui présentent tous des caractéristiques distinctes. Cette observation est en accord avec l'idée que la géphyrine joue un rôle important dans les voies synaptiques et métaboliques du système nerveux (Ramming et al., 2000).

Les analyses d'hybridation in situ avec des sondes spécifiques aux exons ont révélé que certains transcrits de géphyrine sont principalement exprimés

dans des tissus spécifiques. Par exemple, les transcrits de géphyrine contenant la cassette C2 (correspondant à l'exon 3) étaient abondamment exprimés aux synapses, alors que ceux contenant les cassettes C3 et C4 (correspondant à l'exon 11) ne l'étaient pas (Kirsch et al., 1993).

Des analyses immunohistochimiques ont montré que la géphyrine est principalement localisée dans les synapses GABAergiques et glycinergiques (mais pas dans les synapses glutamatergiques) dans diverses régions du cerveau (Waldvogel et al., 2003). Récemment, la nanoscopie quantitative a été utilisée pour calculer le nombre de molécules de géphyrine et les sites de liaison des récepteurs synaptiques inhibiteurs. Il a été découvert que les synapses purement GABAergiques abritent ~40-500 molécules de géphyrine et 30-200 récepteurs GABAA organisés en micro-clusters (Specht et al., 2013). En revanche, les synapses de la moelle épinière, qui contiennent à la fois des GlyR et des récepteurs GABAA, ont montré une densité de cluster de la géphyrine deux fois plus élevée, ce qui suggère que la liaison aux GlyR affecte la compacité du réseau de géphyrine (Alvarez, 2016). Un immunomarquage des neurones cultivés avec un anticorps anti-géphyrine a révélé l'existence de clusters qui peuvent être classés comme grands (0,4-10,0 μm2) ou petits (<0,2 μm2). Les grands clusters étaient limités aux sites synaptiques inhibiteurs, tandis que les petits clusters étaient trouvés dans des sites extra-synaptiques, ce qui suggère que de fortes concentrations locales de molécules de géphyrine sont nécessaires pour stabiliser les sites synaptiques (Craig et al., 1996).

3.2 - Description du gène, de la structure et des domaines de la protéine

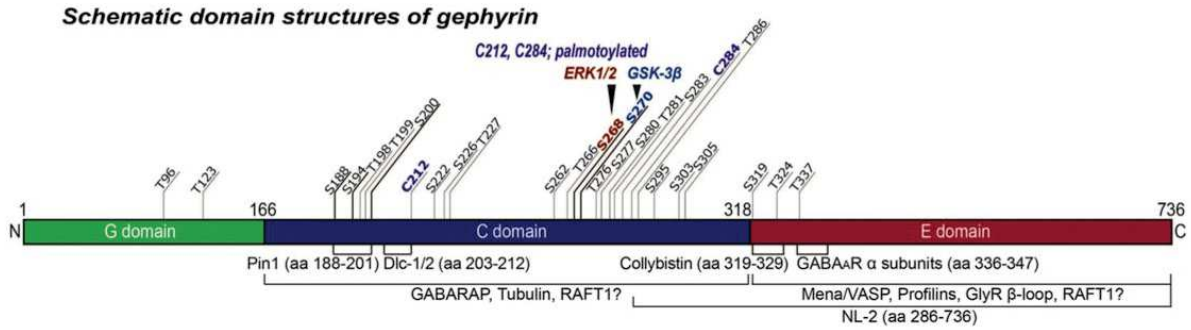


Figure 21 : Représentation schématique des domaines de la géphyrine (G, C et E) avec indication des sites de modifications post-traductionnelles (phosphorylation et palmitoylation) et des interactions de liaison avec d'autres protéines synaptiques (Choii et Ko, 2015).

La géphyrine a été purifiée à l'origine en tant que protéine de 93 kDa associée aux récepteurs de glycine et co-purifiée avec de la tubuline polymérisée (Pfeiffer, Graham, et Betz, 1982). Chez les vertébrés, la géphyrine est composée de trois grands domaines distincts : les domaines G, C et E. Le clonage moléculaire a révélé que la géphyrine présente des similitudes avec un groupe de protéines des invertébrés qui sont essentielles pour synthétiser un cofacteur nécessaire à l'activité du molybdène. Les domaines G et E de la géphyrine sont homologues aux enzymes MogA et MoeA d'Escherichia coli, respectivement, qui sont toutes deux impliquées dans la biosynthèse du cofacteur du molybdène, comme l'a montré une analyse de la structure cristalline du domaine trimère N-terminal de la géphyrine (Feng et al.,1998). Le domaine C de la géphyrine contient de nombreux résidus qui agissent

comme sites de modification post-traductionnelle et de liaison à d'autres protéines synaptiques, telles que la protéine associée au récepteur GABAA (GABARAP) et les chaînes légères 1 et 2 de la dynéine (Kneussel et al., 2000 ; Fuhrmann et al., 2002). Cependant, les autres domaines semblent également être nécessaires pour la fonction de la géphyrine. Par exemple, le domaine E de la géphyrine se lie à la boucle β de la sous-unité β des GlyR, où un résidu de sérine dans le motif de liaison agit comme un site de phosphorylation qui contrôle l'affinité de la liaison à la géphyrine (Bedet et al., 2006). De plus, il a été démontré que les séquences spécifiques aux vertébrés dans le domaine E régulent l'agrégation cytosolique et le regroupement des récepteurs postsynaptiques (Maric, Kasaragod, et Schindelin, 2014). Les agrégations enzymatiques et cytosoliques de la géphyrine se sont avérées indépendantes et l'analyse de la structure cristalline des différents domaines de la géphyrine a révélé que la dimérisation des domaines E de la géphyrine et la trimérisation des domaines G de la géphyrine déclenchent la formation d'agrégats multimériques et hexagonaux (Herweg et Schwarz, 2012). Une hypothèse est que les conformations en di et trimères de la géphyrine aident à la positionner sous la membrane plasmique, où elle forme un ancrage pour les récepteurs inhibiteurs. Cependant, la structure de la protéine de géphyrine complète n'a pas encore été résolue, en partie parce que certaines propriétés du domaine C compliquent la cristallisation de la protéine complète. La transcription de la géphyrine est soumise à un épissage alternatif étendu dans les trois domaines. Chaque domaine contient au moins trois cassettes d'expressions variables, fournissant un mécanisme de régulation par lequel les propriétés de signalisation de synapses spécifiques peuvent être modifiées (Kirsch et al., 1993 ; Paarmann et al., 2006 ; Ramming et al., 2000).

Aucune étude n’a encore pu expliquer comment l'épissage alternatif de la géphyrine est régulé. Cependant, l'insertion de la cassette C3 (correspondant à l'exon 9) serait régulée par les protéines Nova, et la présence de Nova dans les neurones a été corrélée avec l'alternance de l'exon dans la géphyrine (Ule et al., 2003). Il est intéressant de noter que la variante d'épissage de la géphyrine contenant la cassette C3 prédomine dans le foie de la souris, ce qui indique que les mécanismes d'épissage de la géphyrine peuvent être spécifiques au tissu (Nawrotzki et al., 2012). La fonction de la cassette C4d (correspondant à l'exon 11) a été étudiée dans les moindres détails. Bien qu'elle soit située dans le domaine N-terminal de la géphyrine, la présence de C4d abolit la liaison aux GlyR (Meier et al., 2000). Une étude biochimique récente a démontré que différents variants d'épissage de la géphyrine peuvent former des complexes hexamèriques qui diffèrent par leur stabilité (Herweg et Schwarz, 2012).

3.3 - Interactions avec les partenaires connus

La géphyrine interagit avec de nombreuses protéines (Tableau 1). Certaines des interactions sont bien connues, et nous avons sélectionnés certains partenaires dont il est intéressant de connaître la fonction et la nature de l'interaction de la géphyrine, et ce afin de mieux comprendre l'importance de la géphyrine en tant qu'organisateur de la synapse inhibitrice. La plupart des protéines de liaison à la géphyrine connues ont été principalement identifiées par des cribles double hybride. Bien que certaines des interactions aient été validées in vivo, leur signification reste largement inconnue.

Interactor	Binding site	Type of protein	Initial assay	Validation	References
Neurotransmitter receptors					
GlyR β subunit	E dom	Receptor subunit	coPUR	PD, r/e-CL, KD, KO, NGE, ITC	Pfeiffer et al. (1982), Kirsch et al. (1993), Meyer et al. (1995), Feng et al. (1998) and Maric et al. (2011)
$GABA_AR$ α1	E dom	Receptor subunit	NGE	r-CL, PD, Mut, ITC, E-Phys, Y2H, SPT, iBioID	Maric et al. (2011), Mukherjee et al. (2011) and Uezu et al. (2016)
$GABA_AR$ α2	E dom	Receptor subunit	NGE	r/e-CL, PD, Mut, ITC, Y2H, r-coIP, SRD, iBioID	Tretter et al. (2008), Saiepour et al. (2010), Maric et al. (2011) and Uezu et al. (2016)
$GABA_AR$ α3	E dom	Receptor subunit	NGE	r/e-CL, PD, Mut, ITC, Y2H, iBioID	Saiepour et al. (2010), Maric et al. (2011) and Uezu et al. (2016)
$GABA_AR$ β2 + β3	E dom	Receptor subunit	CSD	Mut, SPR, e-CL	Kowalczyk et al. (2013)
Cytoskeleton					
Tubulin	C dom	Cytoskeletal protein	coPOL	SRD	Kirsch et al. (1991) and Kirsch et al. (1995)
DLC 1 & 2	C dom	Motor protein	Y2H	SRD, r-PD, r-coIP, e-CL, Imm-EM, PD, iBioID	Fuhrmann et al. (2002), Navarro-Lerida et al. (2004) and Uezu et al. (2016)
KIF5	Unknown	Motor protein-associated	e-coIP	r-coIP, e-CL	Maas et al. (2009)
GABARAP	C dom	Autophagy, vesicular transport	Y2H	PD, r-CL	Kneussel et al. (2000)
GRIP-1	Unknown	Scaffolding protein	PD	r/e-CL, r-coIP, Imm-EM	Yu et al. (2008)
Profilins 1 & 2	E dom	Actin-binding proteins	PD	CSD, OL, SRD, r-coIP, e-CL, iBioID	Giesemann et al. (2003) and Uezu et al. (2016)
Mena	C or E dom	Actin-binding protein	SRD	PD, r/e-coIP, e-CL, iBioID	Giesemann et al. (2003), Bausen et al. (2006) and Uezu et al. (2016)
VASP	E dom	Actin-binding protein	SRD	PD, r/e-coIP, Mut	Giesemann et al. (2003) and Bausen et al. (2006)
G-Actin	unknown	Actin monomer	SRD	None	Giesemann et al. (2003)
EVL	unknown	Actin-binding protein	iBioID	None	Uezu et al. (2016)
Synaptic proteins					
Collybistin	C dom	Guanine exchange factor	Y2H	SRD, r/e-PD, r-coIP, r-CL, KO, Mut, STRU, iBioID	Kins et al. (2000), Grosskreutz et al. (2001), Harvey et al. (2004), Xiang et al. (2006), Papadopoulos et al. (2007) and Uezu et al. (2016)
Neuroligin 2	E dom	Transmembrane receptor	Y2H	r/e-coIP, r-PD, r/e-CL SRD, KO, iBioID	Poulopoulos et al. (2009) and Uezu et al. (2016)
InSyn 1 & 2	Unknown	Unknown	iBioID	r-CL, r-coIP	Uezu et al. (2016)
IQSEC3	Unknown	Unknown	iBioID	r-CL	Uezu et al. (2016)
PX-RICS	Unknown	Unknown	iBioID	r-CL, r-coIP	Uezu et al. (2016)
Miscellaneous					
mTOR	C or E dom	Ser/Thr kinase	Y2H	SRD, r-coIP, RNAi	Sabatini et al. (1999) and Wuchter et al. (2012)
HSC-70	G dom	Chaperone	PD	r/e-CL, e-coIP	Machado et al. (2011)
PP1	Unknown	Ser/Thr phosphatase	Pharm	r/e-CL, r-coIP	Bausen et al. (2010)
Pin1	C dom	Peptidyl-prolyl isomerase	PD	r/e-coIP, Mut, SRD, KO	Zita et al. (2007) and Machado et al. (2011)
CDC42	G or E dom	Small GTPase (Rho family)	PD	r-coIP, r-CL	Tyagarajan et al. (2011a)
Vps 35/Nbea	Unknown	Protein trafficking	PD	None	del Pino et al. (2011)
SRGAP2/WRP	E dom	Rho GTPase	Photo X-link	coPUR, r/e-CL, KO	Okada et al. (2011)

r- using recombinant protein, *e-* using only endogenous proteins, *coIP* coimmunoprecipitation, *CL* colocalization, *coPOL* copolymerization, *coPUR* copurification, *CSD* cosedimentation, *E-Phys* electrophysiology, *iBioID* in vivo proximity-based biotin identification, *Imm-EM* immuno-EM, *ITC* isothermal titration calorimetry, *KD* knockdown, *KO* knockout, *Mut* mutagenesis, *NGE* native gel electrophoresis, *OL* overlay assay, *PD* pull-down, *Pharm* pharmacology, *SPT* single-particle tracking, *SPR* surface plasmon resonance spectroscopy, *SRD* subcellular redistribution, *STRU* X-ray crystallography, *Y2H* yeast two-hybrid assay

Tableau 1 : Protéines interagissant avec la géphyrine

3.3.1 - Collybistine

La collybistine (Cb) est un facteur d'échange GTP/GDP spécifique du cerveau. Elle comporte un domaine PH (pleckstrin homology) et un domaine DH (dbl homology), caractéristiques des facteurs d'échange GTP/GDP, et un domaine SH3 (Src homology 3) qui sert d'auto-inhibition en maintenant la collybistine en conformation inactive. Cette inhibition est levée par l'interaction avec la sous unité alpha 2 du récepteur GABA ou par la neuroligine 2, protéine d'adhésion spécifique des synapses inhibitrices. La collybistine interagit avec la géphyrine, le site de liaison se trouve entre les domaines DH et SH3, et il a été montré que cette interaction est essentielle à la formation et la maintenance de la géphyrine et par extension des clusters de récepteur GABA associés.
Plus récemment, une étude de variants d'épissage spécifiques de la collybistine a montré qu'elle favorise l'agrégation de la géphyrine en collaboration avec le Cdc42 via l'ancrage membranaire médié par les phosphoinositides.

Le gène de la collybistine
Il existe chez les rongeurs un seul gène codant pour la Cb *(Arhgef9)* générant des ARNm dont quatre variants d'épissage sont connus dans le cerveau. Trois d'entre eux codent pour des Cb qui diffèrent au niveau C-terminal mais qui contiennent le domaine SH3 (CbI, CbII et CbIII) et un variant qui ne présente pas de domaine SH3. Parmi ces variants, seuls CbII et CbIII sont exprimés dans les neurones adultes (Harvey et al., 2004). Un rapport précédent indique que CbI et CbII régulent de manière différentielle la

formation des synapses GABAergiques pendant le développement, et que la spécialisation fonctionnelle de ces isoformes Cb provient de leur demi-vie protéique différentielle, qui est contrôlée par la conjugaison de l'ubiquitine au niveau de l'unique C-terminal de CbI (de Groot et al., 2017). En revanche, CbII et CbIII ne diffèrent pas en ce qui concerne le ciblage postsynaptique et leur capacité à induire un regroupement de géphyrine lors de leur surexpression dans les neurones (Chiou et al., 2011). L'orthologue humain de Cb (également connu sous le nom d'homologue humain de posterior end mark-2 (PEM2), ainsi que d'ARHGEF9) est équivalent au CbIII des rongeurs et possède également des variants dans lesquels le domaine SH3 est parfois manquant (Harvey et al., 2004).

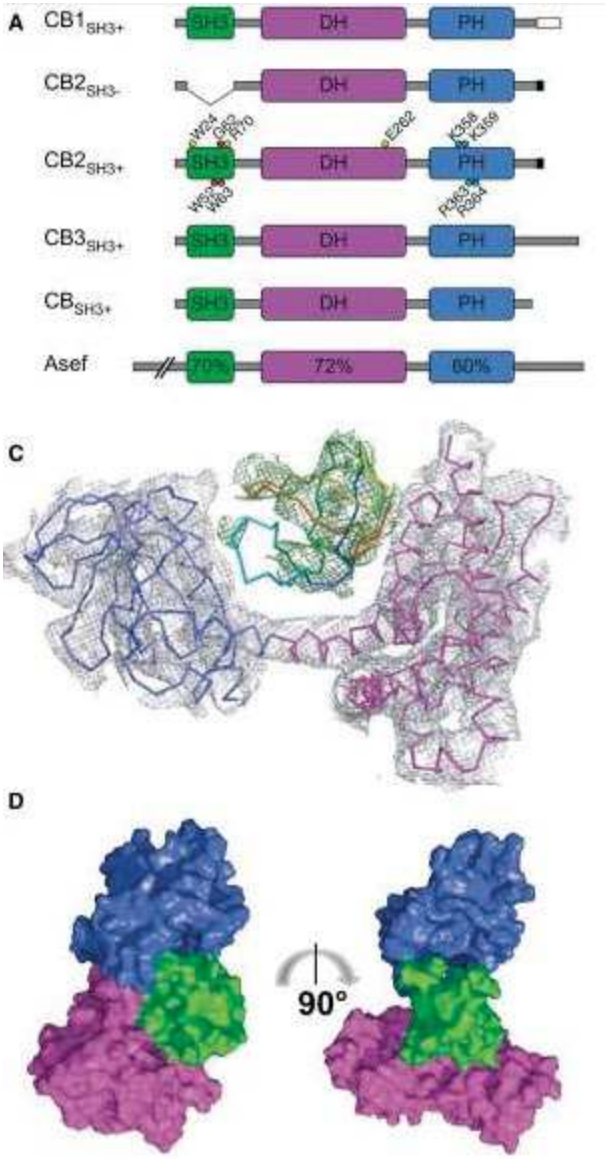


Figure 22 : La structure de la collybistine. (A) Organisation des domaines des différents variants de la collybistine. Représentation par poids électronique (C) ou de surface (D) de la collybistine, les domaines ont le même code couleur qu'en (A)(Soykan et al., 2014).

Les domaines de la collybistin

Une caractéristique notable des variants de Cb les plus abondantes, qui contiennent des domaines SH3, est que leur activité est auto-inhibée par les interactions de leur domaine SH3 N-terminal avec les domaines DH et PH

(Soykan et al., 2014). En conséquence, un variant de Cb dépourvu du domaine SH3 (ΔSH3-CbII) a une activité intrinsèque de regroupement de la géphyrine à la membrane plasmique des cellules non neuronales (Kins et al., 2000) et améliore le regroupement postsynaptique de la géphyrine dans les neurones (Chiou et al., 2011). Au contraire, les variants de Cb qui portent le domaine SH3 ne sont pas ciblées vers la membrane plasmique mais restent colocalisées avec les dépôts intracellulaires de géphyrine (Harvey et al., 2004 ; Kins et al., 2000). Pour une activité adéquate, elles nécessitent des facteurs supplémentaires, tels que Neuroligine 2 et/ou 4 (NL2, NL4) (Hoon et al., 2011 ; Poulopoulos et al., 2009) ou la sous-unité α2 des GABAARs (Saiepour et al., 2010), qui interagissent avec le domaine SH3 de Cb et favorisent une conformation ouverte et active. La régulation et le rôle exact des différents variants d'épissage de Cb au cours du développement du cerveau in vivo restent toutefois largement méconnus.

Le domaine DH de Cb catalyse l'échange GDP-GTP sur les GTPases de type Rho. En effectuant des tests avec les trois GTPases de type Rho les mieux caractérisées, Cdc42, Rac1 et RhoA, il a été déterminé que la Cb de souris et son orthologue humain sont des GEFs spécifiques de Cdc42 (Reid et al., 1999). Cependant, la délétion spécifique de Cdc42 dans le cerveau antérieur de la souris n'affecte pas le regroupement de la géphyrine et des GABAAR, ce qui indique que la Cb peut également activer d'autres GTPases de type Rho dans le cerveau (Reddy-Alla et al., 2010). Une autre GTPase de type Rho, TC10 (également connu sous le nom de RhoQ), a été étudiée dans ce sens, car elle est étroitement liée à Cdc42 (Hemsath et al., 2005 ; Neudauer et al., 1998) et, contrairement à Cdc42, est assez spécifiquement exprimé dans l'hippocampe (Tanabe et al., 2000), où la réduction la plus importante

de la géphyrine et de l'agrégation des GABAAR se produit lors de la suppression de Cb (Papadopoulos et al., 2007). Des études ultérieures ont montré que Cb active effectivement TC10 (Mayer et al., 2013). De plus, le GTP-TC10 actif maintient une interaction avec le domaine PH de Cb sous la forme d'un complexe GTPase-effecteur. Cette interaction semble activer Cb car elle déclenche le regroupement synaptique de la géphyrine et améliore la neurotransmission GABAergique dans les neurones hippocampiques en culture (Mayer et al., 2013). Alors que le domaine SH3 de Cb contrôle l'auto-inhibition et l'activation, le domaine PH de Cb est fonctionnellement essentiel. En effet, la délétion de l'ensemble du domaine PH ou les mutations ponctuelles du domaine PH qui abrogent la liaison phosphoinosotide (Reddy-Alla et al., 2010) abolissent le regroupement de la géphyrine médié par Cb dans les essais fonctionnels (Harvey et al., 2004 ; Reddy-Alla et al., 2010), ce qui indique que le recrutement membranaire dépendant du phosphoinositide est une étape clé de la fonction de Cb. Cependant, les informations sur les rôles postsynaptiques des phosphoinositides sont actuellement très rares, ce qui est surprenant au vu des rôles bien établis des phosphoinositides en tant que molécules de signalisation, par exemple dans le trafic membranaire, la compartimentation cellulaire (Balla, 2013 ; Raiborg et al., 2013 ; Roth, 2004) et le recyclage et la fonction des vésicules présynaptiques (Wenk et De Camilli, 2004).

Activité et régulation de la collybistine

Le phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) est actuellement le ligand phosphoinositide de Cb le mieux validé et le préféré dans de multiples contextes expérimentaux (Chiou et al., 2019 ; Kalscheuer et al., 2009 ; Papadopoulos et al., 2017, 2015). Récemment, il a été démontré qu'une série

de mutations antisens dans le gène humain Cb (R290H, R338W et R356Q), perturbent la liaison PI3P de Cb et entraînent un regroupement défectueux de la géphyrine dans les neurones (Chiou et al., 2019 ; Long et al., 2015 ; Papadopoulos et al., 2015).

Les études sur des modèles murins et sur des syndromes neurodéveloppementaux humains caractérisés par une perte de CB soutient un lien fonctionnel avec les GABAAR. La délétion d'Arhgef9 chez la souris entraîne une réduction sélective du nombre de synapses inhibitrices dans l'hippocampe. Une mutation antisens naturelle de l'ARHGEF9 (G55A) est associée à l'hyperplexie, à l'épilepsie et au retard mental, et il a été démontré qu'elle perturbe le regroupement des GABAAR contenant α2 et de la géphyrine. De même, il a été démontré qu'une mutation par translocation dans le gène ARHGEF9 entraîne un syndrome neurodéveloppemental comprenant l'épilepsie, l'anxiété, un comportement agressif, des perturbations du sommeil et de l'éveil, et un retard mental, mais pas d'hyperplexie, ce qui suggère une large perturbation de la signalisation GABAergique mais pas glycinergique dans cette variante du trouble. Malgré cela, les mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine des symptômes observés à la suite de mutations de l'ARHGEF9 restent inconnus.

3.3.2 - Neuroligine 2

Les neuroligines (NLG) sont des protéines d'adhésion postsynaptiques qui se lient aux neurexines (NRX) présynaptiques pour réguler la formation et la fonction des synapses et qui ont fait l'objet de recherches approfondies en

raison de leur rôle dans des troubles tels que l'autisme et la schizophrénie. Au sein de cette famille, la NLG2 est la seule à se localiser exclusivement dans les synapses inhibitrices.

NLG2 contient un domaine intracellulaire C-terminal court, qui sert de médiateur aux interactions avec le complexe post-synaptique au niveau des synapses GABAergiques. Ce complexe contient des récepteurs GABAA, ainsi que des protéines organisatrices telles que la protéine d'échafaudage géphyrine et d'autres qui ancrent les GABAAR aux synapses et régulent la transmission GABAergique. Il a été démontré que NLG2 joue un rôle central dans l'organisation de ce complexe en recrutant la géphyrine et les GABAARs dans les amas synaptiques dans un processus qui dépend de la collybistine. Dans le modèle issu de ces études, la NLG2 s'accumule en dehors des terminaux présynaptiques GABAergiques en raison de ses interactions avec les neurexines, où il forme ensuite un complexe tripartite avec Cb et la géphyrine. Dans ce complexe, le NLG2 se lie à la géphyrine par un motif contenant une tyrosine essentielle (Tyr770 dans le NLG2 de rat) et à la Cb par un motif riche en proline, stabilisant ainsi une conformation ouverte et active de la Cb et conduisant à l'assemblage local d'un échafaudage de géphyrine et au recrutement des GABAAR.

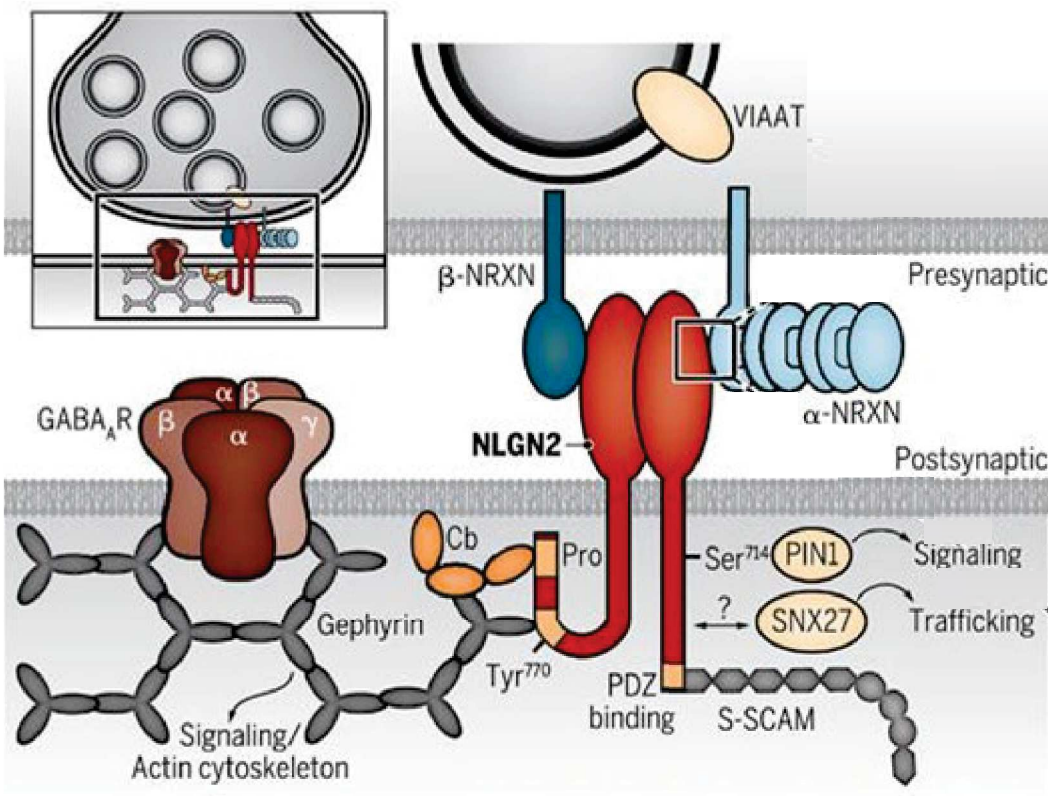


Figure 23 : Structure de NLG2 aux synapses inhibitrices. Des dimères NLG2 forment des interactions trans-synaptiques avec les neurexines (NRX) de la pré-synapse. NLG2 interagit également avec Cb et la géphyrine, qui à leur tour, recrutent les GABAAR à la synapse. D'autres interactions avec la protéine d'échafaudage S-SCAM, l'adaptateur pour endosome SNX27, ainsi que la peptidyl-prolyl isomérase PIN1 sont à noter (Ali, Marth, et Krueger-Burg, 2020).

En plus des motifs de liaison à la géphyrine et à Cb, le domaine intracellulaire de NLG2 contient également un motif de liaison PDZ qui peut se lier à des interacteurs comme la protéine d'échafaudage synaptique S-SCAM (pour Synaptic Scaffolding Molecule). De plus, la NLG2 peut être phosphorylé, de façon proline dépendante, sur une sérine conservée (Ser714 chez la souris), ce qui entraîne le recrutement de la peptidyl-prolyl isomérase

PIN1, qui provoque un changement de conformation de NLG2 et perturbe sa capacité à se lier à la géphyrine. Il a été proposé que cette voie de signalisation représente un mécanisme pour la fonction de NLG2 aux synapses inhibitrices qui est parallèle et indépendant du complexe tripartite NLG2/Cb/géphyrine et que la perturbation des deux voies est nécessaire pour abolir complètement l'effet du NLG2 sur la fonction des synapses inhibitrices.

Enfin, le domaine intracellulaire du NLG2 est également impliqué dans son trafic et notamment dans l'endocytose de NLG2 en réponse à la fixation d'un ligand. Ce processus serait régulé par une interaction directe de NLG2 avec l'adaptateur SNX27 (pour endosome-cargo Sorting Nexin 27), qui empêche la dégradation lysosomale et favorise le recyclage du NLG2 vers la synapse inhibitrice, renforçant ainsi la transmission synaptique inhibitrice et les synapses contenant la NLG.

Fonction et modulation

Les premières preuves que la NLG2 peut jouer un rôle central dans le développement et la fonction des synapses inhibitrices proviennent d'expériences sur des cultures neuronales et des souris transgéniques, qui ont démontré que la surexpression de NLG2 améliore sélectivement la fonction des synapses inhibitrices mais pas excitatrices, et d'études sur des cellules rénales embryonnaires humaines hétérologues montrant que l'expression du NLG2 entraîne le regroupement de GABAAR fonctionnels. L'un des résultats les plus constants dans pratiquement toutes les régions du cerveau est que les composants protéiques du complexe postsynaptique GABAergique, mais pas la pré-synapse GABAergique, sont réduits chez les souris Nlgn2 KO, ce qui indique une modification de la composition de la

post-synapse mais pas du nombre total de synapses inhibitrices. Il est intéressant de noter qu'il existe une certaine variabilité dans la mesure où les différents composants protéiques postsynaptiques sont affectés dans différentes régions, notamment en ce qui concerne les différentes sous-unités du GABAAR pentamérique, qui jouent chacune des rôles distincts dans la fonction du récepteur. Il est encore difficile de déterminer si cette divergence représente une véritable différence régionale dans la fonction du NLG2 ou une conséquence des distinctions techniques entre les études. Dans l'aire hippocampique CA1, la délétion de Nlgn2 entraîne une augmentation marquée des clusters extra-synaptiques de géphyrine, reflétant probablement une perturbation du recrutement normal de la géphyrine vers les sites postsynaptiques.

Conformément à cette réduction des composants postsynaptiques, la transmission synaptique inhibitrice GABAergique et glycinergique, évaluée sous la forme de courants postsynaptiques inhibiteurs miniatures ou spontanés (mIPSCs ou sIPSCs), est nettement réduite chez les souris Nlgn2 KO. Dans la plupart des régions, la délétion du NLG2 entraîne une diminution de l'amplitude des mIPSC, qui peut refléter une réduction du nombre ou de la fonction des GABAAR postsynaptiques.

3.3.3 - Cytosquelette (Pin1-2, RAFT1, Tubuline, Dlc1-2)

Près de 30 ans après l'observation initiale que la géphyrine se lie aux microtubules in vitro (Kirsch et al. 1991), des études indiquent que les GlyR ont effectivement besoin de la géphyrine pour se connecter à la chaîne de

transport des microtubules. En premier lieu, les deux protéines s'agglomèrent avec la tubuline polymérisée purifiée (Kirsch et al. 1991 ; Prior et al. 1992). La déstabilisation des microtubules par différents agents chimiques réduit fortement la capacité de la géphyrine et des GlyRs à se regrouper aux sites synaptiques (Kirsch et Betz 1995 ; Maas et al. 2009), quoiqu'une autre étude n'a pas observé cet effet dans les neurones de l'hippocampe (Allison et al. 2000). Dans des expériences d'imagerie de cellules vivantes, il a été constaté que de petits clusters de géphyrine et de sous-unités GlyR β colocalisées se déplaçaient ensemble dans un transport rapide et dirigé, caractéristique du transport basé sur les microtubules (Maas et al. 2006). Enfin, la microscopie super-résolution a également confirmé l'existence de petits clusters non synaptiques de géphyrine colocalisés à des GlyR, présumés être des vésicules de transport (Specht et al. 2013). La façon dont la géphyrine s'associe aux microtubules reste encore difficile à comprendre. Comme les expériences de co-sédimentation utilisent de la tubuline purifiée sans aucune de ses protéines MAP ou motrices associées (Kirsch et al. 1991 ; Prior et al. 1992), une liaison directe de la géphyrine à la tubuline est plausible. En effet, la géphyrine contient un motif potentiel de liaison à la tubuline (Ramming et al. 2000). Cependant, le transport basé sur les microtubules nécessite normalement que les protéines se lient à l'un des complexes protéiques moteurs kinésine ou dynéine. En effet, il a été découvert que la géphyrine se lie également à deux types de protéines motrices : la chaîne légère de la dynéine (Dlc1/2) et la kinésine 1 (KIF5) (Fuhrmann et al. 2002 ; Maas et al. 2006, 2009 ; Rathgeber et al. 2015). L'inhibition de KIF5 par siARN ou anticorps conduit à une forte réduction de la formation de nouveaux clusters géphyrine/GlyR et de la plasticité des clusters existants (Maas et al. 2009). Pour le transport à longue distance, les

vésicules contenant les GABAAR dépendent principalement de KIF5, mais elles semblent utiliser d'autres protéines adaptatrices comme pont moléculaire : la protéine associée aux GABAAR (GABARAP) (Leil et al. 2004) et la protéine interagissant avec les récepteurs du glutamate (GRIP1) (Kittler et al. 2004 ; Marsden et al. 2007). Même si la géphyrine est capable de se lier à la fois à GABARAP (Kneussel et al. 2000) et à GRIP1 (Yu et al. 2008), il n'a pas été démontré que la géphyrine joue un rôle dans le transport microtubulaire des sous-unités GABAAR. L'affinité de liaison de la géphyrine pour l'une des sous-unités GABAAR est environ dix fois inférieure à celle des GlyR (Maric et al. 2014). Il est possible que cette affinité de liaison plus faible ne suffise pas à permettre une fonction de la géphyrine en tant que pont moléculaire pour les GABAAR pendant le transport basé sur les microtubules.

3.3.4 - Les récepteurs GABAergiques

Interaction avec la géphyrine

Une étude a démontré par immunoprécipitation une liaison directe entre la sous unité α1 des récepteurs GABA et le domaine E de la géphyrine, et cette interaction permet l'accumulation et la stabilisation des récepteurs GABA à la membrane postsynaptique. L'affinité de cette interaction repose sur les résidus 360-375, notamment via la phosphorylation de la thréonine 375 qui impacte négativement l'affinité, résultant d'une diminution de l'accumulation de récepteur GABA à la synapse, réduisant en conséquence l'amplitude des mIPSC. Une autre étude sur des souris KO pour la géphyrine révèlent l'absence de récepteurs GABAA contenant les sous unités γ2 et/ou

α2 à la synapse, confirmant le rôle essentiel de la géphyrine dans la stabilisation des récepteurs GABAergiques à la post-synapse.

3.3.5 - Les récepteurs glycinergiques

Interaction avec la géphyrine

Les GlyR ont été identifiées comme la première protéine de liaison de la géphyrine par une étude de chromatographie d'affinité. Il a ensuite été démontré que la boucle cytoplasmique de la sous-unité β des GlyR se liait à l'interface de dimérisation du domaine E de la géphyrine. Il a été observé que le traitement des neurones spinaux du rat avec des oligonucléotides antisens de la géphyrine bloquait la formation de groupes de GlyR dans la membrane neuronale, ce qui suggère que la géphyrine est nécessaire pour ancrer la GlyR dans la membrane postsynaptique. En outre, le traitement avec un antagoniste compétitif des GlyR (strychnine) inhibe l'accumulation des GlyR et de la géphyrine au niveau des membranes postsynaptiques dans les neurones spinaux de rats cultivés, ce qui suggère que l'activation des GlyR est nécessaire pour l'agrégation de la géphyrine et de la GlyR. Ces notions ont ensuite été validées in vivo par des études montrant que l'agrégation des GlyR était perturbée chez les souris déplétées en géphyrine. Les clusters de GlyR se forment rapidement et de façon réversible par un processus en deux étapes dans lequel la formation de clusters à la surface des cellules est d'abord indépendantes de la géphyrine puis est suivie d'une accumulation post-synaptique médiée par la géphyrine. Dans ce dernier processus, la géphyrine rompt l'équilibre entre les états diffus et groupés des

GlyR pour les stabiliser dans les sites sous-membranaires. Enfin, il a été démontré que l'oligomérisation de la géphyrine modulait la diffusion latérale des GlyR.

3.4 - Modifications post traductionnelles

Auparavant, les modifications post-traductionnelles (MPT) de la géphyrine n'étaient pas considérées comme significatives sur le plan fonctionnel, potentiellement parce que la protéine était considérée seulement comme un composant structurel de la synapse inhibitrice. Cependant, la géphyrine a été identifiée comme étant une phosphoprotéine, et des analyses par spectrométrie de masse de cerveaux de rats et de souris ont révélé que la géphyrine possède de nombreux sites de phosphorylation, dont la plupart sont situés dans le domaine C. Ces modifications pourraient induire des changements conformationnels en affectant la structure du domaine C ou des domaines G et E voisins, altérant ainsi les propriétés de regroupement, de trafic et de liaison de la géphyrine.

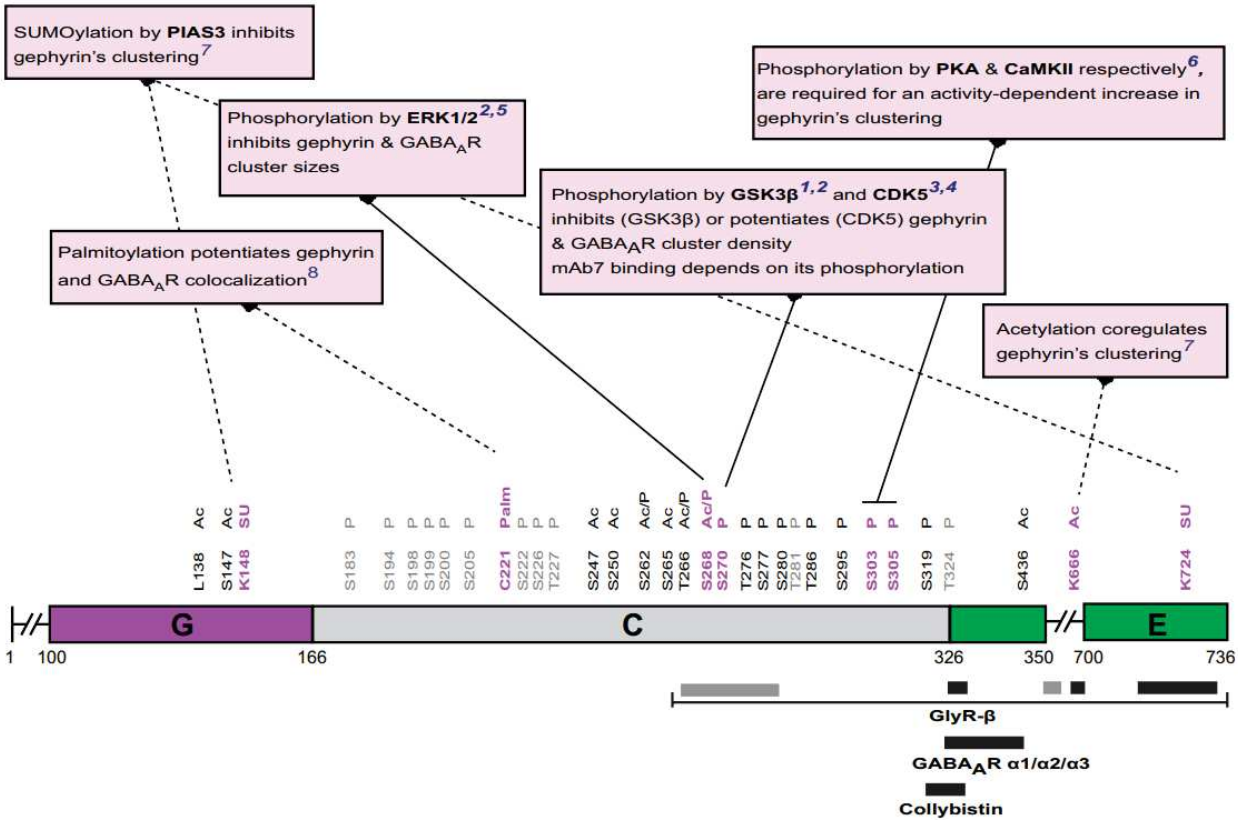


Figure 24 : Modifications post-traductionnelles et principaux sites de liaison sur la géphyrine neuronale. Dessin schématique des différents résidus de la géphyrine soumis à des modifications post-traductionnelles et leur effet sur le regroupement de la géphyrine. Modifications trouvées sur la géphyrine non neuronale (en gris), la géphyrine neuronale (en noir) et celles qui affectent le regroupement synaptique (en rose)(Groeneweg et al., 2018).

Phosphorylation

Le premier type de MPT examiné en ce qui concerne leur effet régulateur sur le regroupement synaptique de la géphyrine était les phosphorylations. En général, la régulation fonctionnelle par phosphorylation se produit sur des régions protéiques non structurées, ce qui dans le cas de la géphyrine, correspond au domaine C. Ce domaine contient environ 40 sites de phosphorylation potentiels, dont 25 ont été démontrés et se sont avérés être

phosphorylés dans différents types de cellules (Herweg et Schwarz 2012 ; Kuhse et al. 2012 ; Tyagarajan et al. 2013). La géphyrine joue un rôle complètement différent dans les tissus neuronaux par rapport aux tissus périphériques, indiquant de potentielles différences dans la régulation post-traductionnelle. En effet, sur les dix résidus phosphorylés identifiés dans la géphyrine du cerveau de rat (Tyagarajan et al. 2013), seulement la moitié se recoupaient avec ceux trouvés dans les cellules périphériques (Herweg et Schwarz 2012).

La phosphorylation de la sérine 270 (Ser270) dans le domaine C de la géphyrine a un effet particulièrement notable sur son potentiel de regroupement. Dans une première série d'expériences, des chercheurs ont constaté que la phosphorylation de la Ser270 par GSK3β était associée à une densité réduite des clusters de géphyrine et de GABAAR (Tyagarajan et al. 2011). Inversement, la déphosphorylation de la géphyrine à Ser270 ou une inhibition de GSK3β était associée à une augmentation de la densité de la géphyrine et des clusters GABAAR, ainsi qu'à une augmentation de la signalisation GABAergique (Tyagarajan et al. 2011). Il est à noter qu'une étude récente du même groupe n'a pas pu confirmer l'augmentation de la densité des clusters de géphyrine pour le mutant déphosphorylé. Au contraire, une augmentation de la taille des amas et une diminution de la densité des molécules de géphyrine par amas ont été signalées (Battaglia et al. 2018). La sérine/thréonine kinase GSK3β, fortement exprimée dans les neurones (Seira et Del Rio 2014), est notamment impliquée dans la régulation de la transcription locale et de la dégradation des protéines (Robertson et al. 2018). En effet, la phosphorylation de Ser270 par GSK3β cause une augmentation de la dégradation protéique calpaïne dépendante de la géphyrine (Tyagarajan et al. 2011). Ser270 est également phosphorylé par

d'autres kinases. Un groupe de chercheurs a précédemment montré que la kinase cycline-dépendante CDK5, qui régule différents aspects de la différenciation neuronale (Guan et al. 2011 ; Mushtaq et al. 2016), phosphoryle également la géphyrine au niveau de Ser270 (Kuhse et al. 2012 ; Kalbouneh et al. 2014). L'inhibition de CDK5, par siRNA ou par des inhibiteurs pharmacologiques, entraîne une forte réduction de la géphyrine phosphorylée sur Ser270 dans les clusters synaptiques, alors que le même traitement n'affecte pas la densité des clusters de géphyrine totale (Kalbouneh et al. 2014). De manière surprenante, contrairement à la suppression de GSK3β, l'inhibition de CDK5 était corrélée à une forte réduction de la densité des clusters GABAAR γ2 (Kalbouneh et al. 2014).

Il est encore aujourd'hui difficile d'expliquer comment les deux kinases mentionnées peuvent cibler le même site de phosphorylation sur la géphyrine mais conduire à des effets opposés sur le clustering de la géphyrine et des GABAAR. Une hypothèse serait que les deux kinases pourraient agir dans des contextes cellulaires différents. La phosphorylation de la géphyrine médiée par GSK3β est supposée se produire au niveau des synapses, où elle potentialise la dégradation calpaïne dépendante de la géphyrine (Tyagarajan et al. 2011). La phosphorylation de la Ser270 est presque exclusivement observée au niveau des synapses, et est pratiquement absente de la géphyrine cytoplasmique ou liée à la tubuline. On peut donc supposer que la phosphorylation dépendante de CDK5 se produit dans des compartiments cellulaires en dehors des synapses. La géphyrine phosphorylée sur la Ser270 est alors plus efficacement recrutée dans les synapses. Alternativement, GSK3β et CDK5 pourraient phosphoryler la géphyrine, ou ses partenaires synaptiques, sur plusieurs sites. Les deux enzymes ont été étudiées seulement sur leur action sur le résidu Ser270

(Tyagarajan et al. 2011 ; Kalbouneh et al. 2014), ainsi, la phosphorylation sur d'autres sites différents sites pourrait potentiellement expliquer l'effet opposé des deux kinases.

Il a également été démontré que les kinases ERK1/2, PKA et CaMKII phosphorylent des résidus de sérine spécifiques de la géphyrine : Ser268 pour ERK1/2, Ser305 pour CaMKII et Ser303 pour la PKA (Tyagarajan et al. 2013). Les inhibiteurs d'ERK1/2 ou la substitution de Ser268 par une alanine ont conduit à une augmentation à la fois de la densité et de la taille des amas de géphyrine, associée à une augmentation de la transmission GABAergique (Tyagarajan et al. 2013). À l'inverse, une mutation S268E a entraîné une diminution de la taille des amas de géphyrine et de GABAAR et à une augmentation de la motilité latérale des GABAAR (Battaglia et al. 2018). Dans l'ensemble, la phosphorylation de Ser268 induite par ERK1/2 semble limiter la taille et la force des synapses inhibitrices. Un blocage de la phosphorylation des Ser303 et Ser305 n’affecte pas le niveau basal des clusters de géphyrine ; cependant, la phosphorylation de ces résidus est nécessaire pour une augmentation dépendante de l'activité de la mobilité et de la taille des clusters de géphyrine (Flores et al. 2015), ainsi que pour le recrutement synaptique des GABAAR (Battaglia et al. 2018). Il est intéressant de noter que l'augmentation de l'agrégation de la géphyrine dépend de la neurotransmission excitatrice, mais pas de la neurotransmission inhibitrice (Flores et al. 2015). Il est fort probable que la signalisation calcique locale provenant des synapses excitatrices active la PKA et la CaMKII dans les sites inhibiteurs voisins où elles stimulent le regroupement de la géphyrine. Un ensemble de trois sérines situées dans la partie C-terminale du domaine central, Ser188, Ser194 et Ser200, sont les cibles

d’une phosphorylation assistée par la proline, ce qui permet la liaison de la peptidyl prolyl isomérase PIN1, qui permet un changement de conformation de la géphyrine qui stabilise sa liaison à la sous-unité GlyR β (Zita et al. 2007).

Palmitoylation

De nombreuses protéines synaptiques sont palmitoylées, un processus qui ajoute une petite partie lipidique aux cystéines disponibles en surface et, par conséquent, permet à la protéine de s'ancrer dans la membrane plasmique. La perte de la palmitoylation de PSD95 au niveau des synapses excitatrices entraîne une diminution rapide de sa localisation synaptique et le désassemblage de la densité postsynaptique excitatrice (ElHusseini Ael et al. 2002). De façon similaire, il a été démontré que la géphyrine subit une palmitoylation, et que le blocage de cette palmitoylation a conduit à une mauvaise localisation des clusters de géphyrine qui ne se trouvent plus colocalisés avec les GABAAR ni même apposés aux terminaux présynaptiques (Dejanovic et al. 2014).

S-nitrosylation

La S-nitrosylation des protéines est l'effet le plus courant de l'oxyde nitrique (NO), une molécule de signalisation gazeuse présente dans les synapses excitatrices et inhibitrices. Il a également été démontré que la géphyrine est S-nitrosylée et que sa S-nitrosylation semble avoir un effet négatif sur la formation de clusters et l'expression de surface globale des sous-unités GABAAR synaptiques (Dejanovic et al., 2014).

Acétylation et SUMOylation

Deux autres types de MPT dans la géphyrine ont été révélés par plusieurs études. Il a été démontré que la SUMOylation et l'acétylation des certains résidus de la géphyrine corégulent son regroupement synaptique (Ghosh et al. 2016). Lors de la SUMOylation, une petite protéine d'environ 100 acides aminés, appelée petit modificateur de type ubiquitine (Small Ubiquitin-like Modifier ; SUMO) est conjuguée de manière réversible à un résidu lysine (Lys) de la protéine cible. La SUMOylation d'une protéine peut avoir différents effets, mais elle affecte généralement la conformation structurelle et donc souvent les affinités de liaison de la protéine (Schorova et Martin 2016). Dans le cas de la géphyrine, une équipe a découvert que la géphyrine était SUMOylée au niveau de deux résidus : Lys148 dans le domaine G et Lys724 dans le domaine E. Un double mutant, où les deux résidus ont été remplacés par une arginine, a montré une légère augmentation de la taille et de la densité des clusters de géphyrine et une augmentation de l'excitabilité GABAergique (Ghosh et al. 2016). La SUMOylation de ces résidus régulerait donc négativement le pool synaptique de la géphyrine. De plus, les chercheurs ont trouvé un nouveau site d'acétylation (Lys666) localisé dans le domaine E. Une mutation constitutivement active à ce site a entraîné une légère augmentation de la taille des clusters de géphyrine, tandis qu'une mutation en perte de fonction n'a eu aucun effet (Ghosh et al. 2016).

Les différentes MPT sont mutuellement interdépendantes, ajoutant encore un niveau de complexité. Par exemple, la déphosphorylation de Ser268 impact négativement l'acétylation et la SUMOylation de la géphyrine (Ghosh et al. 2016). Inversement, une diminution de la SUMOylation de la géphyrine a entraîné une phosphorylation plus faible de Ser270, sans toutefois affecter la phosphorylation de Ser268 (Ghosh et al. 2016). Cela

ouvre de nouvelles questions concernant l'ordre d'action, la localisation, la coopération ou l'action antagoniste des MPT sur la géphyrine. Dans l'ensemble, la géphyrine agit comme point de convergence de multiples voies de signalisation qui ont chacune des sites effecteurs spécifiques, se chevauchant partiellement. L'effet résultant sur le potentiel de formation de clusters de la géphyrine dépend donc de l'effet global des différentes voies convergeant, potentiellement dans différentes localisations cellulaires, dont la complexité est encore loin d'être entièrement comprise. Il est important de noter que pour chacune des modifications, les conséquences sur le regroupement de la géphyrine ont été corrélées avec des changements similaires dans la signalisation GABAergique ou glycinergique : les réarrangements structurels du réseau de la géphyrine sont clairement instructifs et limitent le taux de disponibilité des récepteurs aux synapses.

3.5 - Epissage alternatif de la géphyrine

L'épissage alternatif et sa régulation

L'épissage alternatif des précurseurs de l'ARNm constitue un moyen important de contrôle génétique et une étape cruciale dans l'expression de la plupart des gènes. L'épissage alternatif affecte de façon marquée le développement humain et sa mauvaise régulation est à l'origine de nombreuses maladies humaines. L'épissage alternatif affecte considérablement le développement humain, et sa mauvaise régulation est à l'origine de nombreuses maladies humaines. Les transcrits de presque tous les gènes humains codant pour des protéines subissent une ou plusieurs

formes d'épissage alternatif, telles que l'inclusion ou le saut d'exons individuels " cassés ", le passage d'un site d'épissage 5′ à un site d'épissage 3′ alternatif, la rétention différentielle des introns, l'épissage mutuellement exclusif d'exons adjacents et d'autres modèles plus complexes de sélection de sites d'épissage (Pan et al., 2008, Wang et al., 2008). Toutes ces formes d'épissage nécessitent le spliceosome, une machine de plusieurs MDa qui catalyse les réactions d'épissage (Wahl et al., 2009).

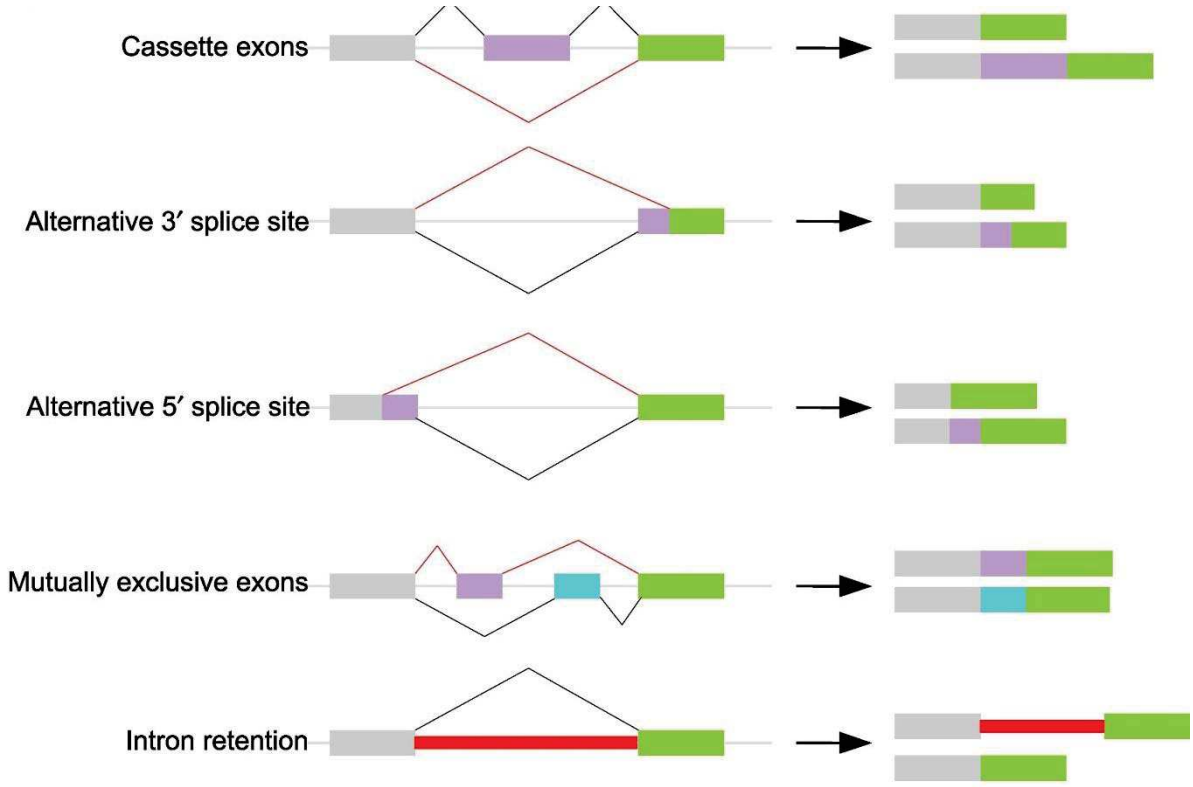


Figure 25 : Les différentes variations de l'épissage alternatif. (Wang et Aifantis, 2020)

L'épissage alternatif de la géphyrine et ses impacts fonctionnels

Une expression aberrante de GPHN a été observée dans l'hippocampe et le néocortex adjacent de patients souffrant d'épilepsie du lobe temporal et dans un modèle de TLE (temporal lobe epilepsy) chez le rat. Ces résultats sont en accord avec les déficits connus de transmission synaptique GABAergique dans la TLE. Une explication moléculaire potentielle de l'implication de la géphyrine dans l'hippocampe épileptique pourrait être des formes anormalement épissées d'ARN produites par un saut d'exon cellulaire induit par le stress, qui peut conduire à une protéine altérée ou inactive. Toutefois, aucune mutation génomique du GPHN n'a été signalée chez les patients épileptiques.

En plus de son implication potentielle dans l'épilepsie, la géphyrine a des liens fonctionnels avec plusieurs protéines synaptiques, dont des mutations ont été signalées dans une série de troubles du développement neurologique. Avec la collybistine, la géphyrine forme des complexes avec les protéines neuroligines postsynaptiques NLG2 et NLG4. La localisation et le regroupement postsynaptique spécifique de la géphyrine sont médiés par les membres de la famille des protéines de neurexine présynaptiques. Cette interaction complexe de la géphyrine avec les neurexines et les neuroligines atteste non seulement de son importance dans la formation et le fonctionnement corrects des synapses, mais présente également un intérêt particulier compte tenu des preuves substantielles impliquant ces molécules d'adhésion trans-synaptiques dans le risque génétique pour une série de troubles du développement neurologique, notamment les troubles du spectre autistique (TSA), la schizophrénie et l'épilepsie. En ce qui concerne plus particulièrement la géphyrine, de rares mutations ponctuelles de NLG2 et

NLG4 ont été identifiées chez des patients souffrant respectivement de schizophrénie et de TSA, tandis que des mutations du gène de la collybistine (ARHGEF9) ont été signalées dans des cas de déficience intellectuelle (DI) et d'épilepsie. On a également observé que des mutations à déplacement de cadre tronquant les gènes Nrxn1 et Nrxn2 chez des patients atteints de schizophrénie et de TSA, respectivement, abolissaient la capacité de ces protéines à induire un regroupement de géphyrine aux sites de contact des dendrites lorsque l'activité synaptogène était testée dans des essais de coculture de neurones. Les protéines Shank, qui agissent comme des protéines d'échafaudage neuronales postsynaptiques dans les synapses excitatrices (un rôle analogue à celui joué par la géphyrine dans les synapses inhibitrices), ont été impliquées par de rares mutations dans le risque génétique de TSA, de schizophrénie et d'épilepsie.

4 - Modèle d’étude : le cervelet

Le cervelet est notre modèle principal au cours de cette étude, et il s’agit également de la structure extensivement étudiée par le laboratoire. Ce choix de modèle s’explique par plusieurs points. Le cervelet est une structure bien caractérisée qui présente une organisation simple en couche, les types cellulaires présents dans ces couches, qui seront décrits plus bas, sont généralement simples à identifier par leur localisation et/ou leur morphologie. Ce projet s’intéresse à la diversité des synapses inhibitrices, or, le cervelet comporte de nombreux types de neurones inhibiteurs bien définis, formant différentes synapses et créant dans l’ensemble un réseau

suffisamment complexe pour apporter une réponse à notre question, mais également assez simple pour permettre une analyse aisée. La diversité des types cellulaires et des synapses trouvées dans le cervelet seront décrits plus bas dans ce chapitre, et devraient justifier le choix de notre modèle.

4.1 - Rôle du cervelet

Le rôle majeur attribué au cervelet est le contrôle moteur (Fine, Ionita, et Lohr, 2002 ; Koziol et al., 2014 ;). Plus précisément, il reçoit des informations sensorielles ainsi que les outputs moteurs en provenance du cortex et est responsable du raffinement de la réponse motrice, affinant la précision spatiale et temporelle du mouvement et coordonnant les mouvements multiples. Outre ses connexions avec les cortex sensoriel et moteur, le cervelet échange également avec les régions pariétales et préfrontales, le cervelet se retrouve impliqué dans des fonctions cognitives telles que l'apprentissage, le langage, la représentation dans l'espace (Schmahmann, 2019 ; Mariën et Borgatti, 2018 ; Hull, 2020).

Les conséquences fonctionnelles dues à des dysfonctions du cervelet forment un large panel directement lié à ses fonctions.

L'ataxie regroupe les symptômes liés à la fonction motrice du cervelet, et comprend l'inhabilité à produire des mouvements coordonnés, démarche altérée, difficultés d'apprentissage moteur, troubles du langage. Les différents types d'ataxie sont corrélés avec la zone du cervelet spécifiquement touchée par une lésion. Les causes sont multiples et peuvent être d'ordre génétique, infectieux, traumatique, auto-immune (Marsden, 2018).

Bien que longtemps ignoré dans les épilepsies, des études montrent que l'implication du cervelet dans le réseau n'est pas négligeable, et des altérations de son activité lors de crises ont été observées, et une modulation de l'activité du cervelet peut atténuer l'épilepsie (Streng et Krook-Magnuson, 2020 ; Lv et al.,2018 ; Klinger et Mittal, 2018).

Des études récentes pointent vers un lien entre le cervelet et les troubles du spectre de l'autisme qui vont au-delà du contrôle moteur et touchent aux fonctions sur le comportement social. Des altérations anatomiques du cervelet sont très prévalentes chez les sujets atteints et des différences développementales sont observables tant sur le plan structurel que fonctionnel (Wang, Kloth, et Badura, 2014 ; Becker et Stoodley, 2013).

Les découvertes quant au rôle du cervelet dans les fonctions cognitives ont poussé à réviser son implication dans la schizophrénie et plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer cela (Yeganeh-Doost et al., 2011 ; Brady et al., 2019).

4.2 - L'organisation et types cellulaires composant le cervelet

4.2.1 - L'organisation en couches

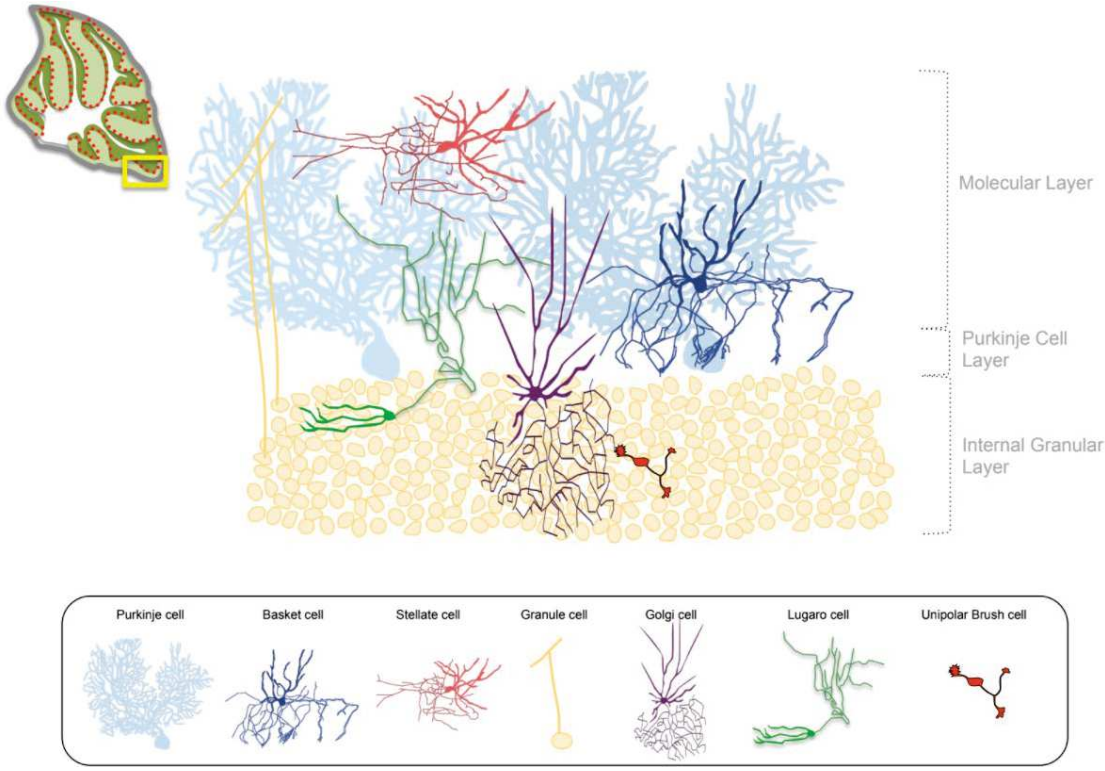


Figure 26 : L'organisation en couche et les types cellulaires du cortex cérébelleux. (Ango, non-publié)

Le cervelet est une structure située à l'arrière du cerveau, immédiatement derrière le pont, et séparé, il est organisé en dix lobules, et comme le cortex, il est également divisé en hémisphère mais comporte une partie centrale appelée vermis. Le cervelet est également composé de couches qui contiennent différents types cellulaires (Voogd et Glickstein, 1998 ; Roostaei et al., 2014). Le cortex cérébelleux est divisé en trois couches. La couche moléculaire est la plus externe, elle contient les interneurones en étoile et les interneurones en panier, tous deux inhibiteurs, ainsi que les dendrites des cellules des Purkinje. La couche des cellules de Purkinje, immédiatement en dessous, contient le corps cellulaire de ces dernières, les cellules de Purkinje, sont alignées en une seule épaisseur sur cette couche et étendent leur arbre dendritique vers la couche moléculaire. La couche

granulaire interne est en dessous, et est majoritairement composée des cellules granulaires, ainsi qu'une variété d'interneurones inhibiteurs, à savoir les cellules de Golgi, les cellules de Lugaro, les cellules globulaires, les cellules unipolaires en brosse. En dessous de ce cortex cérébelleux, la matière blanche, qui contient principalement les axones myélinisés entrants et sortants du cervelet. C'est également au sein de la substance blanche que se trouvent les noyaux profonds (D'Angelo, 2018).

4.2.2 - Les cellules de Purkinje

Les cellules de Purkinje sont les neurones principaux du cervelet. Ce sont des neurones inhibiteurs GABAergiques qui représentent la seule voie de sortie des signaux issus du cervelet. Ces neurones sont parmi les plus volumineux du système nerveux et ont une morphologie caractéristique. Ils sont composés d'un corps cellulaire qu'on retrouve alignés en une épaisseur sur la couche des cellules de Purkinje. Depuis ce corps cellulaire part vers la couche moléculaire un grand arbre dendritique qui ne s'étend que dans le plan sagittal, enfin, l'axone des cellules de Purkinje part et traverse la couche moléculaire interne pour rejoindre la substance blanche et enfin sortir du cervelet (Hirano, 2018).

Les cellules de Purkinje reçoivent des inputs de chaque couche du cervelet. Les interneurones inhibiteurs de la couche moléculaire, les cellules en étoile font majoritairement synapses sur l'arbre dendritique des Purkinje, tandis que les cellules en panier innervent principalement le corps cellulaire, plus précisément le segment initial de l'axone. Les cellules de Purkinje reçoivent également des inputs excitateurs. Les cellules granulaires, glutamatergiques,

contactent les arbres dendritiques des cellules de Purkinje via les fibres parallèles. Les cellules de Purkinje reçoivent également les inputs excitateurs venant de l'olive bulbaire via les fibres grimpantes (Hirano, 2018).

4.2.3 - Les interneurones de la couche moléculaire

Les interneurones de la couche moléculaire sont les cellules en étoile et les cellules en panier. Bien que difficiles à distinguer du point de vue moléculaire, ces interneurones GABAergiques sont morphologiquement différents. Les cellules en étoile sont plus proches de la surface piale, et leur axone étendu innerve l'arbre dendritique des cellules de Purkinje. Les cellules en panier sont plus proches de la couche des cellules de Purkinje, et leur axone vise le segment initial de l'axone des cellules de Purkinje, formant la caractéristique synapse en pinceau (Sotelo, 2003). Outre leurs différences morphologiques, leur mode de migration diffère également. Issus de la zone ventriculaire cérébelleuse (CVZ) et entrant le cervelet par la substance blanche, les deux sous types migrent de façon radiale vers la couche moléculaire. Alors que les cellules en panier s'arrêtent de migrer en bas de la couche moléculaire, les cellules en étoiles migrent plus haut, et après une réorientation se répartissent dans la couche moléculaire par une migration tangentielle (Galas et al., 2017).

4.2.4 - Les cellules granulaires

Les cellules granulaires sont les cellules les plus nombreuses et parmi les plus petites du cerveau. Elles se trouvent dans l'épaisse couche granulaire interne où elles envoient un faible nombre de courtes dendrites où se forment un complexe synaptique appelé glomérule. Au sein de ces glomérules, les dendrites des cellules granulaires sont contactées par les axones des cellules de Golgi qui sont inhibitrices, et les fibres moussues, qui sont un des inputs excitateurs majeurs du cervelet. Les cellules granulaires envoient un axone qui traverse la couche des cellules de Purkinje et arrive dans la partie supérieure de la couche moléculaire où il se sépare en deux pour former une fibre parallèle qui, en traversant les arbres dendritiques des cellules de Purkinje, forme un grand nombre de synapses glutamatergiques représentant un des inputs excitateurs que reçoivent les cellules de Purkinje (D'Angelo, 2018).

4.2.5 - Les interneurones de la couche granulaire

-Les cellules de Golgi : Ce sont des interneurones inhibiteurs de grande taille, avec un arbre dendritique et un axone très branché, qui font contactent et modulent la synapse entre une fibre moussue et les dendrites des cellules granulaires, au sein des glomérules. Les axones des cellules de Golgi font également synapse sur les cellules unipolaires en brosse. Les arbres dendritiques des cellules de Golgi traversent la couche des cellules de Purkinje et s'étendent dans la couche moléculaire, où ils reçoivent des inputs provenant des fibres parallèles ainsi que des interneurones inhibiteurs de

cette couche. Ils reçoivent également directement des inputs des fibres moussues. Ils ont également la particularité d'être parfois purement GABAergiques, parfois purement glycinergique, et parfois expriment les deux neurotransmetteurs (Galliano, Mazzarello, et D'Angelo, 2010).

-Les cellules de Lugaro : Morphologiquement comparables aux cellules de Golgi et étant également GABAergiques et glycinergiques, ils diffèrent de ces derniers par la localisation de ses neurites (Melik-Musyan et Fanardzhyan, 2004). L'arbre dendritique des cellules de Lugaro reste confiné dans la couche granulaire interne, tandis que l'axone remonte pour innerver les dendrites des interneurones présents dans la couche moléculaire, soit les cellules en étoile et en panier, mais aussi les cellules de Golgi (Lainé et Axelrad, 1998).

-Les cellules globulaires : Décrites plus récemment et encore peu étudiées, elles sont aussi GABAergiques et glycinergique, mais leur arbre dendritique et leur axone se localisent uniquement dans la couche moléculaire (Hirono et al., 2012).

-Les cellules unipolaires en brosse : Ce sont des neurones excitateurs glutamatergiques présentant un petit corps cellulaire duquel émerge une seule dendrite qui se ramifie en dendrioles. Ces cellules sont impliquées dans le glomérule, elles reçoivent également des inputs des cellules de Golgi, et participent à la modulation des inputs excitateurs reçus par les cellules granulaires (Víg et al., 2005 ; Mugnaini, Diño, et Jaarsma, 1997).

4.3 - Formation du cervelet au cours du développement

L'organisation en couche du cervelet évolue au cours du développement. Chez la souris, les couches se mettent en place tard dans le stade embryonnaire et n'atteignent leur conformation finale que seize jours environ après la naissance. Les cellules de Purkinje se développent dans la zone ventriculaire cérébelleuse et migrent vers la surface piale jusqu'à s'aligner et former la couche des cellules de Purkinje. Les cellules granulaires issues de la lèvre rhombique s'accumulent d'abord sous la surface piale et forment la couche granulaire externe. Après une étape de prolifération et de maturation, ces cellules migrent de façon radiale vers l'intérieur pour former la couche granulaire interne (Hibi et Shimizu, 2012).

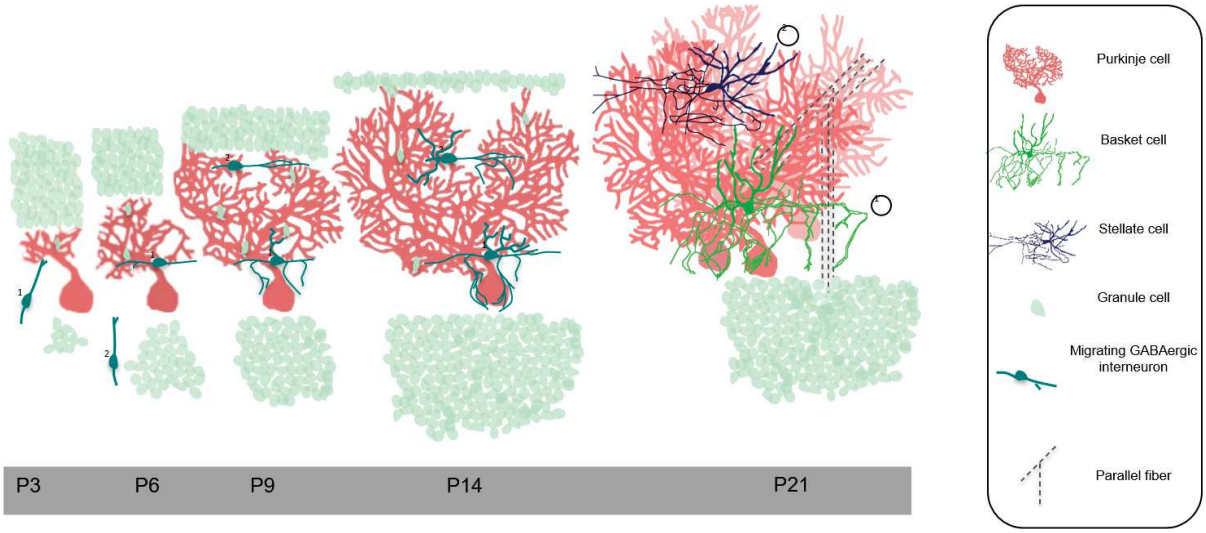


Figure 27 : La migration neuronale et mise en place des couches au cours du développement. (Cadilhac et al., en cours de publication)

OBJECTIFS DE LA THÈSE

Objectifs de la thèse

La grande problématique de mon projet de thèse repose sur la difficulté que l'on éprouve à rejoindre la grande diversité des synapses inhibitrices avec la faible diversité moléculaire présente à ces synapses. Cette observation est d'autant plus évidente lorsque l'on effectue la comparaison avec la diversité des molécules présentes à la synapse excitatrice. Alors qu'un large éventail de protéines d'échafaudage et de liaison ont été identifiées et étudiées chez les synapses inhibitrices, formant un panel de molécules capables de supporter la diversité des synapses excitatrices, la chose n'est pas vraie chez les synapses inhibitrices. Les études de l'organisation des synapses inhibitrices pointent en grande majorité vers une seule protéine, la géphyrine. La question était donc de comprendre comment une organisation synaptique basée principalement sur une seule protéine pouvait supporter la grande diversité des synapses inhibitrices. Cette problématique nous a poussé à proposer plusieurs hypothèses concernant la géphyrine. L'une étant que les modifications post-traductionnelles auxquelles la géphyrine est soumise lui permettrait de revêtir un plus large et panel de fonctions correspondant à la diversité des synapses inhibitrices. Bien que de nombreux travaux ont été effectués pour répertorier les modifications post-traductionnelles affectant la géphyrine, la liste n'est pas complète et l'impact de ces fonctions n'est pas tout le temps évalué de façon unanime. L'autre hypothèse est que la géphyrine puisse être soumise à l'épissage alternatif. La présence ou absence de certains exons changerait effectivement les domaines présents dans la séquence protéique, altérant potentiellement jusqu'à la conformation de la protéine. L'impact sur la fonction de la géphyrine et la versatilité de l'épissage alternatif permettrait également à la

géphyrine d'organiser différentiellement les divers types de synapses inhibitrices.

La deuxième hypothèse est en partie soutenue par l'existence déjà avérée de variants d'épissage de la géphyrine. Certaines études chez la souris et l'humain révèlent une fonction altérée de la géphyrine lorsque certains exons sont absents de la séquence, avec des conséquences parfois drastiques sur le système nerveux (épilepsie…).

Le premier but de ma thèse était donc d'étudier en profondeur et avec des méthodes plus récentes/adaptées l'épissage alternatif de la géphyrine afin de recenser la totalité des variants ainsi que leur séquence.

Notre but a par la suite été de répondre à deux grandes questions : Y a-t-il une distribution spécifique des variants de la géphyrine sur différents types de synapses? Et quelles sont les conséquences fonctionnelles de l'épissage alternatif de la géphyrine? La première question rejoint l'hypothèse principale en supposant que si l'épissage alternatif de la géphyrine a un rôle dans la diversité des synapses inhibitrices, on peut supposer que certains variants vont être préférentiellement localisés à certains types de synapses.

La deuxième question repose sur les connaissances déjà acquises sur les fonctions de certains domaines de la géphyrine, et suppose qu'une altération de la séquence protéique de la géphyrine par ajout ou épissage d'exon pourrait rendre certains sites d'interactions avec des partenaire de la géphyrine, ou certains site de modifications post-traductionnelles, inutilisables. La fonction associée à ce domaine serait donc altérée et la protéine elle-même pourrait donc assumer un rôle différent.

Ma contribution dans les travaux qui sont présentés dans l'article ci-dessous comprend toute la partie immunohistochimie, l'étude de surexpression des variants via vecteurs viraux dans les cultures cellulaire et in vivo par injections stéréotaxiques, ainsi qu'une participation à l'analyse des résultats du séquençage.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Title: Alternative splicing of Gephyrin settles inhibitory synapse diversity

One Sentence Summary: Gephyrin isoforms determine the formation of inhibitory synapse subclasses.

Authors: R. Dos Reis[1#], E. Kornobis[2, 3], A. Pereira[1#], J. Carrasco[4, 5], C. Jahannault-Talignani[1], C. Muchardt[4], A. Schlosser[7], H. M. Maric[7], F. Ango[1#]*† and E. Allemand[4, 6] *†.

Affiliations:

[1] IGF, Univ. Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France.

[2] Biomics, C2RT, Institut Pasteur, Paris, France.

[3] Hub Bioinformatique et Biostatistique, Département de Biologie Computationnelle – USR 3756 CNRS, Institut Pasteur, Paris, France.

[4] UMR3738, Unité de Régulation Epigénétique, Institut Pasteur, Paris, France.

[5] Max Planck Institute of Immunobiology and epigenetics, Freiburg, Germany.

[6] INSERM, Paris, France

[7] Institute of Structural Biology, Rudolf Virchow Center for Experimental Biomedicine, University of Würzburg, Josef-Schneider-Str. 2, 97080 Würzburg, Germany; Department of Biotechnology and Biophysics, Biocenter, University of Würzburg, Am Hubland, 97074 Würzburg, Germany.

Present address: INM, UMR1051, Hôpital Saint-Eloi, Montpellier, 34000, France.

*Correspondence to: fabrice.ango@inserm.fr and eric.allemand@inserm.fr.

† These two authors should be regarded as equal contributors.

Abstract:

The diversity of inhibitory synapses is upheld by multiple classes of interneurons with distinct morphologies, connectivity patterns and physiological properties. Yet, the specific molecular determinants of inhibitory synapse diversity remain largely unknown. Here we studied the universal scaffold and master regulator of inhibitory synapses, namely gephyrin (*Gphn)*. We discovered 277 *Gphn* splice variants expressed during brain development, generating a Gphn proteome with distinct neuronal localization and neurotransmitter receptor clustering properties. Our data reveals how changes in expression of *Gphn* isoforms control inhibitory synapse formation in the cerebellar cortex, thus demonstrating that isoform complexity of a single postsynaptic scaffolding protein contributes to the molecular diversity of inhibitory synapses in the brain.

Main Text:

Brain organization relies on excitatory projecting neurons and inhibitory interneurons. The latter class represents only 20% of the total but distributes into sixty distinct sub-types of neurons differing in morphology, connectivity pattern and function (*1, 2*). Within the intricate *neuronal* network they form, the inhibitory synapses are thought to be the quintessence of synaptic diversity. While excitatory synapses ground their diversity in the multiplicity of scaffolding proteins (*3-5*), the molecular basis for the diversity of inhibitory synapses remains largely unknown. These synapses express essentially only one scaffolding protein, namely gephyrin (GPHN). Universal hallmark (*6*) and master regulator (*7*) of the inhibitory

synapse, GPHN acts as an anchor beneath the postsynaptic membrane and is required for clustering of glycine (*8*) and γ-aminobutyric-acid type-A ($GABA_A$) receptors (*6, 7, 9*). The relative simplicity of inhibitory synapse organization is contrasting with their various functions in the brain and their involvement in neurological disorders such as epilepsy, autism, and schizophrenia (*10, 11*).

Alternative splicing is a source of mRNA complexity that expands the diversity of cell adhesion molecules for the definition of synapse specificity (*12-16*). However, such regulation remains overlooked for the scaffolding proteins, though it holds the promise of differentiated synapse assembly (*17*). Currently, several *Gphn* exons are annotated as alternatives, but only two GPHN isoforms are documented by variant expressed sequence tag (EST) in the mouse *Ensembl* database (Fig.S1A). To obtain an exhaustive catalog of full-length *Gphn* transcripts in mouse cortex and cerebellum, we performed a target gene analysis using *Single Molecule Real-Time* (SMRT) sequencing (Fig.S1B). *Gphn* cDNAs were amplified using a low number of PCR cycles to minimize template switching then sequenced with Pacific Biosciences (PACBIO) technology yielding long reads (*18*). A custom-made bioinformatic pipeline identified 42033 high quality circular consensus sequences (CCS), further grouped by clusters of identical sequence, each defining a *Gphn* alternative mRNA transcript (Fig.S1C). In total, we detected 277 unique transcripts, documenting that *Gphn* is subjected to extensive alternative splicing (*Gphn*-1 to *Gphn*-277, ordered by descending abundance; Fig.1A and Table S1). Surprisingly, only one of the two ESTs present in the databases (*Gphn*-4) was identified in our dataset, suggesting that the other is strictly expressed outside of the brain (Fig.S1A). More importantly, the most abundant transcript (*Gphn*-1), which accounted

for 68% of *Gphn* in the brain, is as-yet undescribed. This implies that all previous gephyrin studies were conducted without the major transcript.

Our data further unveiled five entirely novel *Gphn* exons, as well as multiple exons annotated to alternative transcript(s) but, so far, without experimental validation. We also detected hundreds of new *Gphn* splice junctions, as well as several unannotated alternative 3' splice sites (ss). Each exon is part of a myriad of different transcripts, emphasizing how difficult it is to detect a unique transcript by conventional method (Fig.S1D). By limiting RT-PCR assays only to transcripts containing unannotated alternative 3'ss, we validated their expression including those appearing only once (*Gphn*-192, -203 and -244, Fig.S1E-I). Altogether, our data redefines the *Gphn* locus with forty, rather than thirty exons (Fig.1B and 1C). Several of the variants were differentially expressed in brain versus muscle or heart, suggesting that novel *Gphn* transcripts are under the control of tissue and cell-specific regulatory pathways (Fig.S1E and Table S1). Using publicly available RNA-seq data we expanded our studies over eight different cell types from the central nervous system, including neurons and astrocytes (Fig.S1J and (*19*)). In these data, we detected several of the unannotated *Gphn* exons identified in our PACBIO sequencing (E9, E16, E22), and acquired evidence for cell subtype-specific regulation of *Gphn* splicing. Notably, using a library of 2.9 billion short reads obtained by analysis of total gene expression (Table S2), we found that a significant part of the exon-exon junctions remained undetected, unveiling the importance of targeted long read sequencing to capture the diversity of *Gphn* expression. In all, our data completely reframe our understanding of *Gphn* expression. In fact, we found that all internal exons were alternatively spliced, in contrast to the current view that holds 20 *Gphn* exons as constitutive (SM1 and Fig.1A and

S1D). To our knowledge, *Gphn* is the first high complexity gene (>10 exons) where such extensive regulation is observed, revealing an unexpected high complexity of *Gphn* expression.

RT-PCR performed on purified polysome from mouse brain identified three new *Gphn* transcripts and provided evidence that they get engaged onto the translation machinery (Fig.S2A). We next assessed the theoretical proteome of GPHN (Fig.2A and Table S3). Bioinformatic tracking of open reading frames (ORFs) identified 31 potential translation initiation sites (TIS) and 402 ORFs spanning at least three hundred nucleotides. These included 253 ORFs initiated at TIS supported by publicly available ribosome profiling data. Interestingly, we noted that multiple alternative transcripts can code for a same ORF. These duplicated ORFs as well as those finishing at a premature stop codon (PTC) which is expected to drive them for degradation by nonsense-mediated mRNA decay were not taken up for further consideration, reducing the theoretical GPHN proteome to 154 ORFs. Notably, the predicted molecular weights of GPHN isoforms (Fig.S2B) are surprisingly close, hence possibly producing the single band typically detected in Western blots with anti-GPHN antibodies (Fig.S2C).

Next, we explored to what extend the diversity of *Gphn* mRNA species is translated to GPHN protein isoforms in mouse brain tissues *in vivo*. To avoid the limitations of conventional immunoprecipitation of gephyrin that requires the presence of the antibody-binding epitope, we used functional pull-down assays. A peptide fragment developed (*20*) to target the universal receptor binding site of gephyrin (*21*) was used to isolate all gephyrin isoforms with the capacity of interacting with neurotransmitter receptors (Fig.2B, S2D and (*20*)). Tandem Mass Spectrometry (MS) analysis of the

GPHN isolated from whole mouse brain lysates identified 2428 unique peptides that encompassed over 95% of our predicted GPHN proteome (Table S3 and S4). We also validate peptides corresponding to 21 undocumented exon-exon junctions, as well as 4 new exons, and 1 uncanonical TIS (Fig.2C and 2D). Altogether, MS provided experimental evidence for 100+ new GPHN isoforms demonstrating that the complexity of the *Gphn* transcriptome is indeed transferred to the GPHN proteome.

Next, we sought variations in the expression of specific transcripts in space or time using SMRT sequencing. We found that many of the most abundant transcripts (*Gphn*-1 to -60) displayed distinct profiles, across defined developmental stages, in cortical and cerebellar cortices (Fig.3A). It was tempting to speculate that *Gphn* alternative transcripts coded for GPHN isoforms fulfilling specific functions, suggesting that they are not redundant and are under precise regulation during the neural development.

GPHN mediates numerous intramolecular and intermolecular protein-protein interactions via its E and G domain as well as with its central unstructured region (Fig.S3A). These interactions are required for molecular assembly and proper function of post-synaptic components and inhibitory receptors (Fig.S3A). To determine whether alternative splicing of *Gphn* may differentially contribute to GPHN cluster and subsequent GABAergic synapse formation in neurons, we reconstructed and transduced into primary cultures of hippocampal neurons several *Gphn* cDNAs of variants containing either deleted or additional protein sequences (Fig.3B, 3C, S3B and S3C). As expected, all exogenous isoforms that harbor the complete E domain, GPHN-1, -5, -6, -8 and -14 induced GPHN clusters. In stark contrast, splicing regulation affecting the E domain severely affected

synaptic clustering capacity of GPHN resulting in a diffuse distribution in neurons (GPHN-7, -10, -28, -32, -42 and -49; Fig.3C and S3C). Our analysis further highlighted the contribution of both the central linker and the G domain to GPHN cluster numbers and size (Fig.3D and 3E). We see that GPHN-1 induced the highest density of clusters and that the presence of short additional splicing cassettes in GPHN -6 and -8 was sufficient to reduce cluster numbers. In addition, immuno-staining of the inhibitory presynaptic marker GAD65 demonstrated that neurons expressing GPHN-5, -8 and -14 received a higher density of inhibitory synapses than neurons expressing GPHN-1 and -6 did (Fig.3F). Furthermore, several variants displaying a diffuse distribution in neuron negatively affected formation/upkeep of inhibitory synapses (GPHN-28, -32 and -42) (Fig. 3G). Thus, GPHN isoforms carried distinct properties to cluster and localize at synapses. We also noted that they differentially regulated the formation of inhibitory synapses *in vitro*, and it was tempting to propose that altering the balance between GPHN isoforms in neurons controlled inhibitory synapse formation and/or maintenance.

To study endogenous GPHN, we utilized four antibodies each recognizing different epitopes in the central region and E domain of the protein (Fig.4A). GPHN-1 harbors all of the epitopes and was detected by all antibodies, while shorter isoforms lacking one of the epitopes were each recognized by a specific combination of antibodies (Fig.S4A and S4B). Using these antibodies on cerebellar slices revealed that GPHN synaptic clusters are detected heterogeneously, indicating a diversity in the epitopes incorporated at different synapses, which was consistent with specific GPHN isoform combinations at synapses (Fig.4B, 4C and S4C, S4D). We next tested whether the endogenous GPHN isoforms displayed any distinct

sub-cellular localization. For this, we examined Purkinje cells (PCs) innervated by molecular layer inhibitory interneurons (Fig.4D). Using three of the antibodies recognizing different epitopes in GPHN, we found that the relative abundance of each combination of epitopes varied from dendrites to cell bodies, suggesting a distinct subcellular GPHN isoform distribution (Fig.4E, S4E and S4F). Our approach also allowed *in vivo* access to inhibitory synapses containing different $GABA_AR$ α subunits (*22-25*) (Fig.4D, 4F and S4G to S4I). We found that synapses distinguished by the $GABA_AR$ α subunit also displayed differences in the relative abundance of GPHN epitopes (Fig. S4J). This result was consistent with synapse subtype-specific assembly of GPHN isoforms. We also noted that in PC dendrites GPHN-1 and -8 were detected at only 50% and 65% of GAD65 positive synapses respectively (Fig.S4K and S4L), further supporting a distribution of GPHN isoforms in complex patterns. In addition, GPHN-1 and -8 but not GPHN-28, were also found at the axon initial segment of PCs (*26, 27*) (Fig.S4M). Thus, our data have revealed a heterogenous distribution of GPHN at the various synapses *in vivo*, and further document that distinct types of inhibitory synapses are assembled from an array of different GPHN isoforms.

Finally, we changed the relative abundance of *Gphn* transcripts *in vivo* and detected the inhibitory synapse formation by measuring density of the pre-synaptic marker GAD65 (Fig.4G and 4H). Several of the GPHN cDNAs corresponding to *Gphn* alternative transcripts were transduced into mouse cerebellum, thereby enriching the pool of GPHN isoforms with specific variants. Density of inhibitory synapses was similar *in vivo* with exogenous expression of the control Scarlet and GPHN-1, -6, -10, -32 and -49, while

GPHN-14, -28 and -42 led to a decrease and GPHN-8 to an increase. These results corroborated our *in vitro* observation (Fig.3G) and demonstrated that changing the ratio of some of the *Gphn* transcripts had direct consequences on inhibitory synapse formation and/or maintenance in mouse cerebellum.

Overall, our study reveals an extremely complex regulation of the major scaffolding protein GPHN by alternative splicing. This mechanism, in complement of post-translational modifications, established a huge structural diversity of GPHN, which mirrors the wide diversity of inhibitory circuits. Misregulation of *Gphn* and expression of unconventional isoforms (produced by irregular splicing) are risk factors in neuropsychiatric pathologies including schizophrenia, Autism Spectrum Disorders (ASDs), and epileptogenesis (*26, 28, 29*). Therefore, our study suggests that in addition to the analysis of *Gphn* expression level in neuronal disorders, the characterization of GPHN splice variants and the quality of their expression are mandatory to discover their impact on inhibitory synapses functions.

References and Notes

1. A. Paul *et al.*, Transcriptional Architecture of Synaptic Communication Delineates GABAergic Neuron Identity. *Cell* **171**, 522-539 e520 (2017).
2. E. Favuzzi *et al.*, Distinct molecular programs regulate synapse specificity in cortical inhibitory circuits. *Science* **363**, 413-417 (2019).
3. F. Zhu *et al.*, Architecture of the Mouse Brain Synaptome. *Neuron* **99**, 781-799 e710 (2018).
4. M. Migaud *et al.*, Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature* **396**, 433-439 (1998).
5. B. M. Muller *et al.*, SAP102, a novel postsynaptic protein that interacts with NMDA receptor complexes in vivo. *Neuron* **17**, 255-265 (1996).
6. C. Essrich, M. Lorez, J. A. Benson, J. M. Fritschy, B. Luscher, Postsynaptic clustering of major GABAA receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin. *Nat Neurosci* **1**, 563-571 (1998).

7. S. K. Tyagarajan, J. M. Fritschy, Gephyrin: a master regulator of neuronal function? *Nat Rev Neurosci* **15**, 141-156 (2014).
8. G. Feng *et al.*, Dual requirement for gephyrin in glycine receptor clustering and molybdoenzyme activity. *Science* **282**, 1321-1324 (1998).
9. M. Kneussel *et al.*, Loss of postsynaptic GABA(A) receptor clustering in gephyrin-deficient mice. *J Neurosci* **19**, 9289-9297 (1999).
10. B. Chattopadhyaya, G. D. Cristo, GABAergic circuit dysfunctions in neurodevelopmental disorders. *Front Psychiatry* **3**, 51 (2012).
11. O. Marin, Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* **13**, 107-120 (2012).
12. E. Furlanis, P. Scheiffele, Regulation of Neuronal Differentiation, Function, and Plasticity by Alternative Splicing. *Annu Rev Cell Dev Biol* **34**, 451-469 (2018).
13. J. Ule, B. J. Blencowe, Alternative Splicing Regulatory Networks: Functions, Mechanisms, and Evolution. *Mol Cell* **76**, 329-345 (2019).
14. D. Schreiner *et al.*, Targeted combinatorial alternative splicing generates brain region-specific repertoires of neurexins. *Neuron* **84**, 386-398 (2014).
15. B. Treutlein, O. Gokce, S. R. Quake, T. C. Sudhof, Cartography of neurexin alternative splicing mapped by single-molecule long-read mRNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, E1291-1299 (2014).
16. E. Furlanis, L. Traunmuller, G. Fucile, P. Scheiffele, Landscape of ribosome-engaged transcript isoforms reveals extensive neuronal-cell-class-specific alternative splicing programs. *Nat Neurosci* **22**, 1709-1717 (2019).
17. I. Paarmann, B. Schmitt, B. Meyer, M. Karas, H. Betz, Mass spectrometric analysis of glycine receptor-associated gephyrin splice variants. *J Biol Chem* **281**, 34918-34925 (2006).
18. M. T. Bolisetty, G. Rajadinakaran, B. R. Graveley, Determining exon connectivity in complex mRNAs by nanopore sequencing. *Genome Biol* **16**, 204 (2015).
19. Y. Zhang *et al.*, An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J Neurosci* **34**, 11929-11947 (2014).
20. H. M. Maric *et al.*, Gephyrin-binding peptides visualize postsynaptic sites and modulate neurotransmission. *Nat Chem Biol* **13**, 153-160 (2017).
21. H. M. Maric *et al.*, Molecular basis of the alternative recruitment of GABA(A) versus glycine receptors through gephyrin. *Nat Commun* **5**, 5767 (2014).
22. D. J. Laurie, P. H. Seeburg, W. Wisden, The distribution of 13 GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. II. Olfactory bulb and cerebellum. *J Neurosci* **12**, 1063-1076 (1992).
23. J. M. Fritschy, P. Panzanelli, J. E. Kralic, K. E. Vogt, M. Sassoe-Pognetto, Differential dependence of axo-dendritic and axo-somatic GABAergic

synapses on GABAA receptors containing the alpha1 subunit in Purkinje cells. *J Neurosci* **26**, 3245-3255 (2006).
24. M. D. Eyre, Z. Nusser, Only a Minority of the Inhibitory Inputs to Cerebellar Golgi Cells Originates from Local GABAergic Cells. *eNeuro* **3**, (2016).
25. Z. Nusser, W. Sieghart, F. A. Stephenson, P. Somogyi, The alpha 6 subunit of the GABAA receptor is concentrated in both inhibitory and excitatory synapses on cerebellar granule cells. *J Neurosci* **16**, 103-114 (1996).
26. R. Pizzarelli *et al.*, Tuning GABAergic Inhibition: Gephyrin Molecular Organization and Functions. *Neuroscience*, (2019).
27. Y. Gao, S. A. Heldt, Enrichment of GABAA Receptor alpha-Subunits on the Axonal Initial Segment Shows Regional Differences. *Front Cell Neurosci* **10**, 39 (2016).
28. B. Forstera *et al.*, Irregular RNA splicing curtails postsynaptic gephyrin in the cornu ammonis of patients with epilepsy. *Brain* **133**, 3778-3794 (2010).
29. A. C. Lionel *et al.*, Rare exonic deletions implicate the synaptic organizer Gephyrin (GPHN) in risk for autism, schizophrenia, and seizures. *Hum Mol Genet* **22**, 2055-2066 (2013).
30. M. Ramming *et al.*, Diversity and phylogeny of gephyrin: tissue-specific splice variants, gene structure, and sequence similarities to molybdenum cofactor-synthesizing and cytoskeleton-associated proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10266-10271 (2000).
31. P. Chomczynski, N. Sacchi, The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* **1**, 581-585 (2006).
32. A. Dobin *et al.*, STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**, 15-21 (2013).
33. A. R. Quinlan, I. M. Hall, BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* **26**, 841-842 (2010).
34. H. Li *et al.*, The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**, 2078-2079 (2009).
35. C. Camacho *et al.*, BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* **10**, 421 (2009).
36. G. S. Slater, E. Birney, Automated generation of heuristics for biological sequence comparison. *BMC Bioinformatics* **6**, 31 (2005).
37. Y. Liao, G. K. Smyth, W. Shi, featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* **30**, 923-930 (2014).
38. A. P. Fields *et al.*, A Regression-Based Analysis of Ribosome-Profiling Data Reveals a Conserved Complexity to Mammalian Translation. *Mol Cell* **60**, 816-827 (2015).

39. W. P. Lou, A. Baser, S. Klussmann, A. Martin-Villalba, In vivo interrogation of central nervous system translatome by polyribosome fractionation. *J Vis Exp*, (2014).
40. L. Mendoza *et al.*, Flexible and Fast Mapping of Peptides to a Proteome with ProteoMapper. *J Proteome Res* **17**, 4337-4344 (2018).
41. M. T. Liu, M. M. Wuebbens, K. V. Rajagopalan, H. Schindelin, Crystal structure of the gephyrin-related molybdenum cofactor biosynthesis protein MogA from Escherichia coli. *J Biol Chem* **275**, 1814-1822 (2000).
42. S. Xiang, J. Nichols, K. V. Rajagopalan, H. Schindelin, The crystal structure of Escherichia coli MoeA and its relationship to the multifunctional protein gephyrin. *Structure* **9**, 299-310 (2001).
43. B. Dejanovic *et al.*, Palmitoylation of gephyrin controls receptor clustering and plasticity of GABAergic synapses. *PLoS Biol* **12**, e1001908 (2014).
44. Y. Grosskreutz *et al.*, Identification of a gephyrin-binding motif in the GDP/GTP exchange factor collybistin. *Biol Chem* **382**, 1455-1462 (2001).
45. J. C. Fuhrmann *et al.*, Gephyrin interacts with Dynein light chains 1 and 2, components of motor protein complexes. *J Neurosci* **22**, 5393-5402 (2002).
46. T. Giesemann *et al.*, Complex formation between the postsynaptic scaffolding protein gephyrin, profilin, and Mena: a possible link to the microfilament system. *J Neurosci* **23**, 8330-8339 (2003).

ACKNOWLEDGMENTS:

We thank Y. Lallemand and Y. Porozhan for their help in perfusing mouse for ribosomal fractionation; the iExplore and RIO-Imaging Platforms of the IGF for their support, CSHL PacBio sequencing platform. We thank O. Mauger, E. Batché, O. Espeli and P. Carroll for critical reading of the manuscript. We thank L. Telley for his initial contribution to PACBIO analysis. Funding: Supported by IGF direction and J.P. Pin, and by ANR-14-CE12-0015-03 to F.A. Author contributions: A.F. and E.A. managed the study; R.D.R, F.A and E.A designed the experiments. R.D.R., A.P. J.C.C., C.J-T., M.M.H., A.S. and E.A. performed the experiments. M.M.H. and A.S. performed the proteomic experiments and A.S, E.A. the analysis. E.K and E.A performed PACBIO analysis. R.D.R., A.P. and F.A. analyzed the imaging data. E.A. and F.A. wrote the manuscript with contribution from all authors. Competing interests: None declared. Data and materials availability: PacBio RNA-seq data are present in the paper or the supplementary materials.

Legend of figures:

Fig. 1: Repertoire of *Gphn* alternative transcripts expressed in mouse brain.

(A) Illustration showing the 277 alternative *Gphn* transcripts identified from 42033 SMRT sequences, each line represents a distinct transcript and each column symbolizes one exon named at the bottom. Transcripts are ordered and named *Gphn*-1 to *Gphn*-277

for the most to the least detected, respectively. Exons are displayed as a rectangle, green for included, white for skipped and red for exon included with an alternative 3' splice site. The protein domains (G and E) and the central unstructured region (blue) of GPHN are represented at the top. The abundance of each transcript is reported on a bar graph established with a log scale. **(B)** Exon organization of *Gphn* locus depicted and adapted from Ensembl data are shown at the top, exons are alternatively colored in light and dark grey. Exons described in literature to be alternative are indicated and labeled with previously published nomenclature C1 to C7 (*30*). **(C)** Organization of *Gphn* exons revisited by this study. New exons are colored in blue (unannotated exon), those previously identified or predicted but never assigned to a specific transcript are colored in dark-blue (validated exon) and exons with alternative 3'ss are colored in red.

Fig.2: *Gphn* alternative transcripts are translated into GPHN protein isoforms.

(A) Filtering pipeline developed to establishes GPHN theoretical proteome, (i) TIS identification, (ii) ORF including at least 300 nucleotides, (iii) selection of ORFs beginning with a TIS confirmed by biological evidence, (iv) removal of duplicated ORFs, (v) withdrawal of ORFs including PTC. **(B)** Workflow for the exhaustive isolation of GPHN isoforms and tandem MS analysis. GPHN was isolated from whole brain lysate via affinity purification. All GPHN isoforms with neurotransmitter receptor binding capacity were purified in microgram scale using the peptide FSIVGRYRRRC (K_D (GPHN) = 140 nM). Gephyrin was reduced, alkylated, separated by SDS-PAGE, and digested in-gel with trypsin, elastase, thermolysin and papain. Analysis via Nano-LC MS/MS identified +2400 unique GPHN peptides, thus validating 95% of the theoretical proteome and +100 new GPHN isoforms. **(C)** Cartoon displaying exon-exon junctions (EEJ), or exons included in new ORFs for which mass spectrometry analysis identified corresponding peptides. **(E)** identified peptides (numbers) and corresponding *Gphn* features are indicated with the corresponding number of GPHN isoforms.

Fig.3: GPHN isoforms regulated during neural development displayed distinct synaptic properties.

Heat map graphical representation of *Gphn* transcripts expressed at P6, P9, P15 and P39 in cortex and cerebellum. **(B)** Schematic of selected GPHN isoforms. Differences in protein sequence compared to GPHN-1 are highlighted with dashed transparent rectangle (removal) and black rectangle (addition) or dashed-green (altered). **(C)** Confocal images of a proximal dendrite of cultured hippocampus neurons expressing Scarlet or Scarlet-tagged variants, pre-synaptic side was stained with anti-GAD-65. **(D)**

Density of GPHN clusters along the dendrite (n=12 cells from 3 cultures). **(E)** Size of the GPHN clusters. **(F)** Percentage of GPHN clusters associated with a GAD-65 punctum. **(G)** Density of GAD-65 puncta along the dendrite. ****P<0,0001, ***P<0,0010, **P<0,01, *P<0,05. One-way analysis of variance (ANOVA) for (D), (E) and (F). *P<0,05. Kruskal-Wallis test for (G). Scale bar: 15 µm.

Fig.4: Heterogeneous GPHN isoforms distribution underlies synaptic diversity and assembly.

Schematic of the GPHN-1 protein sequence with the epitopes detected by four GPHN antibodies (α-A, α-B, α-C, and α-D). **(B)** Immunofluorescence and quantification of GAD-65/VGAT colocalization with different GPHN epitopes in cerebellar slices. Enlarged view of the white dashed box are displayed to show the heterogenous distribution of synaptic GPHN epitopes. Example of higher magnification synapses labeled 1, 2, 3, 4 and 5. **(C)** Quantification of GAD-65/VGAT colocalization with multiple combinations of the GPHN antibodies. **(D)** Schematic of cerebellar cortex cellular organization. Specific inhibitory synapses between cerebellar neurons are indicated with numbered circle. At the right, a double entry table indicates specific markers for distinct synapses identified in the schematic. (ML: molecular layer, PCL: Purkinje cell layer, IGL: internal granular layer, PC: Purkinje cell, MLi: molecular layer interneurons, GLi: granular layer interneurons, GC: granule cell). **(E and F)** Quantification of GPHN epitopes expressed at distinct inhibitory synapses, **(E)** corresponding to the subcellular organization of inhibitory synapses at dendrites and cell body of PCs (n=3 mice) ****P<0,0001, **P<0,01, *P<0,05. Two-way ANOVA, while **(F)** shows their detections at synapses containing specific subunits of $GABA_A$-R. (n=3 mice) ****P<0,0001, ***P<0,0010, **P<0,01, *P<0,05. ns, not significant. Two-way ANOVA **(G)** Cerebellar cortex slices displaying inhibitory synapses stained with α-GAD65 and PCs transduced to express Scarlet or exogenous Scarlet-GPHN isoforms (n=3 mice for each isoform) **(H)** Quantification of GAD-65 density detected in panel G. (n=3 mice) ***P<0,0010, *P<0,05. Student t-test. Scale bar: 15 µm (B) and 25 µm (G).

Supplementary Materials for

Alternative splicing of Gephyrin settles inhibitory synapse diversity.

R. Dos Reis[1#], E. Kornobis[2, 3], A. Pereira[1#], JC. Carrasco[4, 5], C. Jahannault-Talignani[1], C. Muchardt[4], A. Schlosser[7], H. M. Maric[7], F. Ango[1#]*† and E. Allemand[4, 6] *†.

Correspondence to: fabrice.ango@inserm.fr and eric.allemand@inserm.fr.

Supplementary Materials:

Materials and Methods

Mice:

G42 (GAD67-GFP) and GlyT2 (GlyT2-GFP) maintained in C57BL/6 background (Charles River Laboratories) were used for immunohistochemistry experiments. Wild-type C57BL/6 were used for stereotaxic injection and immunohistochemistry experiments. Swiss mice (Janvier Laboratories) were used for primary neuron cultures. Animals were kept under standard conditions with controlled temperature and lighting and received food and water ad libitum. We followed the European and national regulations for the care and use of animals in order to protect vertebrate animals for experimental and other scientific purposes (Directive 86/609). All experiments were approved by the Animal Welfare and Ethical Review Body of Languedoc-Roussillon (APAFIS#11841-2017101614199895 v5).

Tissue preparation:

C57BL/6, G42 or GlyT2 mice aged 40 days were used. Animals were lightly anesthetized with isoflurane and then deeply anesthetized with sodium pentobarbital by intraperitoneal injection. Artificial Cerebro Spinal Fluid (ACSF; NaCl 126 mM, KCl 3 mM, NaH_2PO_4 1,25 mM, $NaHCO_3$ 20 mM, $MgSO_4$ 2 mM, Dextrose 20mM, $CaCl_2$ 2mM) was perfused transcardially for 2 minutes. The brains once extracted were placed 2 hours in 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS. The brains were then sectioned using a microtome (Leica) to obtain 50 µm slices kept in PBS at 4°C for 2 weeks maximum before use.

PacBio sequencing:

RNA was extracted from mouse cortex and cerebellum tissues as described (*31*), and a primer specific Reverse Transcription (RT) was performed with the primer GPHN-49: GTACTGTGCCTGAGGCTGC. *Gphn* expression was next amplified using two rounds of PCRs, first 20 cycles with the primers GCAGTCGAACATGTAGCTGACTCAGGTCACCCACGACCATCAAATCCGTGTC and TGGATCACTTGTGCAAGCATCACATCGTAGCAGGATACAGTCAATGATATGTGGACATGC, and after purification of PCR fragment a second PCR of 23 cycles was applied to each sample with Bar Coded (BC) primers: BC-GCAGTCGAACATGTAGCTGACTCAGGTCAC and BC-TGGATCACTTGTGCAAGCATCACATCGTAG. PCRs were purified with NucleoMag NGS Clean-up (Macherey-Nagel), quantified using Qubit, and stochiometric amount of each samples was finally mixed to build next the multiplexed library. Library was processed as suggested by PacBio and sequenced, 114458 reads were obtained post filtering with a mean size of 16,508 bases. CCS showed a mean size of 2,3kb.

PacBio and short reads analysis:

PacBio analysis: PacBio data were processed using informatic and manual approaches because the Isoseq 3.1.1software provided by PacBio did not provide homogeneous clusters of identical Circular Consensus Sequences (CCS). CCS were obtained from Cold Spring Harbor sequencing platform and aligned to the Mouse genome GRCm38.p6 using STARlong 2.5.3a (*32*). Genomic intervals showing alignments with the CCS (corresponding to potential exons) were extracted using bedtools 2.27.1merge (*33*) from merged bam files generated with samtools 1.6 (*34*). Each potential exon was extracted using bedtools 2.27.1 getfasta and checked by eyes to keep only those framed with canonical GT-AG dinucleotides at their splice sites. Retained exons were then aligned to CCS with blastn-short algorithm of blastn 2.2.31 (*35*) (using an evalue threshold of 0.001 and a penalty for nucleotide mismatch of -2) to annotate each CSS with a binary code 1 and 0 for the presence or absence of distinct exon. Theoretical transcripts were constructed by concatenating the exon sequences and according to their annotation, CCS were next aligned against each theoretical transcript sequence (using a gapped global alignment, similar to the Needleman-Wunsch algorithm with Exonerate 2.4.0) (*36*) to provide an alignment score used as quality control. Similar sequences were clustered together, and poorly aligned CCS were removed. Homogeneity of each cluster was checked visually using Snapgene software. Number of CCS present in each cluster was quantified in order to establish an overall assessment of alternative *Gphn* transcript expression. R 3.3.2 and ggplot were used to produce the overall isoform composition plot displayed Fig.1A.

Analysis of *Gphn* expression in brain cell types: *Gphn* exons expressed in distinct neuronal cell types were analyzed using Illumina data from (*19*) corresponding to total gene expression. An artificial sequence containing all *Gphn* exon junctions was used to align short reads using Hisat 2.1.0 (with the –no-spliced-alignment option). Using FeatureCounts 1.6.4 (*37*), the aligned reads were quantified to assess the expression of each exon. To compare exon expression between cell subtypes, we normalized their quantification by the overall total *Gphn* expression in each cell type.

Analysis to validate exon-exon junction of *Gphn* expression in mouse brain: *Gphn* exon junctions detected using short reads reported in 82 publicly available data sets (listed in Table S1). An artificial sequence containing all exon junctions found in Fig.1A was used to align short reads using Hisat 2.1.0 (with the –no-spliced-alignment option). Using FeatureCounts 1.6.4 (*37*), the aligned reads were quantified to assess junction detection. Finally, we compared them with read counts supporting each junction obtained by PacBio sequencing.

DNA constructs:

The cDNAs corresponding to selected *Gphn* alternative transcripts were built using QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit and cloned in a modified version of pLVX-puro vector for which CMV promoter was replaced by human Syn promoter. Each cDNA is cloned in 5' fusion with Scarlet and Flag-V5 tags. Lentiviral particles were produced using HEK-293 cells co-transfected with pLVX-FV5-Scarlet-GPHNs, p8.7 and pCMV-VSV-G, then concentrated by gradient centrifugation. All constructs used in this study are listed in Fig.S3A and available on request. Expression of exogenous proteins were probed by western blot using anti-V5 (Invitrogen).

***In silico* GPHN theoretical proteome:**

The following description is summarized in Fig.3A and reported in Table S. Each cDNA was processed with ORFfinder (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/) using a minimal ORF length of 300 nucleotides, "ATG" and alternative initiation codons parameters. The 31 translation initiation sites were next filtered with data published in (*38*) to retain only those supporting biological evidence. ORFs found more than once were removed as well as those containing a stop codon in exons upstream of exon 40 (such stop codon was considered as a PTC). ORFs obtained from this pipeline were named as the theoretical GPHN proteome. using Protein extracts from cerebellum, cortex, hippocampus, muscle, heart, and spleen were prepared and separated in PAGE-SDS to probe endogenous GPHNs by western blots using mab3B11.

RT-PCR analysis:

RNA extracted from cortex and cerebellum tissues at P7, P9, P13, P15, P21 and P40 were retro-transcribed with GPHN-49 (see PacBio library) and amplified by PCR using specific set of primers:

- Fig.S1E: GGAGTCCTCACAGCCCACATAAAC and CTAGCCACCTTGGTGATATCTACAGC
- Fig.S1F: CTCTTGCTGCAAAGTTGACCAACTTTAG and GTTCCTTTGGCCAAAACACACTC
- Fig.S1G: CAAGAAAGGATCTCAGTAGTGCAAGTTG and CTGATACCCTCATTCAAGGCATTGAG
- Fig.S1H: GTCCTCACAGTGGTTGCCG and CTGCATCTTTCTCAGTGCAGGTACAAC
- Fig.S1I: GAGTCCTCACAGGAAAGATTCGGG and GGTGATGCCAAGTCAGTATACACC

Finally, PCRs were analyzed in agarose gel and stained with ethidium bromide.

Polysome preparation:

Cytoplasmic extracts containing translation machinery were prepared from adult mouse brain as described (*39*) and RNAs were purified after dilution of sucrose fractions with H2O (50% v/v). Ribosomal RNAs (28S, 18S and 5S) were separated in agarose gel stained with ethidium bromide, while *Gphn* isoforms were amplified and analyzed as Fig.S1E.

Preparation of whole-brain lysates:

After cervical dislocation, whole brains from adult male/female C57BL6 wildtype mice were removed from the scull and rapidly cooled to 4°C and homogenized in 1 ml lysate buffer (20 mM HEPES, 100mM KCH3COOH, 40mM KCl, 5mM EGTA, 5mM MgCl2, 5mM DTT, 1mM PMSF, 1% Triton X, cOmpleteTM EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche, Mannheim, Germany), pH 7.2) per 200 mg using a pistol homogenizer (8 strokes at 900 rpm). The homogenate was centrifuged at 10,000 × g and 4°C for 15 min. The supernatant was aliquoted, and flash frozen in liquid nitrogen and stored at −80 °C.

Gephyrin isolation from brain lysate:

The resin for gephyrin pulldown was prepared in 400 µl micro-spin columns (Thermo Scientific, Karlsruhe, Germany). The Peptide FSIVGRYPRRRRC (K_D (Gephyrin) = 140 pM) (10.1038/nCHeMBIO.2246) was dissolved in coupling buffer (50 mM Tris,

5mM EDTA, pH 8.5) at a concentration of 1 mM and incubated for 2 h at RT with washed and equilibrated Ultra Link iodoacetyl resin (Thermo Scientific, Karlsruhe, Germany). The resulting resin was washed and residual iodoacetyl groups were quenched by incubation with 1 mM Cysteine for 2 h and stored at 4 °C after extensive washing with coupling buffer.

Whole-brain lysate was incubated on the prepared FSIVGRYPRRRRC-resin for 30 min at 4°C and washed three times with lysate buffer. Bound proteins were eluted with NuPAGE LDS sample buffer (Life Technologies) at 90°C for 3 min. Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) was added to a final concentration of 20 mM and incubated at 90°C to achieve complete reduction. Subsequently proteins were alkylated using iodoacetamide (120 mM) for 20 min at room temperature in the dark, 30 µl of the resulting denatured, reduced, and alkylated proteins were separated by mass by NuPAGE Novex 4-12 % Bis-Tris gels (Life Technologies) with MOPS buffer. Gels were washed three times for 5 min with water, stained for 45 min with Simply Blue™ Safe Stain (Life Technologies) and washed with water for 1 h.

Gel bands were excised and destained with 30 % acetonitrile in 0.1 M NH_4HCO_3 (pH 8), shrunk with 100 % acetonitrile, and dried in a vacuum concentrator (Concentrator 5301, Eppendorf, Germany). Digests were performed with 0.1 µg protease (trypsin, elastase, thermolysin or papain) per gel band overnight at 37 °C in 0.1 M NH_4HCO_3 (pH 8). After removing the supernatant, peptides were extracted from the gel slices with 5 % formic acid, and extracted peptides were pooled with the supernatant.

NanoLC-MS/MS Analysis

NanoLC-MS/MS analyses were performed on an Orbitrap Fusion (Thermo Scientific) equipped with an EASY-Spray Ion Source and coupled to an EASY-nLC 1000 (Thermo Scientific). Peptides were loaded on a trapping column (2 cm x 75 µm ID, PepMap C18, 3 µm particles, 100 Å pore size) and separated on an EASY-Spray column (25 cm x 75 µm ID, PepMap C18, 2 µm particles, 100 Å pore size) with a 30-minute linear gradient from 3 % to 40 % acetonitrile and 0.1 % formic acid.

Both MS and MS/MS scans were acquired in the Orbitrap analyzer with a resolution of 60,000 for MS scans and 15,000 for MS/MS scans. HCD fragmentation with 35 % normalized collision energy was applied. A Top Speed data-dependent MS/MS method with a fixed cycle time of 3 seconds was used. Dynamic exclusion was applied with a repeat count of 1 and an exclusion duration of 30 seconds; singly charged precursors were excluded from selection. Minimum signal threshold for precursor selection was set to 50,000. Predictive AGC was used with AGC a target value of 2e5 for MS scans and 5e4 for MS/MS scans. EASY-IC was used for internal calibration.

Data Analysis

MS data were analyzed with PEAKS Studio X+ (Bioinformatics Solutions Inc., Canada). Raw data refinement was performed with the following settings: Merge Options: no merge, Precursor Options: corrected, Charge Options: 1-6, Filter Options: no filter, Process: true, Default: true, Associate Chimera: yes. De novo sequencing and database searching were performed with a Parent Mass Error Tolerance of 10 ppm. Fragment Mass Error Tolerance was set to 0.02 Da, and Enzyme was set to none. The following variable modifications have been used: Oxidation (M), pyro-Glu from Q (N-term Q), phosphorylation (STY), acetylation (protein N-terminal) and carbamidomethylation (C). A maximum of 3 variable PTMs were allowed per peptide.

Data were searched against a fasta database concatenated from UniProt_mouse (UP000000589, reference proteome, 55408 proteins, 5-Nov-2019, all variants), predicted (XP_) and validated (NP_) gephyrin sequences from NCBI and a custom ORF database constructed as described above. The list of identified peptides was filtered to 1% PSM-FDR. All gephyrin-derived peptides were matched to the entries of the ORF database using ProteoMapper (*40*).

Immunohistochemistry:

Free-floating immunochemistry: Slices were incubated in a blocking solution (0,1% Triton, 5% Horse Serum in TBS) for 2 hours. The solution was then replaced by the primary antibody solution (0,1% Triton, 5% Horse Serum in TBS) with antibodies added at the indicated dilution, for an overnight incubation. The slices were washed three times for 10 minutes with PBS, before the incubation in a solution (0,02% Triton, 5% Horse Serum in TBS) containing the secondary antibodies for 1 hour. The slices were again washed three times for 10 minutes with PBS. The slices were then mounted between slide and coverslip using hardening mounting medium (Vectashield Hard Set).

Hippocampus primary cell culture:

Swiss mice at 18 days of gestation were deeply anesthetized with isoflurane and then euthanized by cervical dislocation. The pups were decapitated and the heads were placed in ice cold PBS supplemented with glucose and antibiotics (Pencillin-Streptomycin). The brains were extracted and the hippocampi dissected and placed in 37°C Neurobasal medium (Gibco). The hippocampi were then triturated/dissociated with three glass-Pasteur pipettes of decreasing tip widths. The suspension was then centrifuged at 1000 rpm for 8 minutes, the supernatant discarded and the pellet re-suspended in 37°C Neurobasal supplemented with B27, L-glutamine and antibiotics. The neurons were

plated onto poly-L-ornithine coated coverslips and cultured for 11 days in an incubator at 37°C and 5% CO_2.

Cell culture infection:
One day after the plating, the neuron cultures were infected using 1µL of a suspension of lentivirus containing the relevant plasmid. The neurons were cultured for 10 more days in the conditions described previously.

Cerebellar stereotaxic injection:
40–50-day old C57BL/6 male mice were used. Mice were deeply anesthetized with isoflurane before being placed on a stereotaxic frame fitted with a custom-made isoflurane mask. Ophthalmic gel (Ocry-gel) was placed onto the mice's eyes and subcutaneous injection of lidocaine (Xylocaine) in the area was made prior to the incision of the skin. Craniotomy was performed with a fine drill bilaterally. Glass capillaries were filled with lentivirus suspensions and lowered into the cerebellar cortex. Injections were performed using a NanoLiter Injector and UMP3000 micropump and controller (World Precision Instruments), 1 µL per hole was dispensed over a three-minute injection. The capillary was left in place for three minutes and then slowly pulled out over a two-minute period. Tissues were then glued using surgical skin glue (Vetbond). Mice were given buprenorphine (Vetergesic) for analgesia. Animals were kept 10 days before brains were collected for immunohistochemistry assay.

Antibody table:

Antigen	Host	Dilution	Supplier	Catalog N	RRID
GAD-65	Mouse	1:500	Chemicon	MAB351R	RRID:AB_94905
Gphn (A)	Rabbit	1:1000	Abcam	ab32206	RRID:AB_2112628

Gphn (B)	Chicken	1:500	Abcam	ab136343	RRID: none
Gphn (C)	Mouse	1:500	Synaptic System	147111	RRID:AB_887719
Gphn (D)	Guinea Pig	1:250	Synaptic System	147318	RRID:AB_2661777
VGAT	Guinea Pig	1:500	Synaptic System	131004	RRID:AB_887873
α-dystroglycan	Mouse	1:500	Millipore	05-298	RRID:AB_309674
$GABA_AR\alpha1$	Rabbit	1:1000	Alomone Labs	AGA-001	RRID:AB_2039862
$GABA_AR\alpha3$	Rabbit	1:1000	Alomone Labs	AGA-003	RRID:AB_2039866
$GABA_AR\alpha6$	Rabbit	1:1000	Alomone Labs	AGA-004	RRID:AB_2039868
Calbindin	Rabbit	1:1000	Swant	CB38	RRID:AB_2721225
GFP	Chicken	1:1000	Aves Lab	GFP-1020	RRID:AB_10000240

Secondary	**Host**	**Dilution**	**Supplier**	**Catalog N**	**RRID**

Mouse Alexa 488	Donkey	1:500	Molecular probes	A-21202	RRID:AB_141607
Mouse Alexa 405	Goat	1:500	Molecular probes	A-31553	RRID:AB_221604
Mouse Alexa 546	Goat	1:500	Molecular probes	A-11003	RRID:AB_2534071
Rabbit Alexa 546	Goat	1:500	Molecular probes	A-11010	RRID:AB_2534077
Chiken Alexa 488	Goat	1:500	Molecular probes	A-11039	RRID:AB_142924
Guinea pig Alexa 647	Donkey	1:500	Jackson ImmunoResearch Labs	706-605	RRID:AB_2340476

Image acquisition and quantification:

Tissue and culture samples were imaged on a Zeiss LSM780 confocal microscope to obtain a stack; pinhole, detection filter settings, dwell time and step size were kept identical (40X oil immersion objective, 1.3 NA, 1024x1024 resolution, 16 bits, 0,4 µm step size). Photomicrographs were obtained with the following band-pass and long-pass filter setting: alexafluor 405 (Band pass filter: 460/50), alexafluor 488/Cy2 (band pass filter: 505–530), Cy3 (band pass filter: 560–615) and Cy5 (long-pass filter 650). All parameters were held constant for all sections from the same experiment. At least three slices per injection site were used in all immunofluorescence analyses (n = 3 mice / staining).

Hippocampus neuron cultures were repeated at least three times, and infected neurons were analyzed. For each neuron, proximal dendrites (50-100µm) were used as ROI. Analyses were made with Fiji (ImageJ) software. Images were thresholded using MaxEntropy Auto-Threshold command. GPHN clusters or GAD-65 puncta were annotated and counted. Measure Particle function was used to measure GPHN cluster area.

For immunofluorescence analyses at least three mice were used and at three slices per mice were imaged. For every image, ROI of identical size were selected within the region of interest. For cerebellar slices, images were taken so as to contain all three

layers. All analyses were made using the molecular layer with the exceptions of figure 4E (α-dg cell body) and supplementary figure 4F and 4L where ROI contained only Purkinje cell bodies; and figure 4F ($GABA_AR\alpha6$) and supplementary figure 4I, where ROI were chosen within the granular cell layer.

For HEK cell cultures, stainings were repeated three times, one image containing several cells were taken for each experiment.

Colocalization between clusters was made with Icy software using the SODA plugin (Statistical Object Distance Analysis) when then number of studied channels was below three. ROI of the relevant areas were delineated onto the images, and the SODA 2 colors or SODA 3 colors protocol was applied. Results were checked once by manual counting using the method explained below to ensure threshold and distance parameters were adequate.

For images with four channels and for the verification of SODA analyses, Fiji (ImageJ) software was used. Images were thresholded using MaxEntropy Auto-Threshold command. Within a ROI, all clusters from each channel were counted and annotated, and clusters were deemed colocalized when distance separating them was below 210 nm which is the optical resolution of the confocal with the 40x objective. The analysis was done independently by two experimenters.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8 (GraphPad Softwares). Normality was assessed with the Shapiro-Wilk normality test. Homoscedasticity was assessed with the Barlett's test. Parametric data with the same standard deviation were analyzed by t-test, one-way ANOVA, or two-way ANOVA followed by comparison of multiple samples with Tukey post hoc analysis. Parametric data with significantly different standard deviation were analyzed by Welch's ANOVA followed by comparison of multiple samples with Dunett's T3 post hoc analysis. Non-parametric data were analyzed by the Kruskal-Wallis one-way analysis of variance on ranks followed by comparison of multiple samples with Dunn post hoc analysis. P values <0.05 were considered statistically significant. *$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$, ****$p<0.0001$. ns not significant. Data are presented as mean ± SEM.

Figures S1-S4

Fig.S1: *Gphn* transcripts expressed in cortex and cerebellum of mouse

(A) Screenshot of *Gphn* alternative transcripts annotated in *Ensembl* data base. The transcript *Gphn*-202 was found as *Gphn*-4 in our study **(B)** Illustration of the method used to generate the multiplexed library corresponding to *Gphn* transcripts expressed at four postnatal stages of development (P6, P9, P15, P39). *Gphn* transcripts of each developmental stage were processed separately (reverse transcribed with a specific *Gphn* primer and amplified with two consecutive PCRs), then equimolar amount of each sample was mixed together and prepared for PacBio sequencing. **(C)** Schematic boxes describing a mixed pipeline (informatic and manual) to analyze Circular Consensus Sequences obtained by PacBio sequencing. **(D)** Table displaying how many time an exon participates to the 277 alternative transcripts. **(E-I)** Analysis by RT-PCR of transcripts carrying exons selected with an alternative 3'ss (exon A, B, C, D, E that correspond to alternative 3'ss of exon, 14, 16, 30, 33 and 34 respectively). At the top of each panels, PCR fragment(s) amplified in 5 different tissues, at 6 distinct developmental stages, were separated in agarose gel and stained with ethidium bromide. At the bottom right, we show a schematic view of expected PCR fragment(s) and their sizes based on selected primers. At the bottom left, we have listed all *Gphn* alternative transcript carrying each alternative exons. **(J)** Quantification of *Gphn* exons expressed in various neuronal cell types of mouse brain using data from (*19*). Level of each exon was normalized to total *Gphn* expression in each cell types as well as exon length. Such approach allows to compare only exon levels between each cell types. Exon level that are not, or lightly modified, between neuronal cell type are stained with yellow, while a linear gradient of red was used to color exon for which level is increased.

Fig.S2: *Gphn* transcripts engaged in the translation machinery, and GPHN protein enrichment.

(A) Illustration displaying the procedure used to separated RNA associated to polyribosome. Brain extracts isolated from mouse perfused with cycloheximide were prepared and separated onto a sucrose gradient to distinguish fractions containing RNA engaged in translation (polyribosome). The treatment of extract with EDTA dissociates ribosomes and was used as a control. Ribosomal RNA (28S, 18S, 5S) were analyzed in agarose gel for each fraction, while *Gphn* transcripts showed in Fig.S1I detected using RT-PCR amplification (*Gphn*-57, *Gphn*-244 and *Gphn*-36). **(B)** *In silico* PAGE-SDS graph displaying the molecular weight separation associated to the 154 GPHN theoretical isoforms. On the left side, a molecular weight ladder is shown for reference. On the right side, a density graph shows isoform distribution that does not consider expression levels of each isoform. **(C)** Western blot of GPHN isoforms in different mouse tissue using the mab3B11 antibody. **(D)** Complete lane of the Coomassie stained gel of native gephyrin isolated from whole brain lysate using FSIVGRYRRRRC and before further processing for tandem LC-MS analysis.

Fig.S3: Exogenous expression of GPHN isoforms in HEK 293 and primary neuronal cells.

(A) On the right, schematics of GPHN-5, -6, -7, -8, -10, -14, -28, -32, -42, -49 isoforms; additional domains are colored in dark blue, missing domains are shown in dashed lines

and altered domains are filled with a striped motif. On the left, the table showed the prediction for GPHN isoforms to form clusters (through G-trimerization (*41*), E-dimerization (*42*)), crucial residues palmitoylation (*43*) or collybistin binding (*44*)), to interact with molecular transport (*45*), to interact with GABAARs or GlyRs (*21*), and to be anchored to the cytoskeleton (*46*). A plus sign means the sites are present in the sequence of the variant, a minus sign means the whole site is absent from the sequence. +/- means that the site is partially present in the sequence. Note that these estimations do not account for the potential conformation changes induced by the addition or removal of a peptide sequence. **(B)** At the left, a table list the theoretical molecular weights of each GPHN isoforms fused to Scarlet with the name of corresponding lentiviral constructs. At the right, exogenous expression of fusion GPHN isoforms is shown using western blotting after transfection of lentiviral constructs in HEK-293 cell line. Exogenous factors are detected by probing of the V5 Tag. **(C)** Confocal images of cultured hippocampal neurons expressing Scarlet or Scarlet-tagged GPHN variants (red). Note that GPHN-1, -5, -6, -8, and 14 form clusters and GPHN-7, -10, 28, -32, 42 and 49 are diffused in the neurons. Scale bar: 20 μm.

Fig.S4: The four GPHN epitopes are differentially localized at specific inhibitory synapses.

(A) GPHN-1 is ubiquitously labeled by all four antibodies combination. Confocal images of HEK 293 cells expressing the exogenous Scarlet-GPHN-1 protein and stained with all the possible combinations of anti-GPHN antibodies used in this study. (Scale bar: 15 μm). At the bottom, epitope of each antibody is displayed on a schematic view of GPHN primary sequence. **(B)** Specificity of antibodies to detect different GPHN isoforms. Expression of GPHN isoforms (-7, -10, -28 and -32) is detected by only one anti-GPHN antibody as expected by the presence of single epitope on their primary sequence as schematized below. **(C)** Confocal images of cerebellar cortex slices stained with the presynaptic markers (GAD-65 or VGAT) and anti-GPHN antibodies (α-A, α-B, α-C, and α-D). Presynaptic markers are labeled in blue and anti-GPHN in red. Yellow boxes indicated the region magnified below each panel **(D)** Graph showing the percentage of colocalization between anti-GPHNs and the pre-synaptic marker ($n \geq 4$ mice) **P=0,0019; *P<0,05. One-way ANOVA. **(E and F)** *In vivo* labeling of GPHN epitopes present at inhibitory synapses localized on PC dendrites (E) and soma (F). Schematic of synapses made by stellate cell axon on PC dendrite (**E**; middle panel) and Basket cell on PC soma (**F**; middle panel). **(E and F)** At the left panel, pre- and post-synaptic sites are detected respectively using anti-VGAT (blue) and anti-calbindin (green). Stellate cell and Basket cell inhibitory synapse made on PC are positive to alpha-dystroglycan (α-dg; red). At the right panel, combined GPHN epitopes labeling at

alpha-dystroglycan positive synapse. **(G-I)** Heterogeneous labeling of GPHN epitopes at inhibitory synapses containing specific $GABA_A$-Rα subunits. Schemas in middle panels show each specific inhibitory synapse. Synapses between GABAergic interneurons and PC dendrites are positive for $GABA_A$-Rα1 (**G**). Synapses made by deep cerebellar nuclei axons on Golgi cell dendrites are positive for $GABA_A$-Rα3 (**H**). Synapses made by Golgi cell axons on Granule cell dendrites are positive for $GABA_A$-Rα6 (**I**). GFP positive inhibitory interneuron dendrites within the molecular layer are identified using the Gad67-GFP mice. Golgi Cells axon and dendrite are identified using the GlyT2-GFP mice. **(J)** *In vivo* expression of exogenous GPHN isoforms in PC dendrites reveal their unpaired localization at synapses. Representative confocal images of Purkinje cell dendrites expressing Scarlet or Scarlet-GPHN isoforms, while pre-synaptic side is stained by immunofluorescence using anti-GAD65. White arrows pointed to GAD65 synapses on PC dendrites that lacked expression of the exogenous GPHN variants while Blue arrows pointed to GAD65 synapses containing the GPHN variants. Note that both GPHN-1 and -8 localized to a subset of synapses made on PC dendrites. **(K)** Quantification of Scarlet or Scarlet-GPHN isoforms clustered *in vivo* at synapses of PC dendrites. **(L)** Different localization of Scarlet or Scarlet-GPHN isoforms at axon initial segment (AIS) of Purkinje cells. Note that only GPHN-1 and -8 are detected at the AIS, while other isoforms such as GPHN-28 do not.

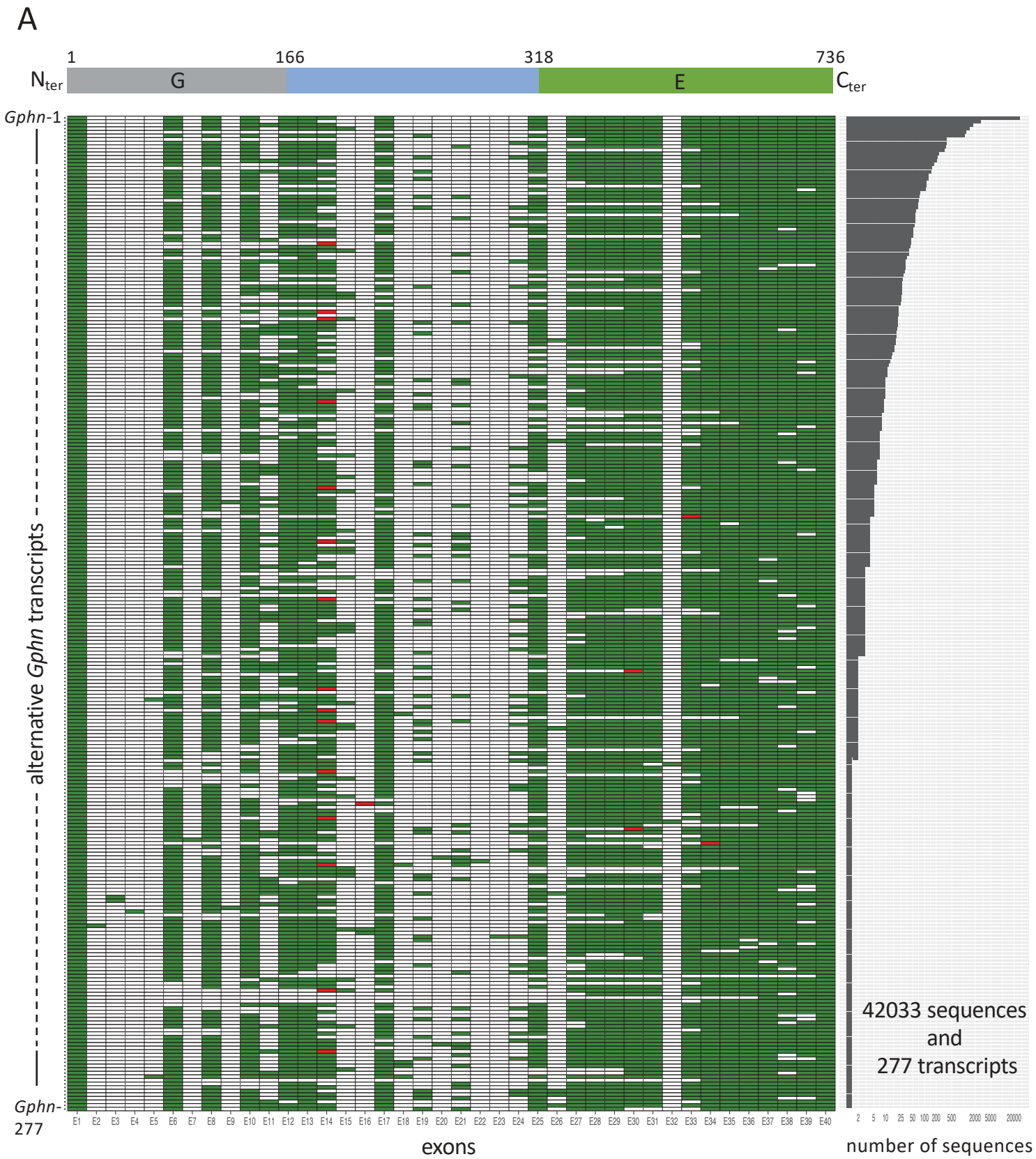
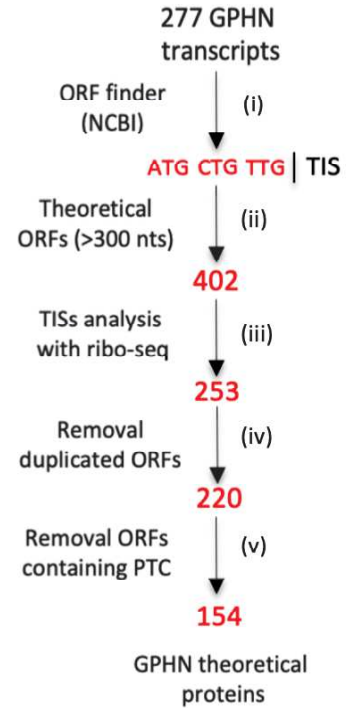
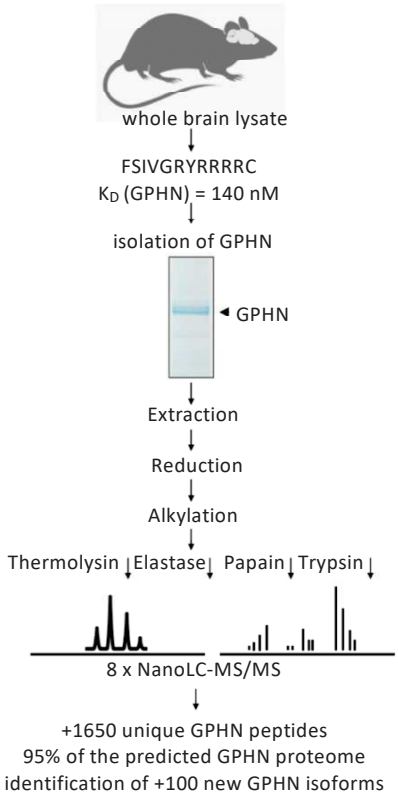

A
1
166
318
736
Nter
G
E
Cter
Gphn-1
alternative Gphn transcripts
Gphn-277
42033 sequences
and
277 transcripts
exons
number of sequences
B
C1 (ND)
C2
C5*
C3
C4b
C4
C5
C6 (ND)
C7
or
annotated exon
validated exon
unannotated exon
exon with alternative 3'ss

Fig.1

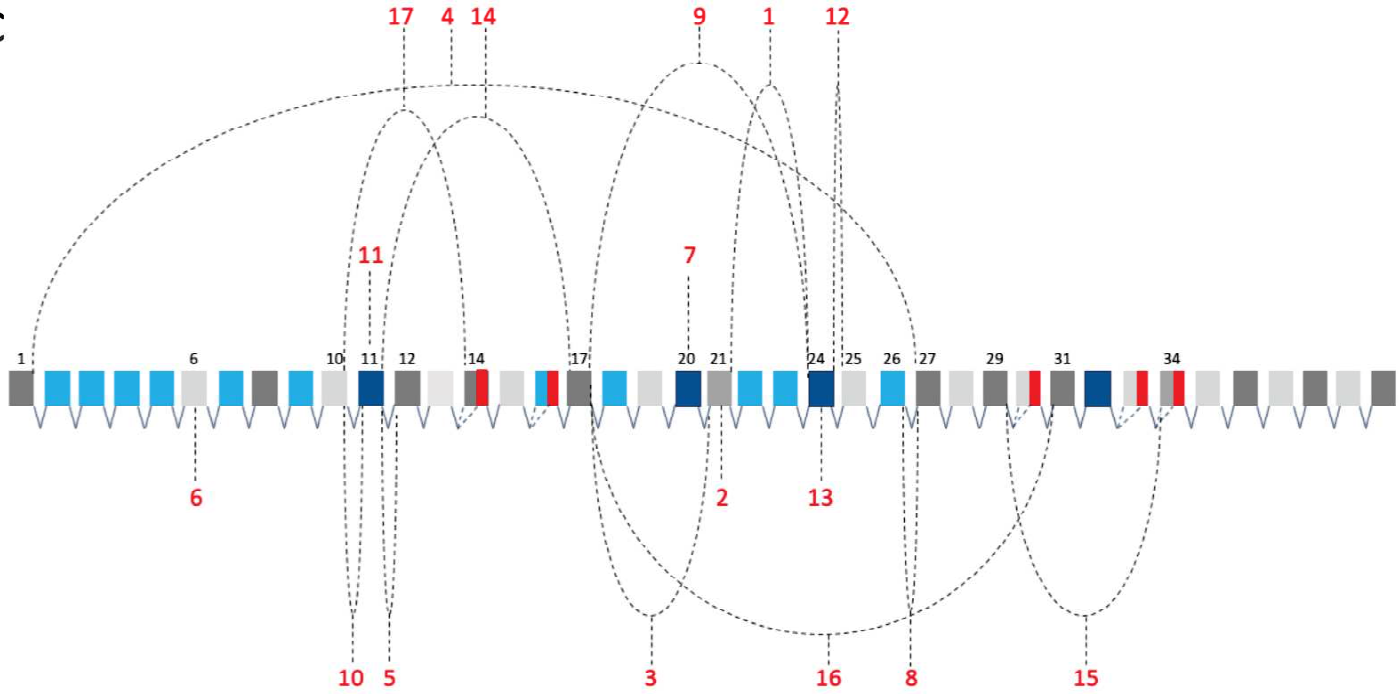
A



B



C



D

		number of isoforms	number of matched peptide			number of isoforms	number of matched peptide
1	EEJ:21-24	11	4	9	EEJ:17-24	8	1
2	Exon 21	11	4	10	EEJ:10-11	37	5
3	EEJ:17-21	13	6	11	Exon 11	37	6
4	EEJ:1-27	12	3	12	EEJ:24-25	32	6
5	EEJ:11-12	37	1	13	Exon 24	32	17
6	Exon 6 (new ORF)	1	1	14	EEJ:11-17	2	1
7	Exon 20	45	1	15	EEJ:29-34	2	1
8	EEJ:26-27	7	2	16	EEJ:17-31	1	1
				17	EEJ:10-14	1	1

Fig.2

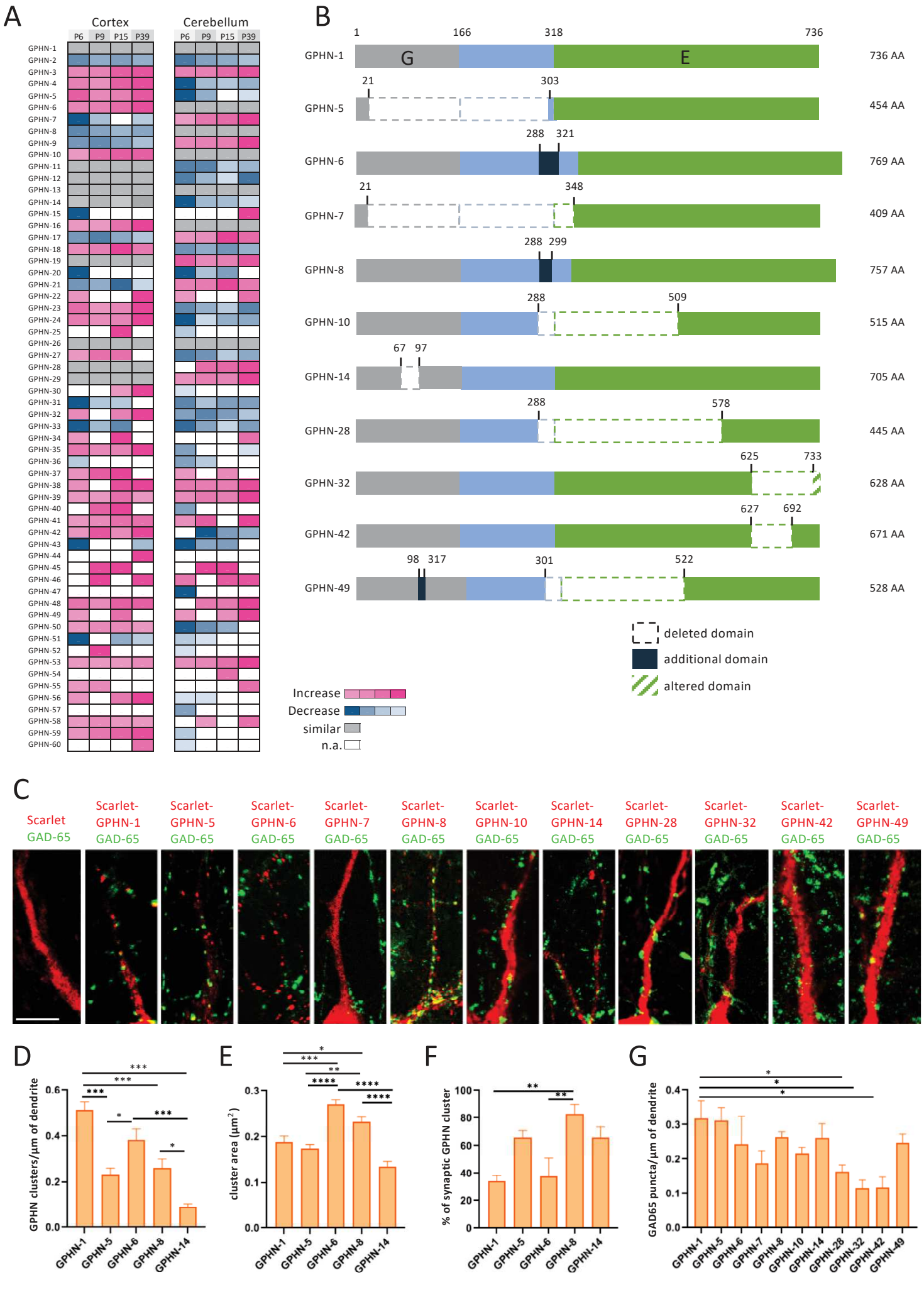

A
Cortex
Cerebellum
P6
P9
P15
P39
GPHN-1
GPHN-2
GPHN-3
GPHN-4
GPHN-5
GPHN-6
GPHN-7
GPHN-8
GPHN-9
GPHN-10
GPHN-11
GPHN-12
GPHN-13
GPHN-14
GPHN-15
GPHN-16
GPHN-17
GPHN-18
GPHN-19
GPHN-20
GPHN-21
GPHN-22
GPHN-23
GPHN-24
GPHN-25
GPHN-26
GPHN-27
GPHN-28
GPHN-29
GPHN-30
GPHN-31
GPHN-32
GPHN-33
GPHN-34
GPHN-35
GPHN-36
GPHN-37
GPHN-38
GPHN-39
GPHN-40
GPHN-41
GPHN-42
GPHN-43
GPHN-44
GPHN-45
GPHN-46
GPHN-47
GPHN-48
GPHN-49
GPHN-50
GPHN-51
GPHN-52
GPHN-53
GPHN-54
GPHN-55
GPHN-56
GPHN-57
GPHN-58
GPHN-59
GPHN-60
Increase
Decrease
similar
n.a.
B
1
166
318
736
GPHN-1
G
E
736 AA
GPHN-5
21
303
454 AA
GPHN-6
288
321
769 AA
GPHN-7
21
348
409 AA
GPHN-8
288
299
757 AA
GPHN-10
288
509
515 AA
GPHN-14
67
97
705 AA
GPHN-28
288
578
445 AA
GPHN-32
625
733
628 AA
GPHN-42
627
692
671 AA
GPHN-49
98
317
301
522
528 AA
deleted domain
additional domain
altered domain
C
Scarlet
GAD-65
Scarlet-GPHN-1
Scarlet-GPHN-5
Scarlet-GPHN-6
Scarlet-GPHN-7
Scarlet-GPHN-8
Scarlet-GPHN-10
Scarlet-GPHN-14
Scarlet-GPHN-28
Scarlet-GPHN-32
Scarlet-GPHN-42
Scarlet-GPHN-49
D
GPHN clusters/µm of dendrite
0.0
0.2
0.4
0.6
GPHN-1
GPHN-5
GPHN-6
GPHN-8
GPHN-14
E
cluster area (µm²)
0.0
0.1
0.2
0.3
F
% of synaptic GPHN cluster
0
20
40
60
80
100
G
GAD65 puncta/µm of dendrite
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
GPHN-1
GPHN-5
GPHN-6
GPHN-7
GPHN-8
GPHN-10
GPHN-14
GPHN-28
GPHN-32
GPHN-42
GPHN-49

Fig.3

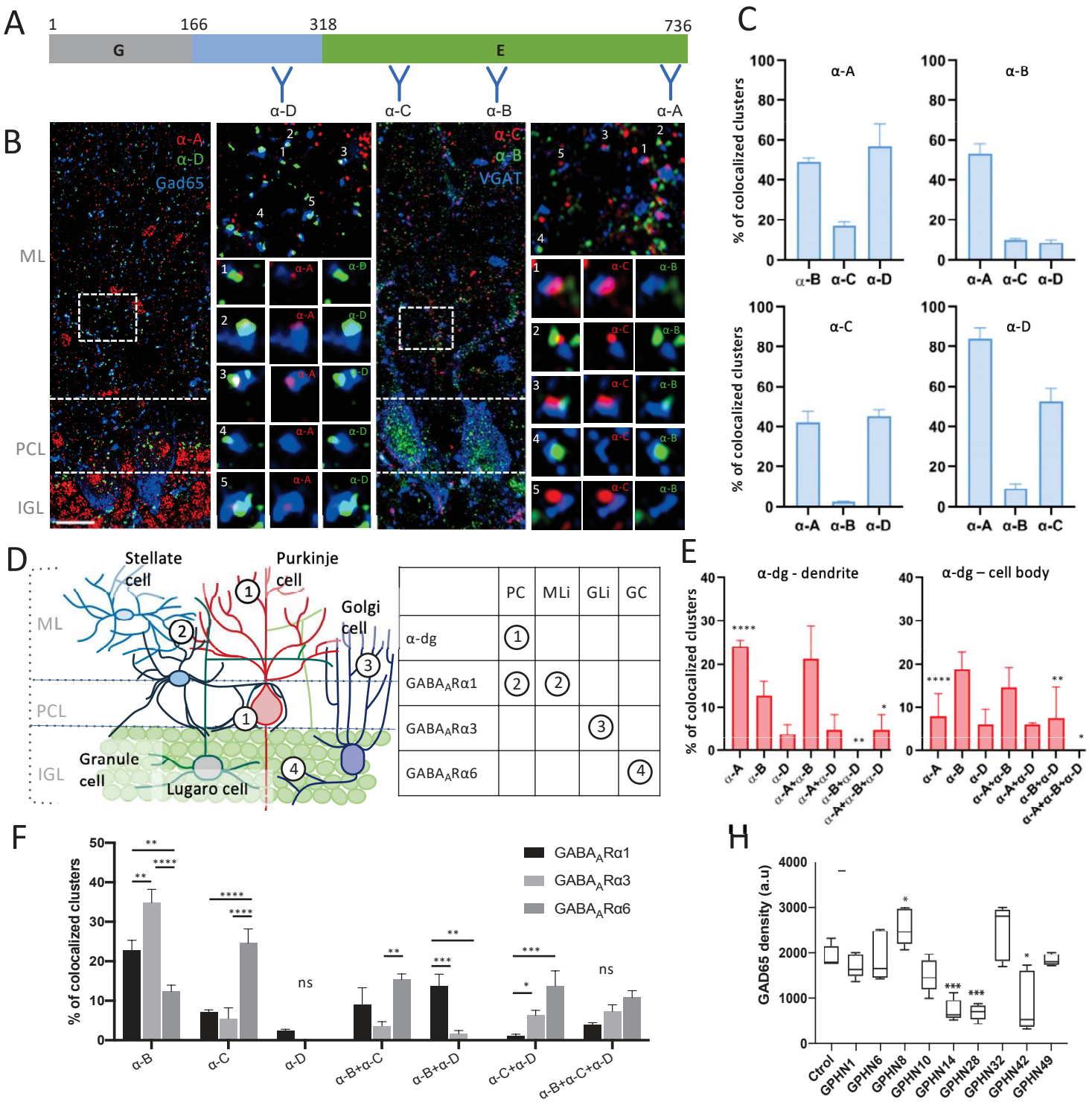
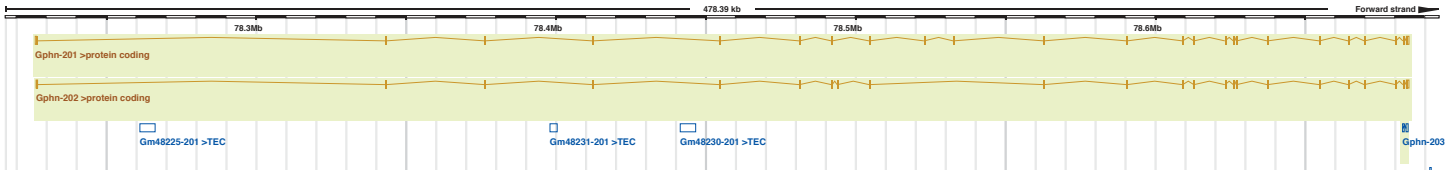
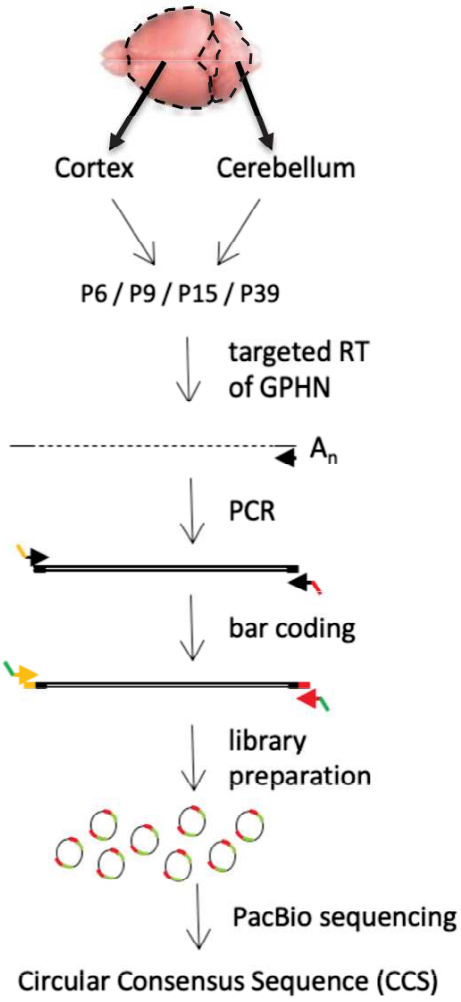

A
1
166
318
736
G
E
α-D
α-C
α-B
α-A
B
α-A
α-D
Gad65
α-C
α-B
VGAT
ML
PCL
IGL
C
% of colocalized clusters
α-A
α-B
α-C
α-D
D
Stellate cell
Purkinje cell
Golgi cell
Granule cell
Lugaro cell
PC
MLi
GLi
GC
α-dg
GABAARα1
GABAARα3
GABAARα6
E
α-dg - dendrite
α-dg – cell body
F
GABAARα1
GABAARα3
GABAARα6
ns
H
GAD65 density (a.u)
Ctrol
GPHN1
GPHN6
GPHN8
GPHN10
GPHN14
GPHN28
GPHN32
GPHN42
GPHN49
G
Scarlet GAD-65
Scarlet-GPHN-1 GAD-65
Scarlet-GPHN-6 GAD-65
Scarlet-GPHN-8 GAD-65
Scarlet-GPHN-10 GAD-65
Scarlet-GPHN-14 GAD-65
Scarlet-GPHN-28 GAD-65
Scarlet-GPHN-32 GAD-65
Scarlet-GPHN-42 GAD-65
Scarlet-GPHN-49 GAD-65

Fig.4

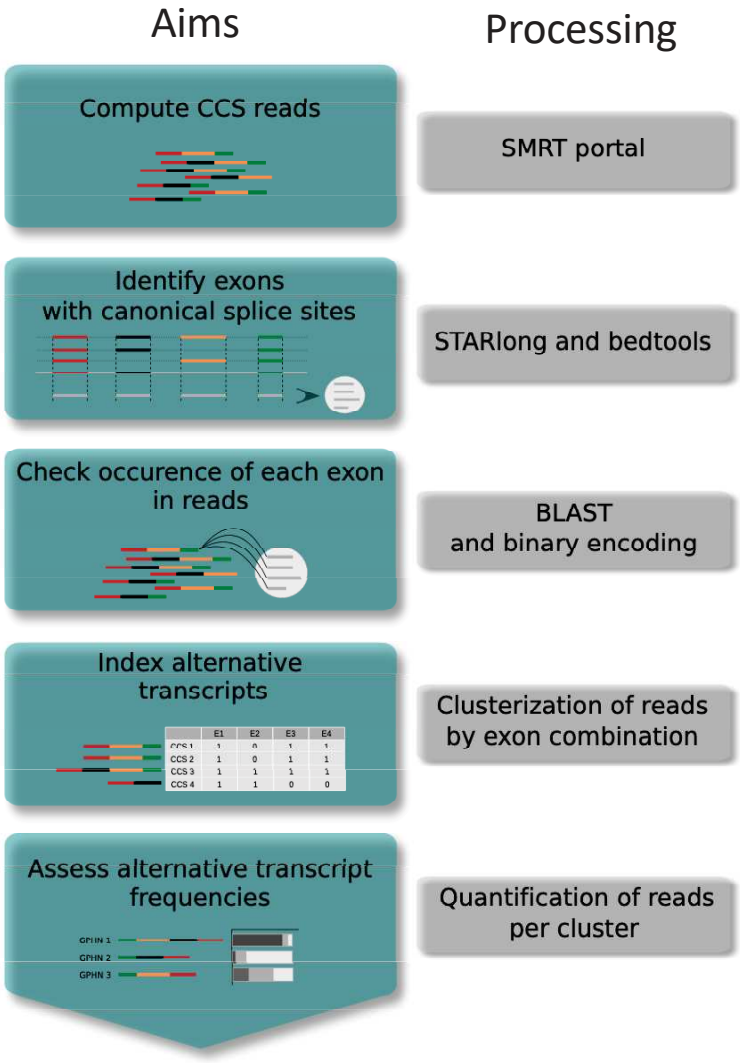
A



B



C



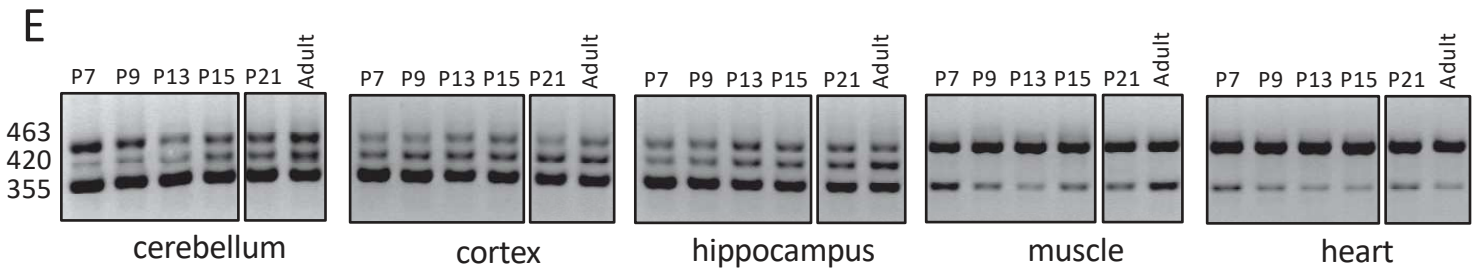
D

40 annotated Gphn exons

exons with alternative 3'ss

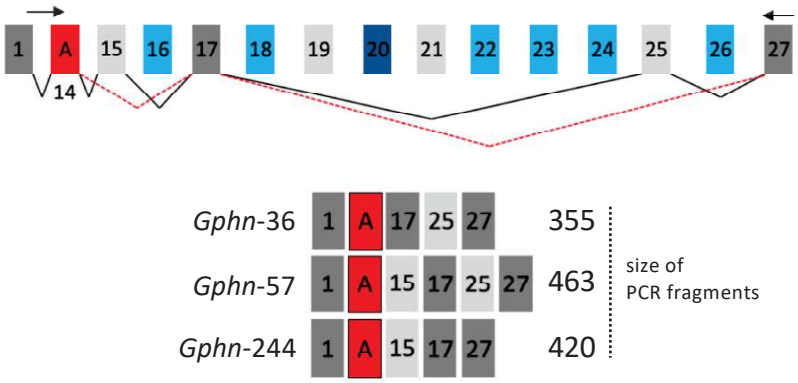
exons	transcripts distribution	exons	transcripts distribution	exons	transcripts distribution	exons	transcripts distribution	exons	transcripts distribution
E1	277	E11	62	E21	43	E31	240	EA	15
E2	1	E12	227	E22	1	E32	2	EB	1
E3	2	E13	236	E23	1	E33	235	EC	2
E4	1	E14	173	E24	43	E34	263	ED	1
E5	2	E15	30	E25	215	E35	266	EE	1
E6	234	E16	2	E26	7	E36	270		
E7	1	E17	230	E27	219	E37	269		
E8	231	E18	5	E28	232	E38	254		
E9	2	E19	52	E29	233	E39	251		
E10	224	E20	54	E30	242	E40	277		

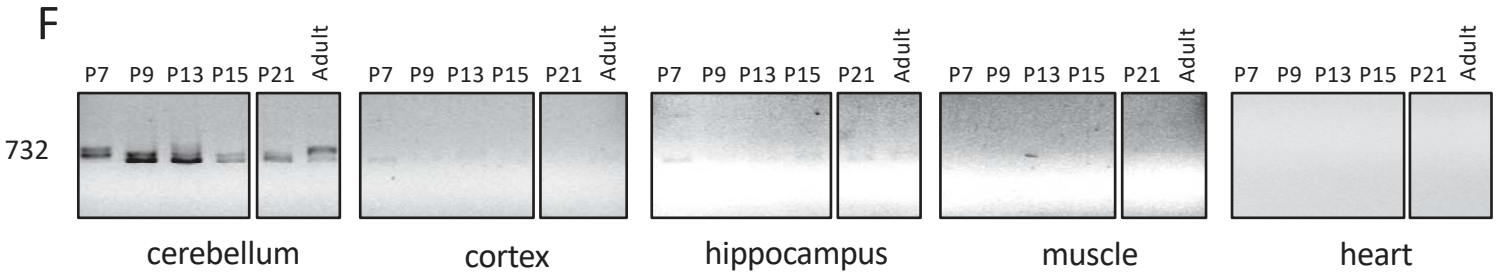
Fig.S1



15 transcripts with exon A

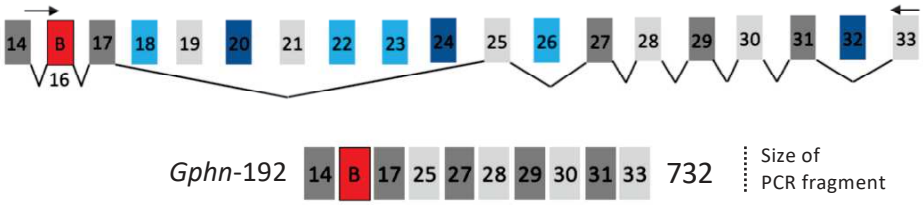
Gphn-36 *Gphn*-166
Gphn-55 *Gphn*-169
Gphn-57 *Gphn*-183
Gphn-80 *Gphn*-196
Gphn-104 *Gphn*-209
Gphn-119 *Gphn*-244
Gphn-135 *Gphn*-261
Gphn-160

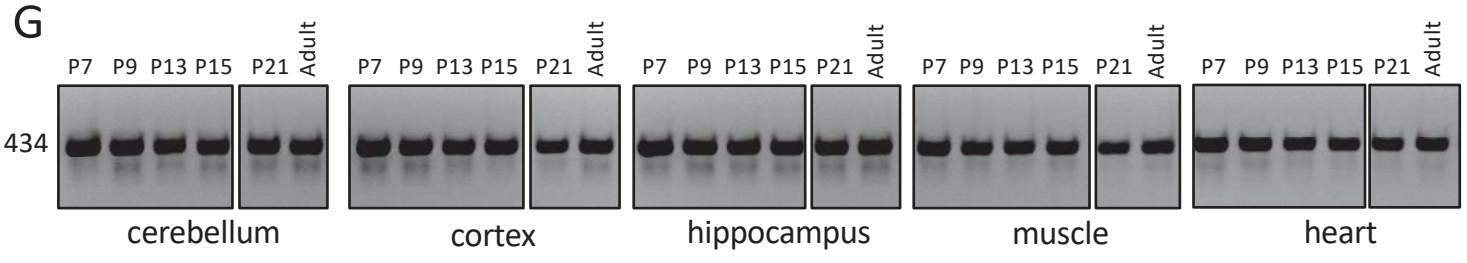




1 transcript with exon B

Gphn-192





2 transcripts with exon C

Gphn-155
Gphn-199

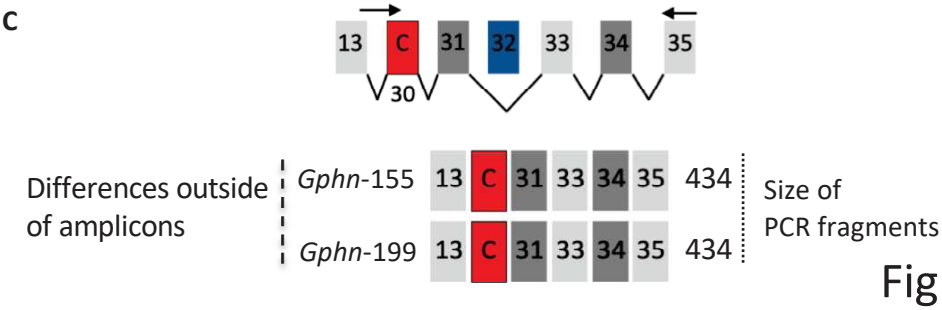
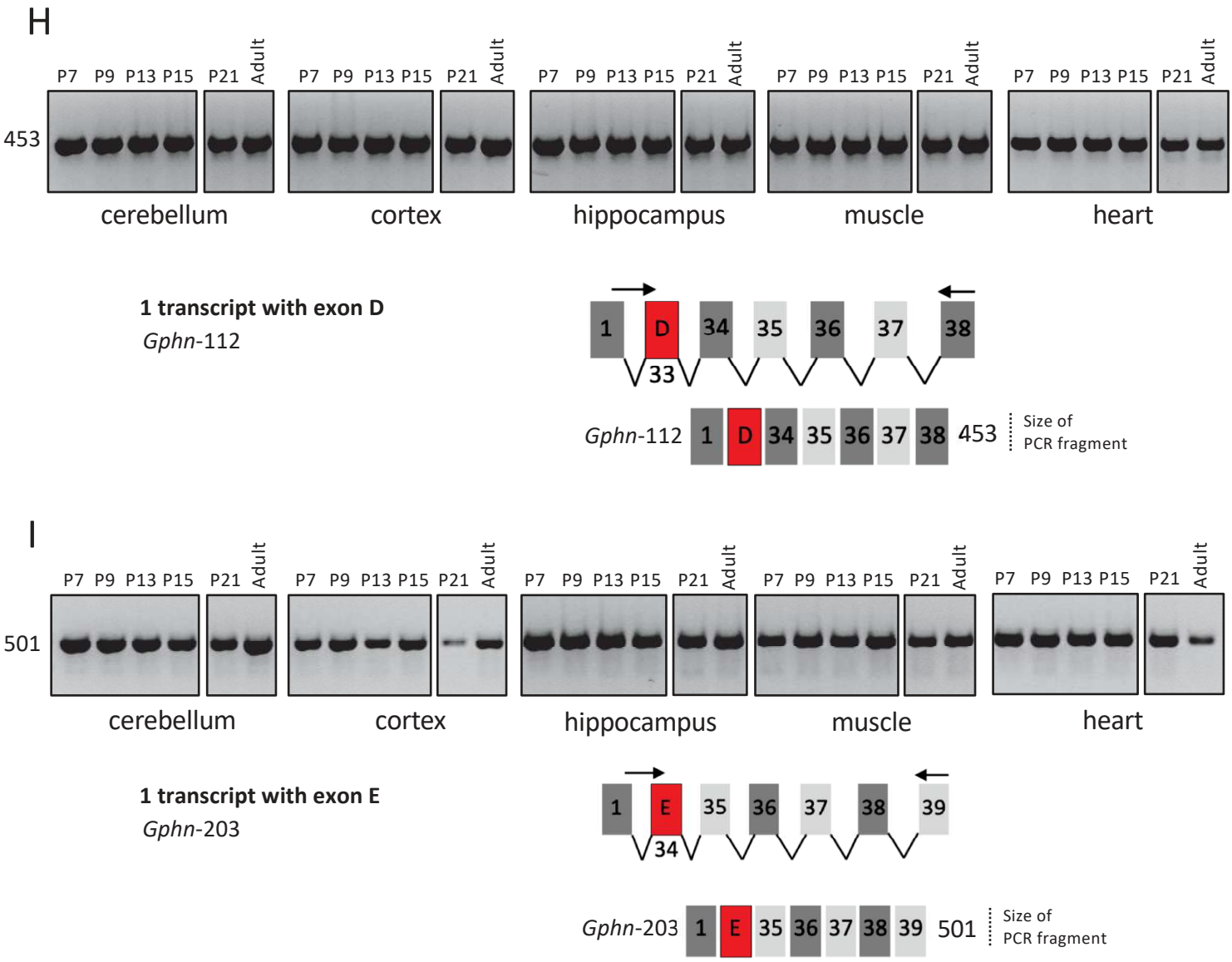


Fig.S1


H
P7 P9 P13 P15 P21 Adult
453
cerebellum
cortex
hippocampus
muscle
heart
1 transcript with exon D
Gphn-112
1 D 34 35 36 37 38
33
Gphn-112 1 D 34 35 36 37 38 453
Size of PCR fragment
I
501
1 transcript with exon E
Gphn-203
1 E 35 36 37 38 39
34
Gphn-203 1 E 35 36 37 38 39 501
Size of PCR fragment

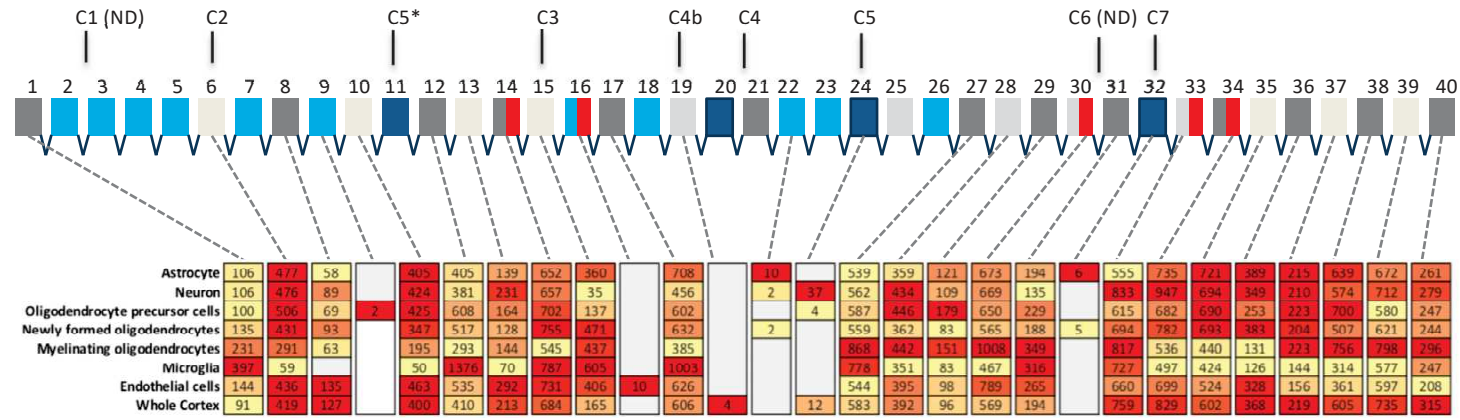
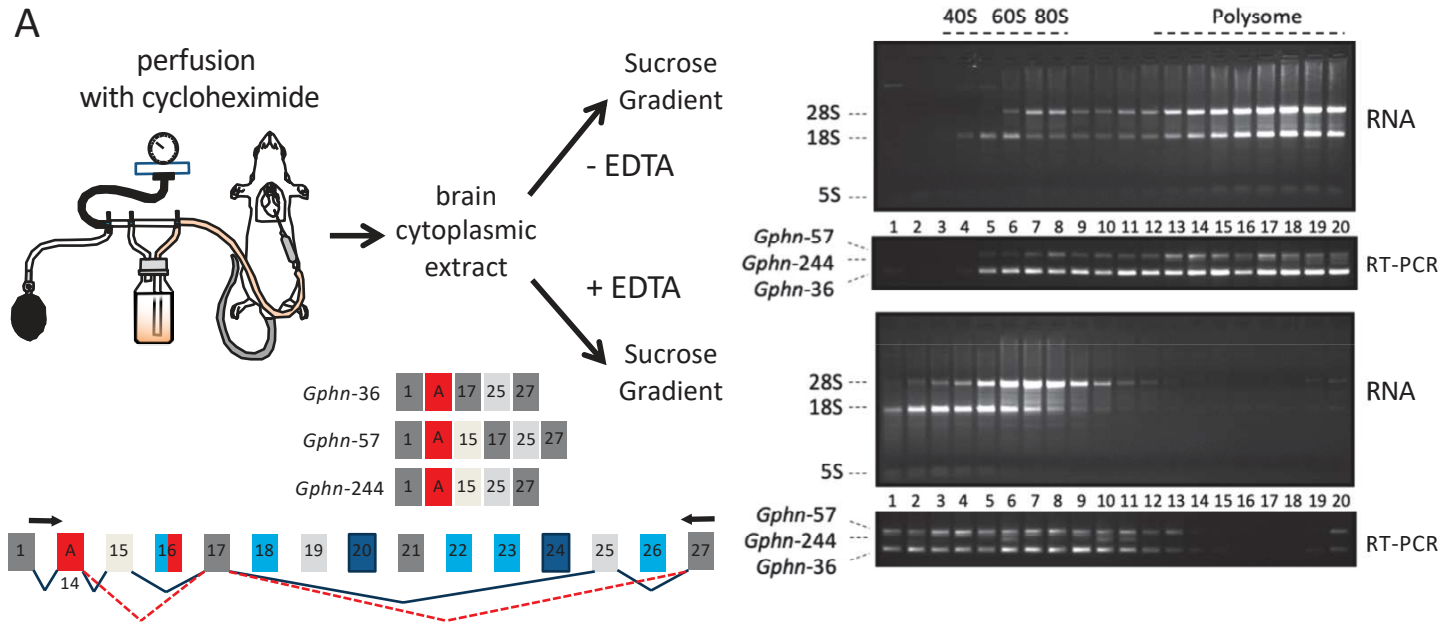
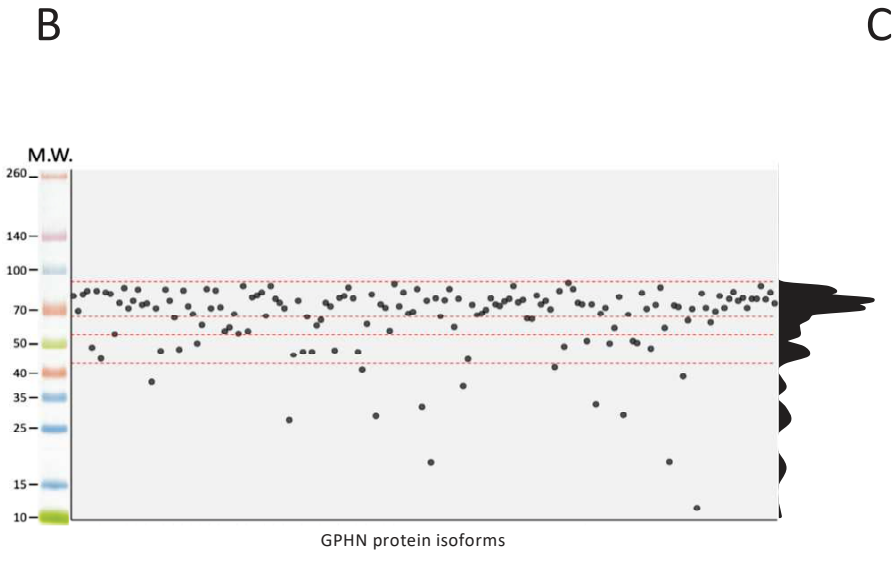
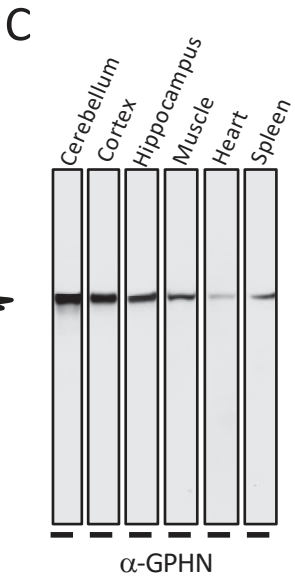

J
C1 (ND)
C2
C5*
C3
C4b
C4
C5
C6 (ND)
C7
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40
Astrocyte 106 477 58 405 405 139 652 360 708 10 539 359 121 673 194 6 555 735 721 389 215 639 672 261
Neuron 106 476 89 424 381 231 657 35 456 2 37 562 434 109 669 135 833 947 694 349 210 574 712 279
Oligodendrocyte precursor cells 100 506 69 2 425 608 164 702 137 602 4 587 446 179 650 229 615 682 690 253 223 700 580 247
Newly formed oligodendrocytes 135 431 93 347 517 128 755 471 632 2 559 362 83 565 188 5 694 782 693 383 204 507 621 244
Myelinating oligodendrocytes 231 291 63 195 293 144 545 437 385 868 442 151 1008 349 817 536 440 131 223 756 798 296
Microglia 397 59 50 1376 70 787 605 1003 778 351 83 467 316 727 497 424 126 144 314 577 247
Endothelial cells 144 436 135 463 535 292 731 406 10 626 544 395 98 789 265 660 699 524 328 156 361 597 208
Whole Cortex 91 419 127 400 410 213 684 165 606 4 12 583 392 96 569 194 759 829 602 368 219 605 735 315

Fig.S1


A
perfusion
with cycloheximide
brain
cytoplasmic
extract
Sucrose
Gradient
- EDTA
+ EDTA
Sucrose
Gradient
Gphn-36
Gphn-57
Gphn-244
40S 60S 80S
Polysome
28S
18S
5S
RNA
RT-PCR


B
M.W.
GPHN protein isoforms


C
Cerebellum
Cortex
Hippocampus
Muscle
Heart
Spleen
α-GPHN

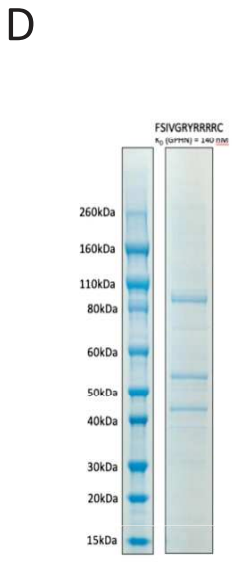
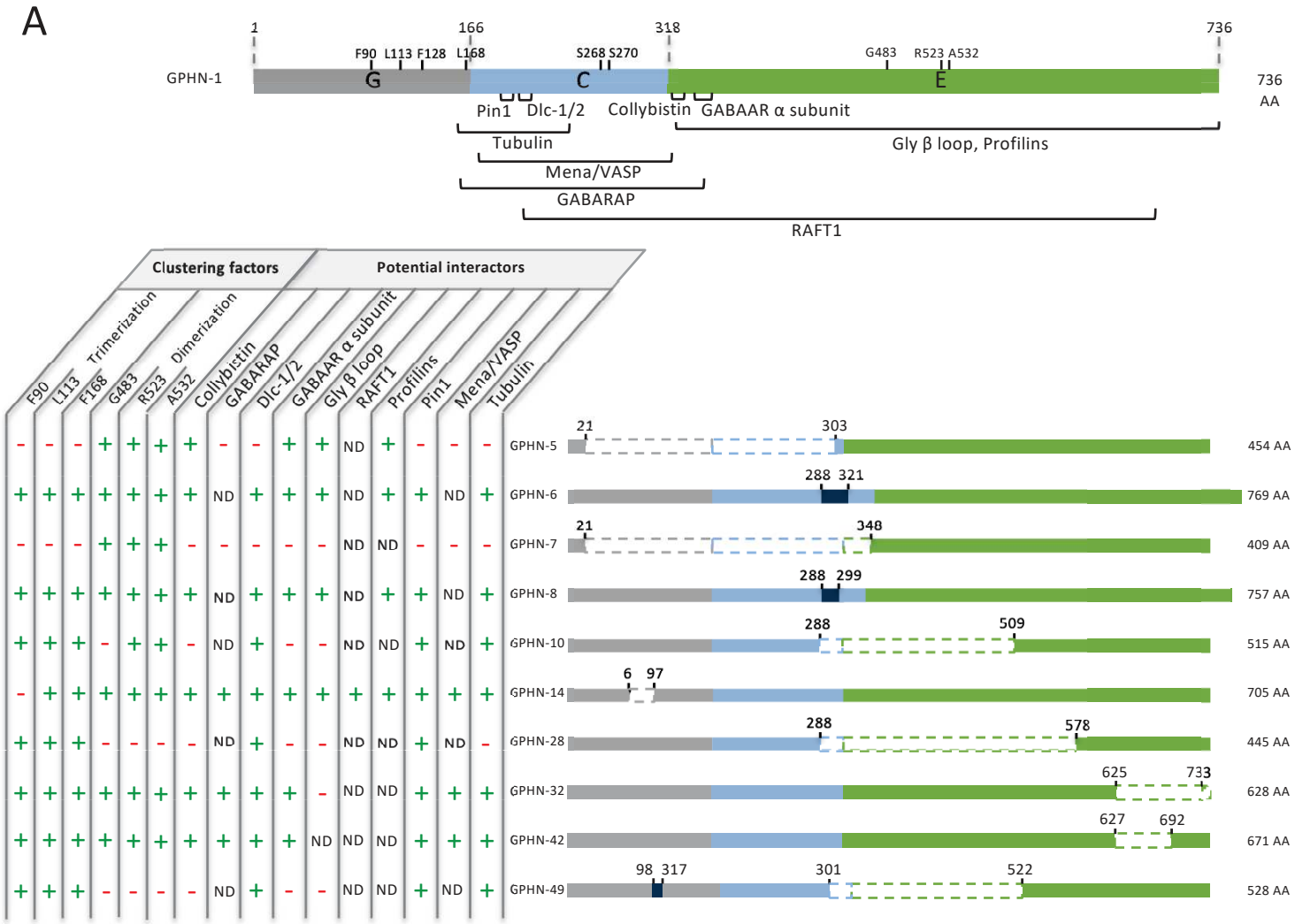

D

Fig.S2

A



B

	Expected M.W. (kD)
pLvx -scarlett	34,9
pLvx -scarlett-GPHN-1	109,1
pLvx -scarlett-GPHN-5	78,9
pLvx -scarlett-GPHN-6	112,8
pLvx -scarlett-GPHN-7	73,8
pLvx -scarlett-GPHN-8	111,7
pLvx -scarlett-GPHN-10	85,3
pLvx -scarlett-GPHN-14	105,7
pLvx -scarlett-GPHN-28	77,9
pLvx -scarlett-GPHN-32	96,9
pLvx -scarlett-GPHN-42	101,5
pLvx -scarlett-GPHN-49	86,8

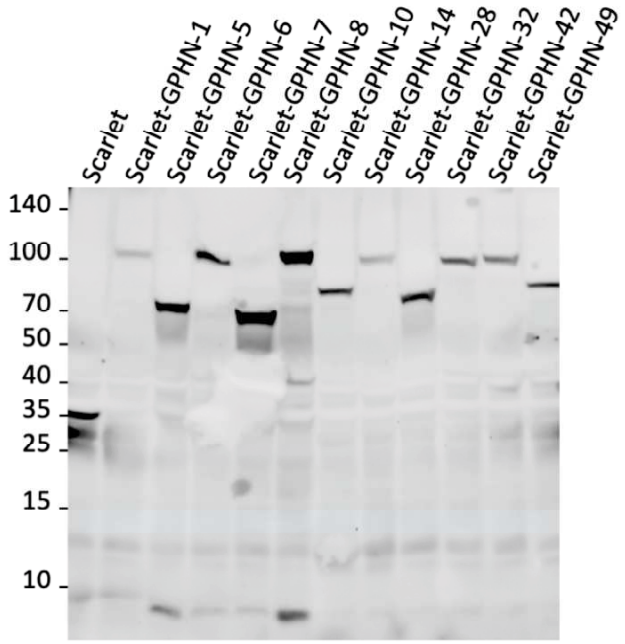


Fig.S3

C

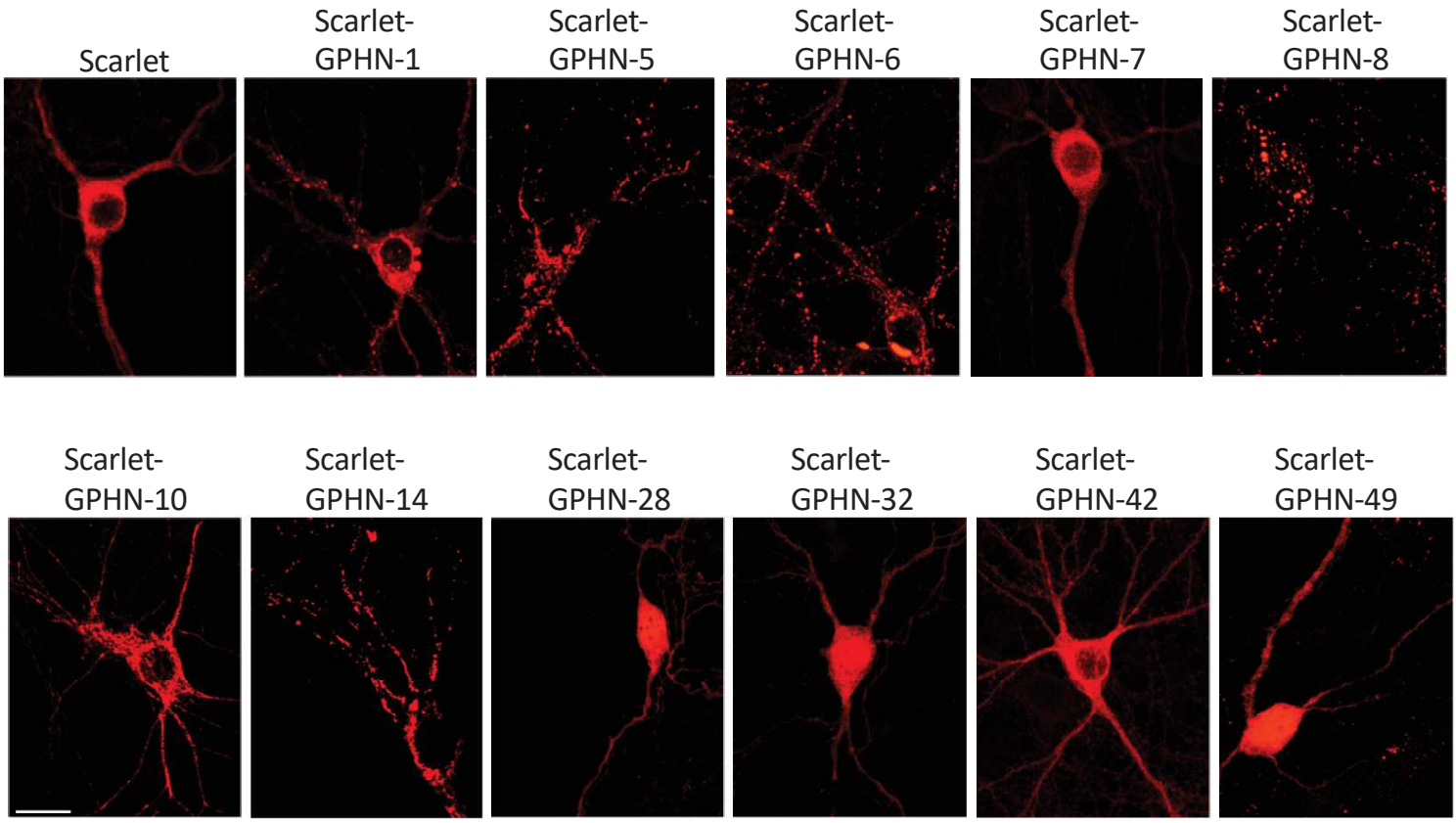
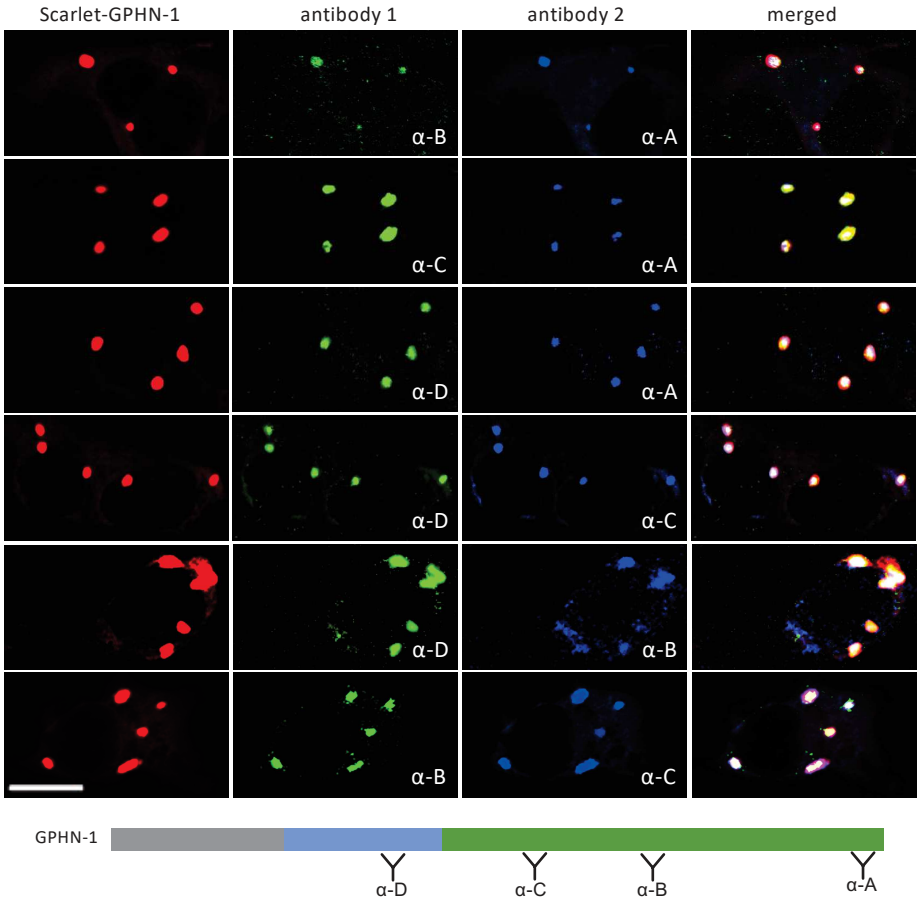

Scarlet
Scarlet-GPHN-1
Scarlet-GPHN-5
Scarlet-GPHN-6
Scarlet-GPHN-7
Scarlet-GPHN-8
Scarlet-GPHN-10
Scarlet-GPHN-14
Scarlet-GPHN-28
Scarlet-GPHN-32
Scarlet-GPHN-42
Scarlet-GPHN-49

Fig.S3

A


Scarlet-GPHN-1
antibody 1
antibody 2
merged
α-B
α-A
α-C
α-A
α-D
α-A
α-D
α-C
α-D
α-B
α-B
α-C
GPHN-1
α-D
α-C
α-B
α-A

B

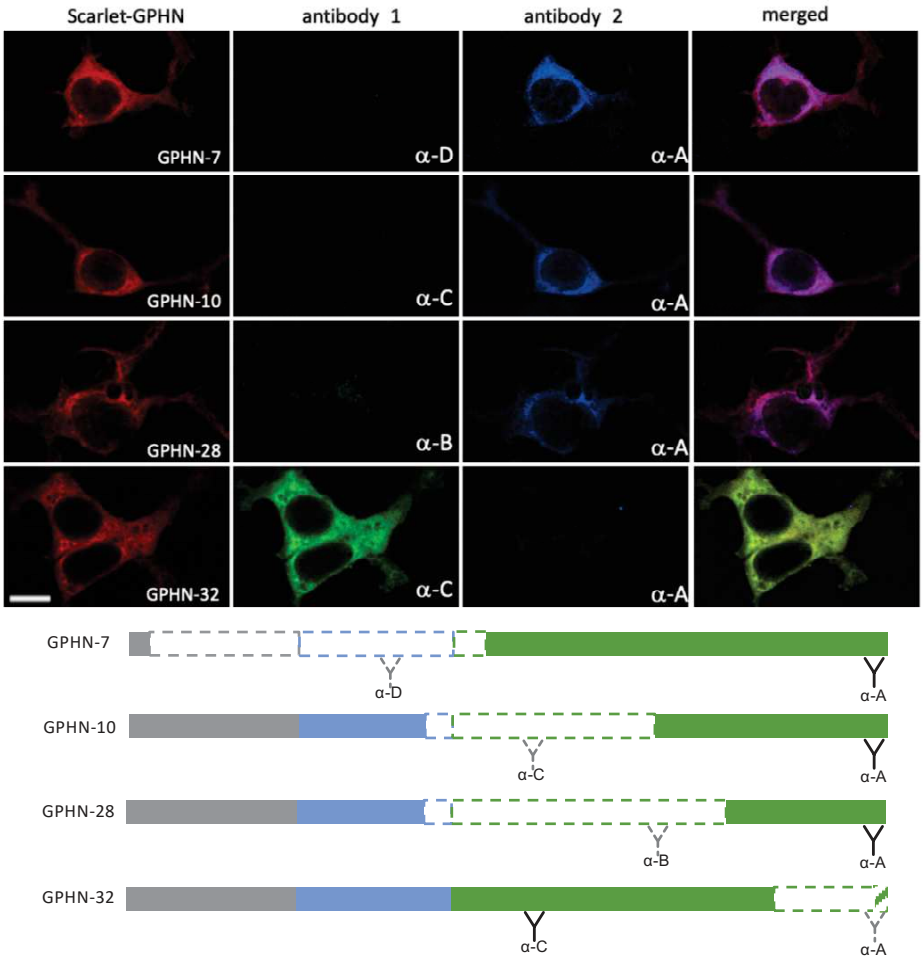
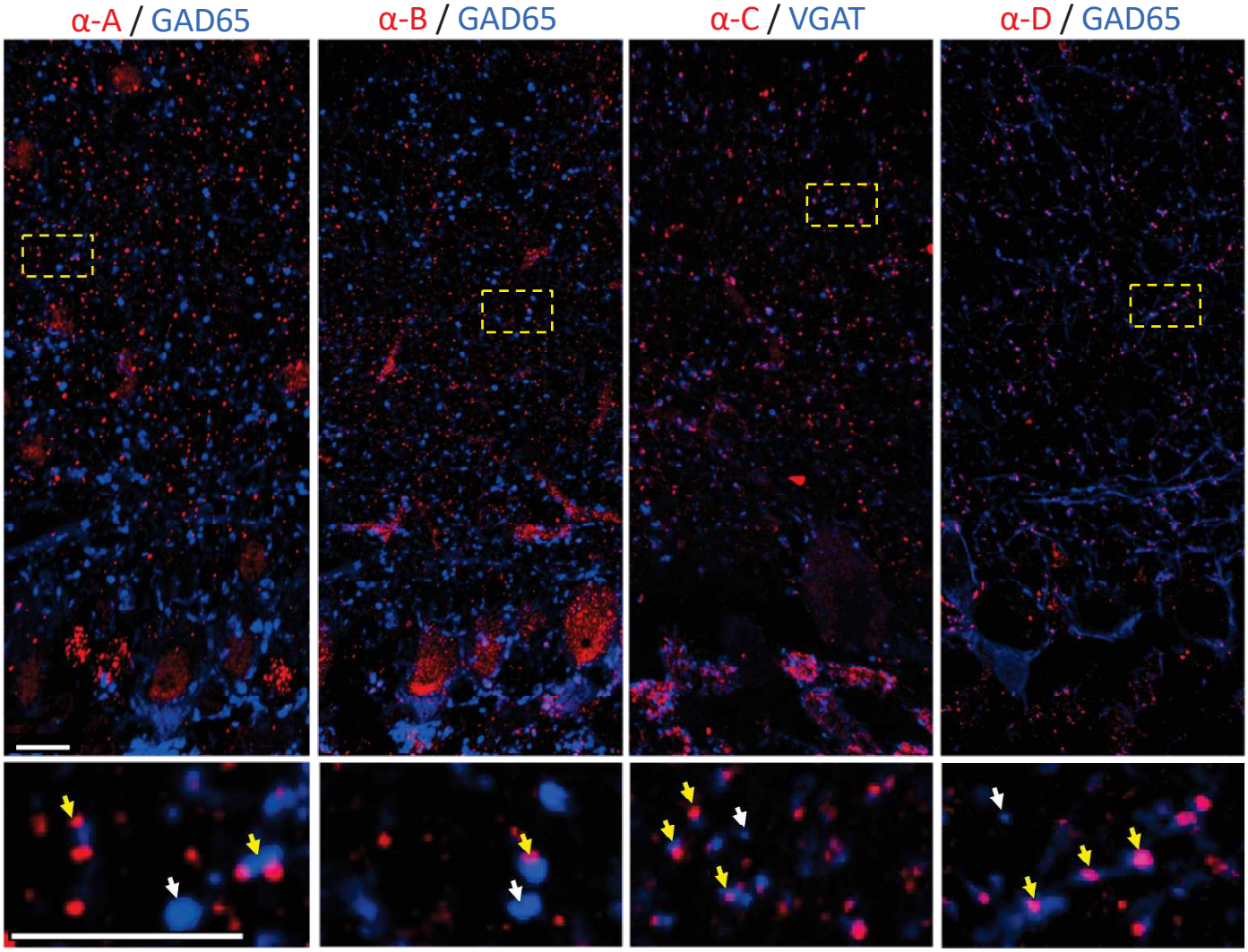

Scarlet-GPHN
antibody 1
antibody 2
merged
GPHN-7
α-D
α-A
GPHN-10
α-C
α-A
GPHN-28
α-B
α-A
GPHN-32
α-C
α-A
GPHN-7
α-D
α-A
GPHN-10
α-C
α-A
GPHN-28
α-B
α-A
GPHN-32
α-C
α-A

Fig.S4

C


α-A / GAD65
α-B / GAD65
α-C / VGAT
α-D / GAD65

D

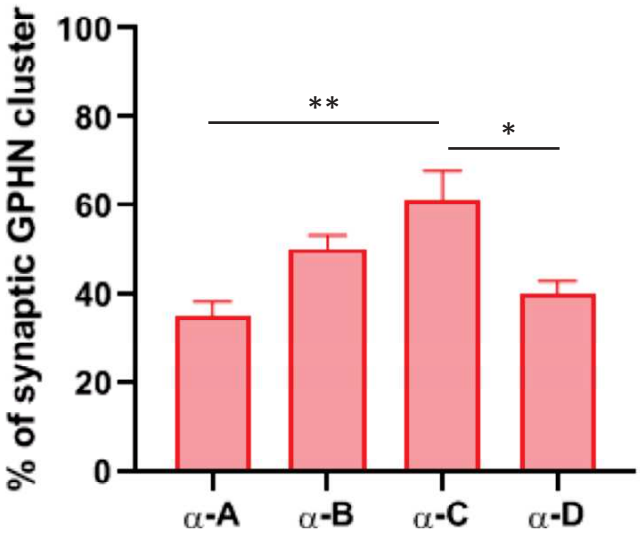
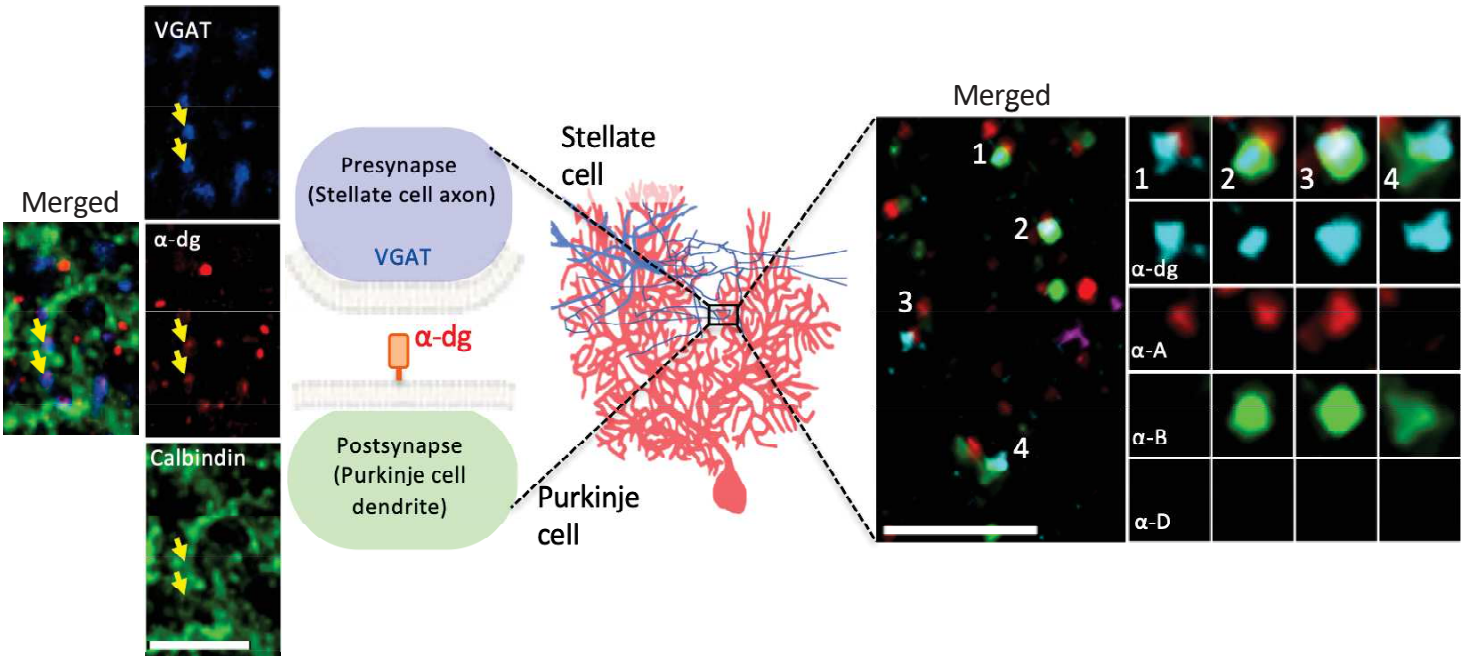

% of synaptic GPHN cluster
100
80
60
40
20
0
**
*
α-A
α-B
α-C
α-D

Fig.S4

E


VGAT
Merged
α-dg
Calbindin
Presynapse
(Stellate cell axon)
VGAT
α-dg
Postsynapse
(Purkinje cell
dendrite)
Stellate
cell
Purkinje
cell
Merged
1
2
3
4
1
2
3
4
α-dg
α-A
α-B
α-D

F

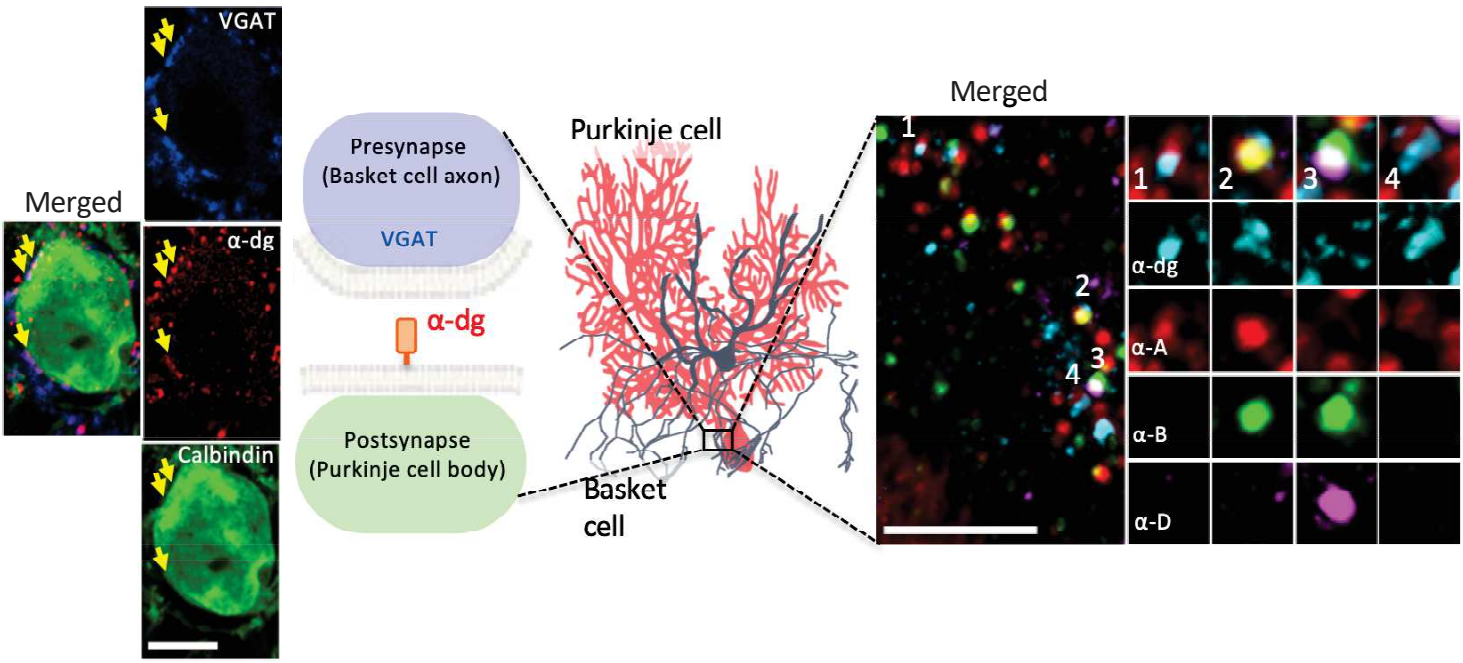

VGAT
Merged
α-dg
Calbindin
Presynapse
(Basket cell axon)
VGAT
α-dg
Postsynapse
(Purkinje cell body)
Purkinje cell
Basket
cell
Merged
1
2
3
4
1
2
3
4
α-dg
α-A
α-B
α-D

Fig.S4

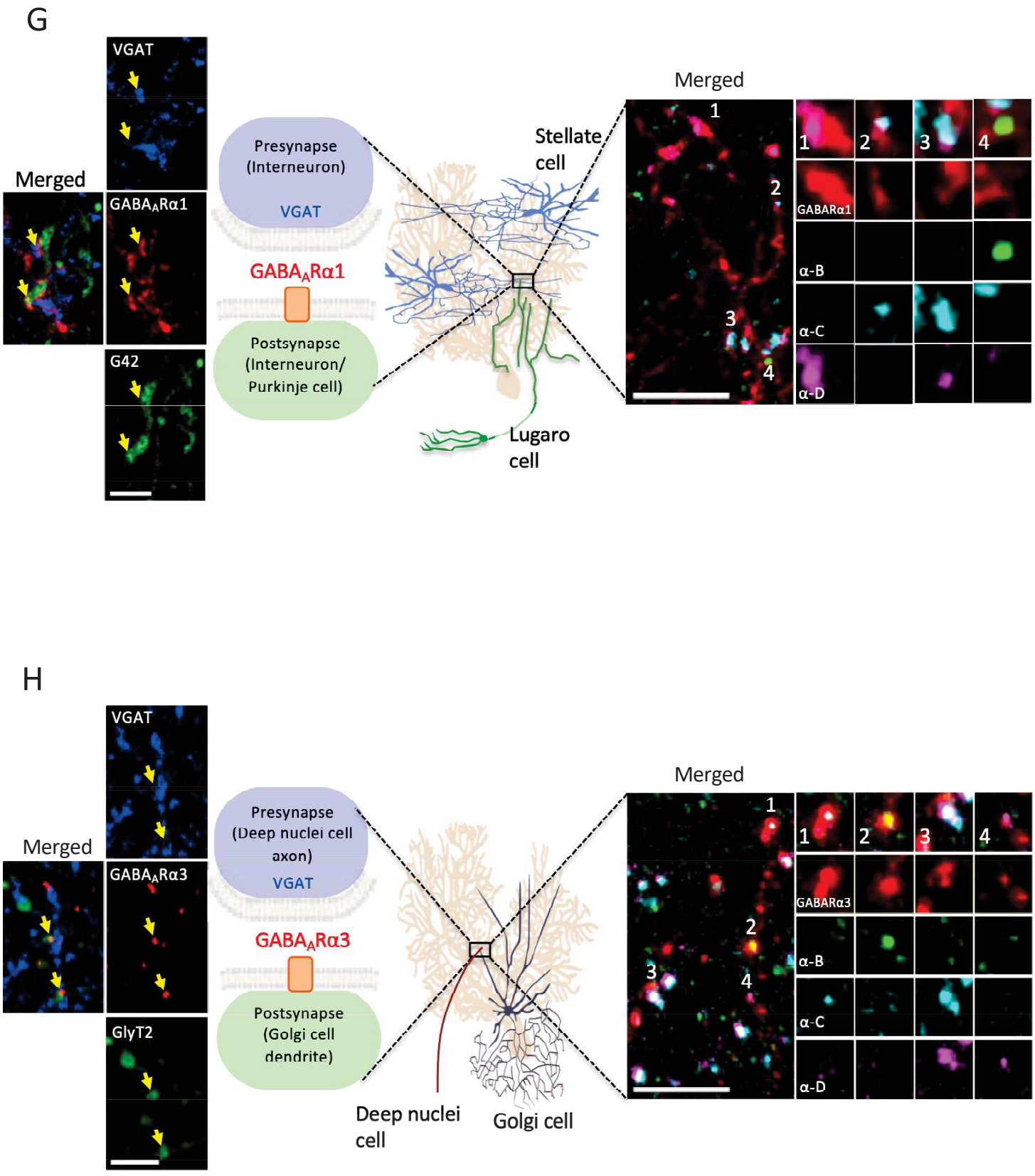
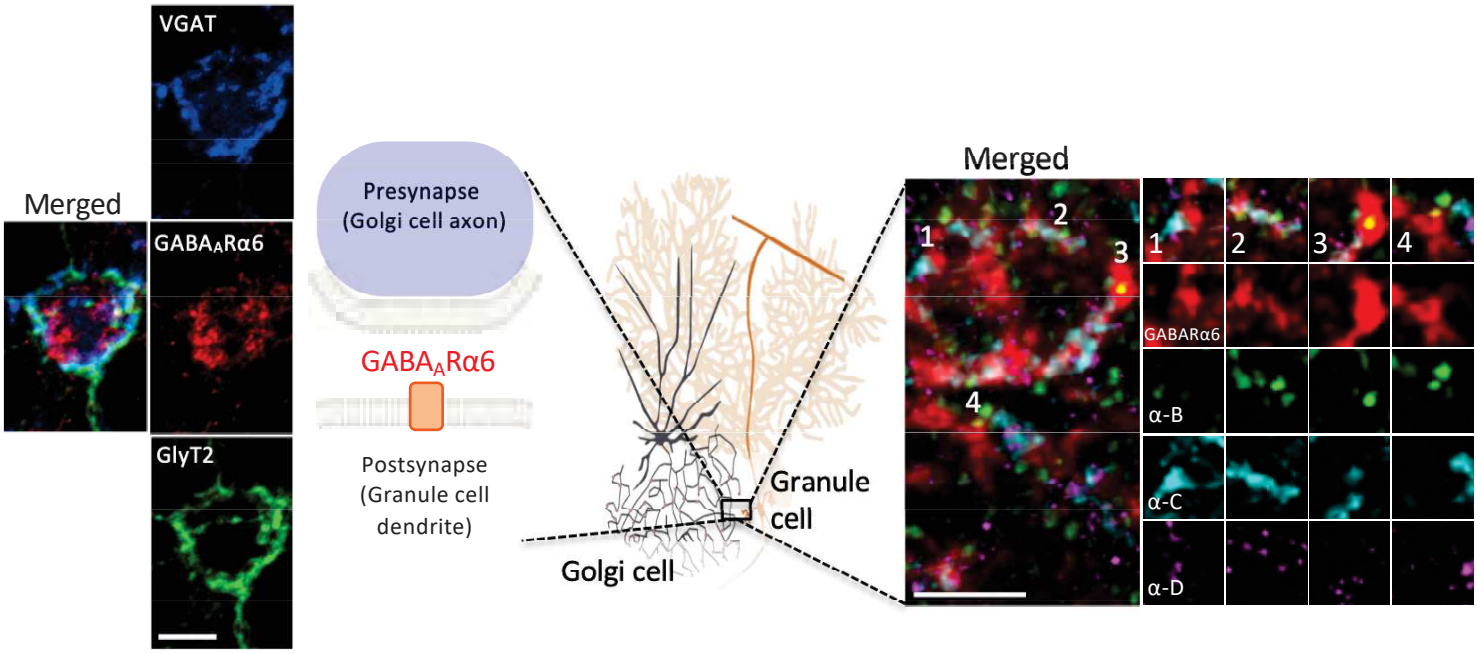

G
VGAT
Merged
GABA$_A$Rα1
G42
Presynapse
(Interneuron)
VGAT
GABA$_A$Rα1
Postsynapse
(Interneuron/
Purkinje cell)
Stellate
cell
Lugaro
cell
Merged
1
2
3
4
GABARα1
α-B
α-C
α-D
H
VGAT
Merged
GABA$_A$Rα3
GlyT2
Presynapse
(Deep nuclei cell
axon)
VGAT
GABA$_A$Rα3
Postsynapse
(Golgi cell
dendrite)
Deep nuclei
cell
Golgi cell
Merged
1
2
3
4
GABARα3
α-B
α-C
α-D

Fig.S4

I


VGAT
Merged
GABA$_A$Rα6
GlyT2
Presynapse
(Golgi cell axon)
GABA$_A$Rα6
Postsynapse
(Granule cell
dendrite)
Granule
cell
Golgi cell
Merged
1
2
3
4
1
2
3
4
GABARα6
α-B
α-C
α-D

J

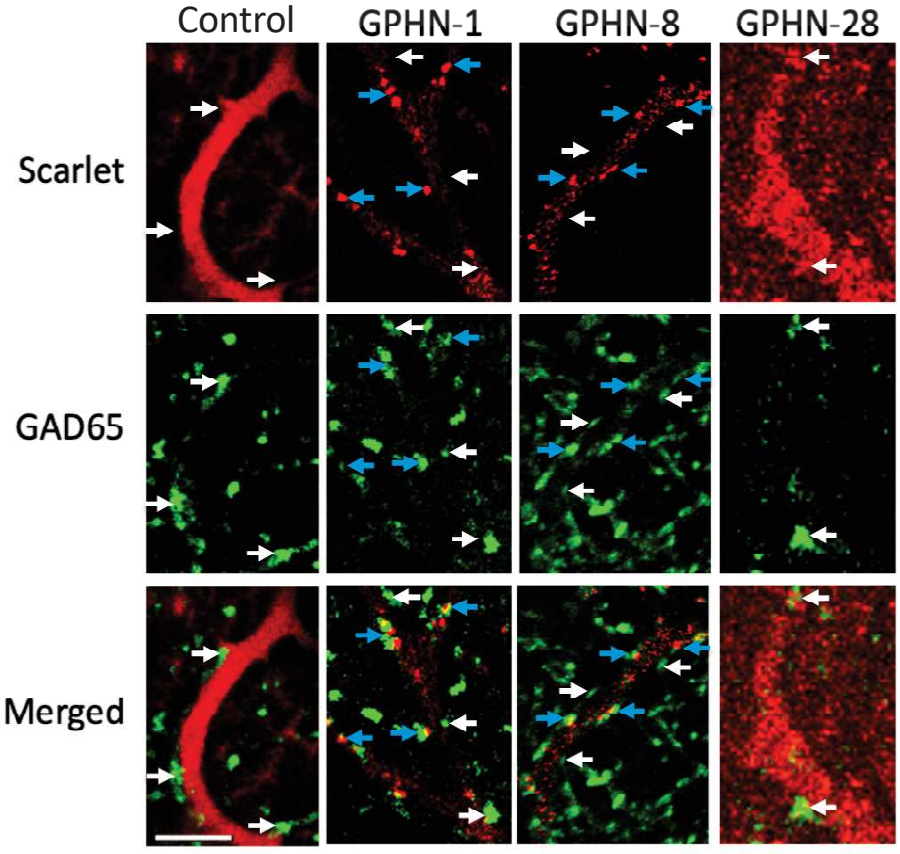
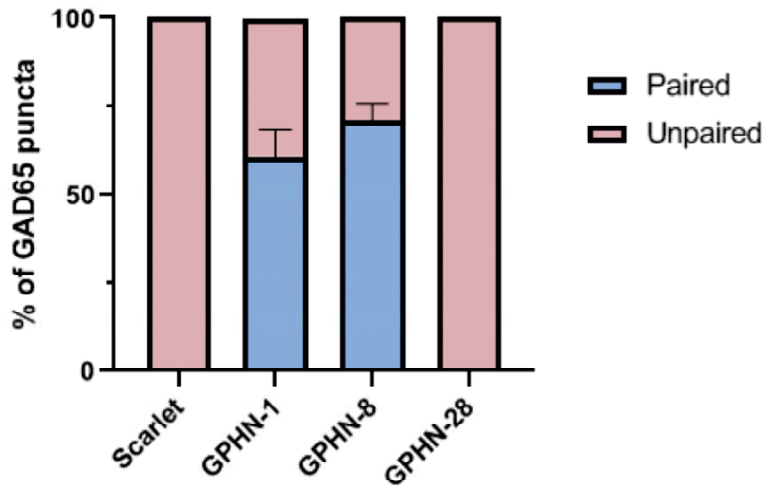

Control
GPHN-1
GPHN-8
GPHN-28
Scarlet
GAD65
Merged

Fig.S4

K


100
50
0
% of GAD65 puncta
Paired
Unpaired
Scarlet
GPHN-1
GPHN-8
GPHN-28

L

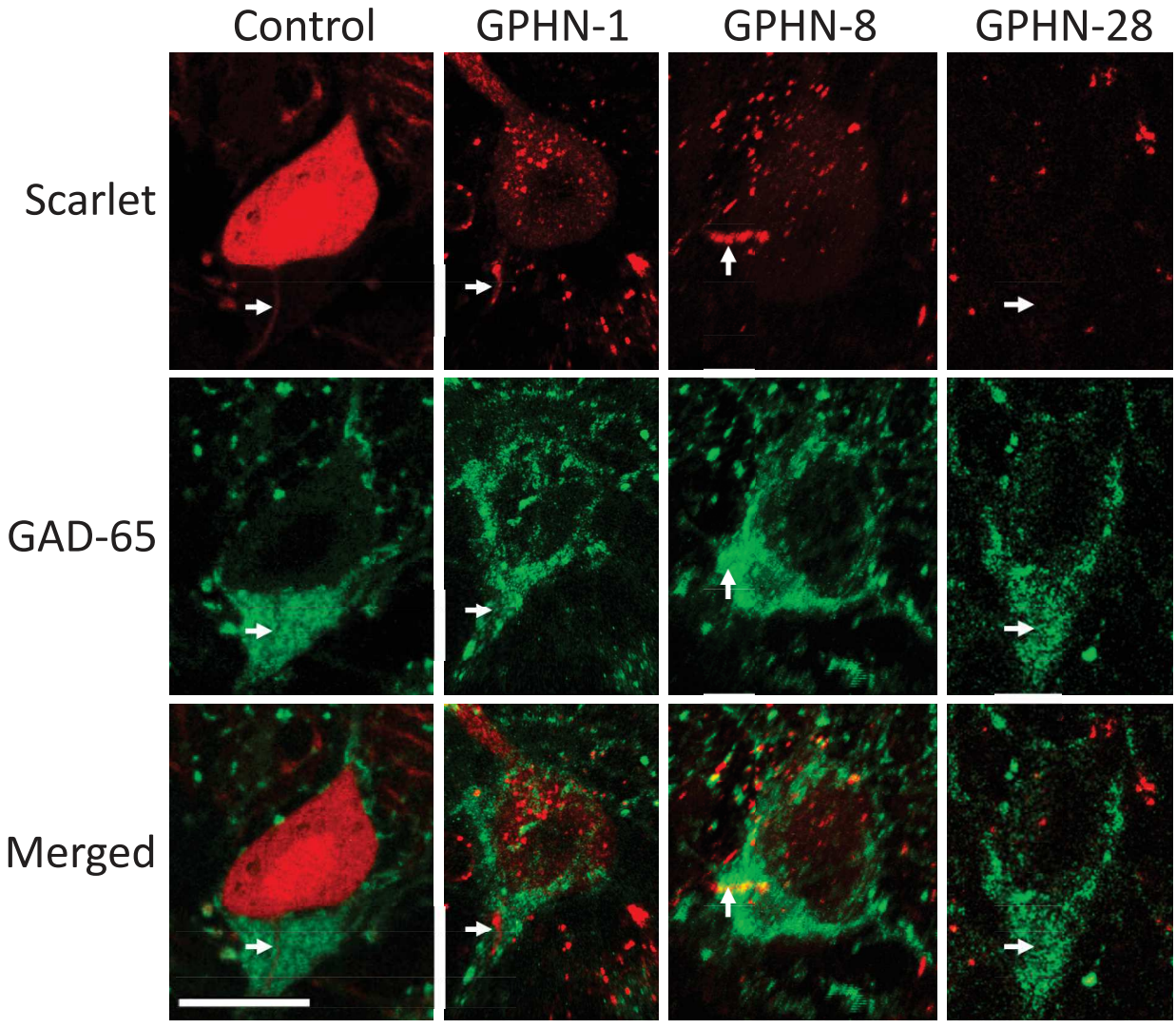

Control
GPHN-1
GPHN-8
GPHN-28
Scarlet
GAD-65
Merged

Fig.S4

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Conclusion générale :

Au cours de mes travaux nous nous sommes intéressés au rôle de la géphyrine et à l'épissage alternatif de cette protéine. Nous avons effectivement découvert plus de 270 variants d'épissage, dont le niveau d'expression est régulé au cours du temps et en fonction de la localisation. Nous avons observé que tous les domaines de la géphyrine sont soumis à l'épissage et avons confirmé l'existence de ces variants au niveau protéique. Nous avons observé des patterns de variants de géphyrine différents selon le type de synapse observé. Nous avons montré que l'épissage alternatif impacte la morphologie de la géphyrine, rendant la formation de cluster impossible, altérant la taille ou l'adressage synaptique des clusters. Nous avons enfin montré que l'épissage alternatif impacte également la formation ou le maintien des synapses. Ensemble ces résultats indiquent que les variants d'épissage de la géphyrine pourraient jouer un rôle dans la spécification d'une synapse inhibitrice, et que l'épissage alternatif est capable d'altérer le comportement de la géphyrine à la synapse, pouvant par extension altérer la fonction de la synapse.

Plusieurs expériences devront être effectuées pour confirmer les hypothèses soulevées par ces résultats. En premier lieu, l'impact fonctionnel des variants d'épissage sur la synapse doit être étudié. Des expériences d'électrophysiologie sur modèle de surexpression de certains variants, in vitro ou in vivo, afin de mesurer l'impact du variant surexprimé sur des paramètres tels que l'amplitude des courants inhibiteurs, qui dépend des récepteurs à la post-synapse, pourraient répondre à cette question. Les expériences d'immunohistochimie méritent également d'être continuées

afin d'affiner et de donner un sens aux patterns d'expression spécifiques aux types synaptiques étudiés. La génération d'anticorps reconnaissant seulement un variant unique, ou bien reconnaissant un site de liaison intéressant pourrait nous permettre d'attribuer à certains variants, et par extensions certain domaines de la géphyrine un adressage spécifique ou préférentiel à certains types de synapses. Cela permettrait de mieux caractériser la contribution de la régulation de l'épissage de géphyrine dans la formation et la fonction des synapses. Un modèle de KO conditionnel est en cours de développement et permettrait entre autres de mieux étudier l'impact d'un variant en éliminant les potentielles perturbations de la géphyrine endogène.

De manière générale, nous avons apporté des éléments de réponse qui supportent l'idée que l'épissage alternatif constitue un voie utilisée pour diversifier une même protéine et la rendre capable de remplir une fonction aussi complexe que l'organisation des synapses inhibitrices. Ces travaux constituent également un premier pas pour permettre d'expliquer la différence observée dans la variété des molécules d'échafaudage entre synapses excitatrices et synapses inhibitrices. Nous ne sommes pas à même d'expliquer pourquoi la diversité d'un type de synapse serait plutôt basé sur différentes protéines tandis qu'un autre type de synapse se reposerait plutôt sur une seule protéine dont la diversité dépend de l'épissage alternatif. Malgré cela, ces travaux mettent en lumière des mécanismes potentiellement cruciaux pour la mise en place des synapses et l'assemblage des réseaux neuronaux.

Discussion générale et perspectives

Les études effectuées sur la géphyrine appuient l'idée que cette protéine est cruciale pour la structure, la fonction et la plasticité des synapses inhibitrices, et qu'elle peut être centrale pour les circuits neuronaux qui subissent diverses formes d'inhibition in vivo. Cependant, nous ne comprenons pas encore complètement les rôles précis de la géphyrine au niveau des synapses GABAergiques et glycinergiques. Bien qu'une de nombreux partenaires protéiques se liant à la géphyrine aient été identifiés à ce jour, la liste n'est pas exhaustive et le rôle de chaque interaction n'est pas encore bien établi. À l'avenir, la protéomique avancée devra être utilisée pour identifier d'autres protéines de liaison et obtenir des informations supplémentaires sur les rôles synaptiques de la géphyrine. Il est également important de développer une compréhension plus détaillée de la façon dont les récepteurs inhibiteurs sont modulés dynamiquement notamment en ce qui concerne la spécification de la post-synapse. Le rôle de chaque domaine de la géphyrine mérite également notre attention, et ce d'autant plus que nos résultats ont révélé une régulation de la présence de ces domaines dans la protéine par l'épissage alternatif, donnant naissance à un éventail large d'isoformes à la composition exonique variée. En parallèle, les modifications post-traductionnelles, que nous avons considérées comme un autre moyen potentiel d'augmenter la diversité moléculaire de la synapse inhibitrice, méritent d'être étudiées de près afin de mieux établir leur rôle dans la spécificité synaptique.

1 - Les fonctions de la géphyrine en dehors de la synapse

Il est intéressant de noter que les homologues de la géphyrine sont hautement conservés au cours de l'évolution et qu'on la retrouve même chez les procaryotes dépourvus de système nerveux (Stallmeyer et al. 1999), ce qui suggère une fonction non neuronale supplémentaire. En effet, en plus de son rôle de composant structurel des sites postsynaptiques inhibiteurs, la géphyrine joue un rôle indépendant et vital dans les tissus périphériques où elle sert de médiateur à la biosynthèse du cofacteur de molybdène (MoCo). Tous les organismes expriment la géphyrine, soit en tant que protéine conservée au cours de l'évolution, soit en tant que polypeptide apparenté (Prior et al. 1992 ; Stallmeyer et al. 1999), ce qui reflète peut-être son rôle ancien dans la biosynthèse du MoCo (Feng et al. 1998 ; Stallmeyer et al. 1999 ; Schwarz et al. 2009). Le MoCo est indispensable à la fonction des molybdoenzymes. Ainsi, les mutations homozygotes de perte de fonction dans l'une des enzymes clés de la voie de biosynthèse du MoCo (y compris la géphyrine) conduisent à une condition clinique fatale caractérisée par des crises néonatales sévères et des dommages neurologiques continus, principalement dus à l'accumulation de sulfite (Feng et al. 1998 ; Reiss et Hahnewald 2011). Chez les mammifères, la géphyrine est détectée dans divers tissus non neuronaux, notamment le cœur, le foie, les muscles squelettiques, les reins, pancréas et l'estomac (Nawrotzki et al. 2012). Les transcrits de la géphyrine non neuronale contiennent invariablement une cassette (appelée C3 dans la littérature) qui est épissée pour les transcrits trouvés dans les neurones (Ule et al. 2003). Il est intéressant de noter que c’est sur cette cassette que se produisent de nombreuses MPT régulant la géphyrine. L'isoforme non neuronale n'est pas enrichie près des membranes

plasmiques, comme la forme neuronale, mais est au contraire distribuée de manière diffuse dans tout le cytoplasme. Outre son rôle dans la synthèse du MoCo, des preuves récentes suggèrent que la géphyrine est également impliquée dans la conversion des cellules α pancréatiques en cellules β en reliant les récepteurs GABAA pancréatiques liés à la membrane et le facteur de transcription Arx. Cette conversion peut être déclenchée par l'artéméther, un médicament antipaludique, par la stabilisation de la géphyrine (Li et al. 2017). Toutes les données recueillies jusqu'à présent suggèrent que la géphyrine joue plusieurs rôles, apparemment indépendants, dans les cellules neuronales et non neuronales. Ces informations sur les fonctions non-neuronales de la géphyrine sont d'autant plus intéressantes lorsque l'on considère nos résultats sur l'épissage alternatif de cette protéine. Les variants que nous avons sélectionnés n'ont été testé que dans le cadre de fonctions synaptiques, nous n'avons pas vérifié si d'autres fonctions de la géphyrine ont pu être altérées pour certains de nos variants et quels impacts cela a pu avoir sur l'état général du modèle étudié. De même, cela soulève de nombreuses questions sur le rôle et l'impact de l'épissage alternatif de la géphyrine dans les autres types cellulaires.

2 - La géphyrine dans les maladies neurologiques

2.1 - L'épissage alternatif de la géphyrine dans les maladies neurodéveloppementales

Plusieurs études se sont intéressées à des patients atteints d'épilepsie présentant des micro-délétions exoniques ou bien un épissage irrégulier de

l'ARN de la géphyrine. Il était connu qu'une inhibition GABAergique anormale est impliquée dans l'épilepsie, notamment l'épilepsie du lobe temporal (TLE) (Kumar et Buckmaster, 2006 ; Stief et al., 2007 ; Eichler et Meier, 2008). Une immunoréactivité réduite de la géphyrine dans la corne d'Ammon de l'hippocampe a été associée à l'épileptogenèse dans le modèle kaïnate de la TLE (Knuesel et al., 2001). Une étude s'est intéressée à des patients atteints de TLE et a trouvé quatre variants de géphyrine épissés de manière anormale et dépourvus de plusieurs exons dans leurs domaines G, et a placé la cause de l'épissage aberrant sur un stress cellulaire (Förstera et al., 2010). Une autre étude s'est intéressée à six patients diagnostiqués pour plusieurs maladies neurodéveloppementales, à savoir la schizophrénie, les troubles du spectre de l'autisme et la TLE, présentant des micro-délétions englobant les exons de la GPHN qui codent pour la partie N-terminale du domaine G de la géphyrine (Lionel et al., 2013). Enfin une étude s'est concentrée sur deux patients souffrant d'épilepsie généralisée présentant aussi des micro-délétion exoniques affectant le domaine G de la géphyrine (Dejanovic et al., 2014). Ces études conjointement révèlent une altération dans la fonction de la géphyrine, où les variants exprimés se révèlent avoir des effets dominant négatifs capable de bloquer la formation de clusters. Cet effet est attribué à l'absence de la partie N-ter du domaine G, responsable notamment de la trimérisation de la géphyrine. Dans d'autres cas de la même étude, les délétions exoniques causent un décalage du cadre de lecture et génèrent un codon stop. Les expériences *in vitro* de notre étude montrent que certains variants de la géphyrine dont le domaine G est épissé ont effectivement un effet dominant-négatif sur la formation de cluster (exemple : GPHN-14). Nous avons toutefois également des exemples où l'incapacité à former des clusters ne repose pas sur une altération du domaine G

(exemples : GPHN-28 et -32). Outre l'effet sur la formation de cluster, la liaison de la géphyrine aux récepteurs GABAA, notamment la sous unité α2, est impactée, et résulte en une transmission GABAergique altérée, ce qui pourrait être le lien avec les pathologies.
En ce qui concerne spécifiquement la schizophrénie, la géphyrine a également été identifiée comme facteur de risque de par son association avec d'autres interacteurs impliqués dans la maladie.

2.2 - L'épissage alternatif de la géphyrine dans les maladies neurodégénératives

En ce qui concerne les troubles neurodégénératifs, l'analyse de tissus cérébraux post mortem de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (MA) a permis de dévoiler une association étroite entre le dysfonctionnement de la géphyrine et les maladies neurodégénératives (Agarwal et al., 2008). Une accumulation anormale de géphyrine, colocalisée avec des plaques β-amyloïdes, a été détectée dans des échantillons de cerveau de patients atteints de la MA (Hales et al., 2013). L'analyse biochimique et protéomique a révélé un changement dans la solubilité de la géphyrine avec l'accumulation d'une isoforme de poids moléculaire inférieur (un produit de clivage de la géphyrine), et une quantité réduite du fragment de géphyrine de pleine longueur. Ces modifications peuvent altérer gravement la transmission GABAergique. Des altérations biphasiques des niveaux de géphyrine ont été décrites chez la souris APPPS1, un modèle animal de la MA, à différents âges (Kiss et al., 2016). Alors que les animaux âgés de 3 mois présentent, avant la formation des plaques, une expression accrue de la géphyrine au niveau des synapses inhibitrices dans la région CA1 de

l'hippocampe et dans le gyrus denté, les animaux transgéniques adultes présentent des niveaux diminués de la protéine d'échafaudage dans les zones hippocampiques dépourvues de plaques amyloïdes. Cela est conforme à l'activation accrue des gènes codant pour les protéines synaptiques, y compris celles impliquées dans l'organisation des synapses inhibitrices, observée chez les patients atteints de la MA avant l'apparition des déficits cognitifs (Bossers et al., 2010). L'altération de la fonction de la géphyrine, commune à plusieurs troubles neuropsychiatriques, fait de cette protéine d'échafaudage des synapses inhibitrices une cible possible pour des interventions thérapeutiques.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel et méthodes :

1 - Souris:

Des G42 (GAD67-GFP) and des GlyT2 (GlyT2-GFP) maintenues dans un background C57BL/6 (Charles River Laboratories) ont été utilisées pour les expériences d'immunohistochimie. Des Wild-type C57BL/6 ont été utilisées pour les injections stéréotaxiques et les expériences d'immunohistochimie. Des souris Swiss (Janvier Laboratories) ont été utilisées pour les cultures primaires de neurones.

1.2 - Animalerie:

Les animaux ont été élevés dans des conditions standards avec lumière et température contrôlées, et recevaient eau et nourriture ad libitum. Nous avons suivi les régulations Européennes et nationales pour le soin et l'utilisation des animaux afin de protéger les animaux vertébrés dans le cadre d'expérimentation à but scientifique (Directive 86/609). Toutes les expériences ont été approuvées par l'Animal Welfare and Ethical Review Body du Languedoc-Roussillon 15 (APAFIS#11841-2017101614199895 v5).

2 - Préparation des prélèvements:

Des souris C57BL/6, G42 ou GlyT2 âgées de 40 jours ont été utilisées. Les animaux ont été d'abord légèrement anesthésiés par inhalation d'isoflurane puis profondément anesthésiés avec du pentobarbital sodique par injection péritonéale. De l'Artificial Cerebro-Spinal Fluid (ACSF; NaCl 126 mM, KCl 3 mM, NaH_2PO_4 1,25 mM, $NaHCO_3$ 20 mM, $MgSO_4$ 2 mM, Dextrose 20mM, $CaCl_2$ 2mM) a été perfusé via le cœur pendant 2 minutes. Les

cerveaux une fois extraits ont été placés 2 heures dans une solution de PBS à 4% de paraformaldéhyde. Les cerveaux ont ensuite été coupés avec un microtome (Leica) pour obtenir des coupes de 50 µm conservées dans du PBS à 4°C pendant maximum deux semaines avant utilisation.

3 - Séquençage PacBio:

L'avantage principal de cette technique de séquençage pour notre étude est qu'elle est en long-read (jusqu'à 25 kb) et permet d'obtenir l'entièreté des séquences (full-length transcripts) sans avoir à passer par les étapes de lyse puis de reconstruction de la séquence, qui peuvent potentiellement empêcher de détecter certaines liaisons exoniques, voir des exons entiers. Cette méthode assure donc que nous trouvons tous les variants compris entre le premier et le dernier exon de la séquence, nous permettant ainsi d'obtenir une bibliothèque complète des variants d'épissage de la géphyrine.

L'ARN a été extrait des tissus corticaux et cérébelleux comme décrit dans Chomczynski et Sacchi, 2006 ; et une transcription inverse (RT) avec primer spécifique a été effectuée avec le primer GPHN-49: GTACTGTGCCTGAGGCTGC. L'expression de *Gphn* a ensuite été amplifiée par deux cycles de PCR, d'abord 20 cycles avec les primers TGGATCACTTGTGCAAGCATCACATCGTAGCAGGATACAGTCAA TGATATGTGGACATGC, et après purification de fragment PCR une seconde PCR de 23 cycles a été appliquée à chaque échantillon avec des primers avec code-barres (BC) :
BC-GCAGTCGAACATGTAGCTGACTCAGGTCAC
et BC-TGGATCACTTGTGCAAGCATCACATCGTAG. Les PCR ont été purifiées avec NucleoMag NGS Clean-up (Macherey-Nagel), quantifiées

avec Qubit, et une quantité stœchiométrique de chaque échantillon a finalement été mélangée pour construire ensuite une bibliothèque multiplexée. Ce répertoire a été constitué selon les suggestions de PacBio et séquencé, 114458 reads ont été obtenus après sélection avec une taille moyenne de 16,508 bases. CCS a révélé une taille moyenne de 2,3kb.

Pour décrire brièvement la technique de séquençage de molécule unique en temps réel (SMRT pour Single-Molecule Real-Time), des cellules SMRT contenant plusieurs million de structures, des guides d'ondes optiques appelés ZMW (zero-mode waveguide), dans lesquels sont ancrés une molécule d'ADN et une ADN polymérase. Le ZMW est capable d'illuminer un volume infime (de l'ordre du zeptolitre) et permet ainsi d'observer un seul nucléotide lors de son incorporation par la polymérase. Chaque base, préalablement étiquetée avec une molécule fluorescente, perd alors cette molécule. Le changement du signal fluorescent qui en résulte est détecté et permet ainsi d'identifier la base en question. Le processus se répète ainsi pour chaque base permettant le séquençage d'une seule molécule d'ADN en temps réel.

3.1 - PacBio et analyse en short reads:

3.1.1 - Analyse PacBio:

Les données de PacBio ont été traitées à l'aide d'approches informatiques et manuelles car le logiciel Isoseq 3.1.1 fourni par PacBio ne permettait pas d'obtenir des groupes homogènes de séquences circulaires consensuelles (CCS) identiques. Les CCS ont été obtenues à partir de la plateforme de

séquençage de Cold Spring Harbor et alignées sur le génome de la souris GRCm38.p6 à l'aide de STARlong 2.5.3a. Les intervalles génomiques présentant des alignements avec le CCS (correspondant à des exons potentiels) ont été extraits en utilisant bedtools 2.27.1merge à partir de fichiers bam fusionnés générés avec samtools 1.6. Chaque exon potentiel a été extrait à l'aide de bedtools 2.27.1 getfasta et vérifié à l'œil pour ne garder que ceux encadrés avec des dinucléotides canoniques GT-AG à leurs sites d'épissage. Les exons retenus ont ensuite été alignés sur les CCS avec l'algorithme blastn-short de blastn 2.2.31 (en utilisant un seuil de valeur de 0,001 et une pénalité de -2 pour l'inadéquation des nucléotides) pour annoter chaque CSS avec un code binaire 1 et 0 pour la présence ou l'absence d'un exon distinct. Les transcriptions théoriques ont été construites en concaténant les séquences d'exon et, en fonction de leur annotation, les CCS ont ensuite été alignées sur chaque séquence de transcription théorique (à l'aide d'un alignement global espacé, similaire à l'algorithme de Needleman-Wunsch avec Exonerate 2.4.0) pour fournir un score d'alignement utilisé comme contrôle de qualité. Les séquences similaires ont été regroupées et les CCS mal alignés ont été supprimés. L'homogénéité de chaque groupe a été vérifiée visuellement à l'aide du logiciel Snapgene. Le nombre de CCS présents dans chaque groupe a été quantifié afin d'établir une évaluation globale de l'expression de la transcription alternative de *Gphn*. R 3.3.2 et ggplot ont été utilisés pour produire le graphique de composition globale des isoformes.

3.1.2 - Analyse de l’expression de *Gphn* dans les types cellulaires du cerveaux:

Les exons de *Gphn* exprimés dans des types de cellules neuronales distincts ont été analysés à l'aide des données Illumina de Zhang et al, 2014 correspondant à l'expression totale du gène. Une séquence artificielle contenant toutes les jonctions d'exon *Gphn* a été utilisée pour aligner les reads courts à l'aide de Hisat 2.1.0 (avec l'option -no-spliced-alignment). En utilisant FeatureCounts 1.6.4, les reads alignés ont été quantifiés pour évaluer l'expression de chaque exon. Pour comparer l'expression des exon entre les sous-types cellulaires, nous avons normalisé leur quantification par l'expression globale de *Gphn* dans chaque type de cellule.

3.1.3 - Analyse pour valider les jonctions exon-exon de *Gphn* dans le cerveau murin:

Les jonctions d'exon de *Gphn* détectées à l'aide de reads courts sont rapportés dans 82 ensembles de données accessibles au public. Une séquence artificielle contenant toutes les jonctions d'exon détectées a été utilisée pour aligner les reads courts à l'aide de Hisat 2.1.0 (avec l'option -no-spliced-alignment). En utilisant FeatureCounts 1.6.4, les reads alignés ont été quantifiés pour évaluer la détection des jonctions. Enfin, nous les avons comparés aux nombres de reads supportant chaque jonction obtenus par séquençage PacBio.

3.2 - Protéome théorique de GPHN *In silico*:

Chaque ADNc a été traité avec ORFfinder (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/) en utilisant une longueur minimale d'ORF de 300 nucléotides et les paramètres " ATG " et codons d'initiation alternatifs. Les 31 sites d'initiation de la traduction ont ensuite

été filtrés à l'aide des données publiées dans Fields et al. 2015 pour ne retenir que ceux qui soutiennent les évidences biologiques. Les ORFs trouvées plus d'une fois ont été supprimées ainsi que celles contenant un codon stop dans les exons en amont de l'exon 40 (ces codons stop ont été considérés comme PTC). Les ORF obtenus à partir de cette pipeline ont été considérées comme étant le protéome théorique de GPHN. Des extraits protéiques de cervelet, cortex, hippocampe, muscle, cœur et rate ont été préparés et séparés en PAGE-SDS pour sonder l'expression endogène de GPHN par western blots en utilisant l'anticorps mab3B11.

3.3 - Analyse RT-PCR :

L'ARN extrait des tissus du cortex et du cervelet à P7, P9, P13, P15, P21 et P40 a été rétro-transcrit avec GPHN-49 et amplifié par PCR en utilisant un set d'amorces spécifique :

- GGAGTCCTCACAGCCCACATAAAC et CTAGCCACCTTGGTGATATCTACAGC
- CTCTTGCTGCAAAGTTGACCAACTTTAG et GTTCCTTTGGCCAAAACACACTC
- CAAGAAAGGATCTCAGTAGTGCAAGTTG et CTGATACCCTCATTCAAGGCATTGAG
- GTCCTCACAGTGGTTGCCG et CTGCATCTTTCTCAGTGCAGGTACAAC
- GAGTCCTCACAGGAAAGATTCGGG et GGTGATGCCAAGTCAGTATACACC

Enfin, les PCR ont été analysées en gel d'agarose et colorées avec du bromure d'éthidium.

4 - Préparation des polysomes :

Des extraits cytoplasmiques contenant la machinerie de traduction ont été préparés à partir de cerveaux de souris adultes comme décrit dans Lou et al., 2014 et les ARN ont été purifiés après dilution des fractions de saccharose avec H2O (50% v/v). Les ARN ribosomiques (28S, 18S et 5S) ont été séparés sur gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium, tandis que les isoformes de *Gphn* ont été amplifiées et analysées.

5 - Préparation des lysats de cerveaux entiers :

Après dislocation cervicale, les cerveaux entiers de souris adultes mâles et femelles C57Bl6 sauvages ont été extraits du crâne et rapidement refroidis à 4°C puis homogénéisés dans 1 mL de tampon de lyse (20 mM HEPES, 100mM KCH3COOH, 40mM KCl, 5mM EGTA, 5mM MgCl2, 5mM DTT, 1mM PMSF, 1% Triton X, CompleteTM EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche, Mannheim, Germany), pH 7.2) par 200 mg en utilisant un homogénéiseur à piston (8 coups à 900 rpm). La solution a été centrifugée à 10,000 × g à 4°C pendant 15 min. Le surnageant a été aliquoté et congelé rapidement dans de l'azote liquide puis conservé à −80 °C.

5.1 - Isolation de la géphyrine des lysats de cerveaux :

La résine pour le pulldown de la géphyrine a été préparée dans des colonnes micro-spin de 400 µl (Thermo Scientific, Karlsruhe, Allemagne). Le peptide

FSIVGRYPRRRRC (KD (Gephyrin) = 140 pM) (10.1038/nCHeMBIO.2246) a été dissous dans un tampon de couplage (50 mM Tris, 5mM EDTA, pH 8.5) à une concentration de 1 mM et incubé pendant 2 h à RT avec la résine iodoacétyle Ultra Link (Thermo Scientific, Karlsruhe, Allemagne) lavée et équilibrée. La résine obtenue a été lavée et les groupes iodoacétyle résiduels ont été éteints par incubation avec de la cystéine 1 mM pendant 2 h et stockés à 4 °C après un lavage approfondi avec un tampon de couplage.

Le lysat de cerveau entier a été incubé sur la résine FSIVGRYPRRRRC pendant 30 minutes à 4°C et lavé trois fois avec le tampon de lysat. Les protéines liées ont été éluées avec le tampon d'échantillon NuPAGE LDS (Life Technologies) à 90°C pendant 3 minutes. Du Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) a été ajouté à une concentration finale de 20 mM et incubé à 90°C pour obtenir une réduction complète. Ensuite, les protéines ont été alkylées en utilisant de l'iodoacétamide (120 mM) pendant 20 min à température ambiante dans l'obscurité, 30 µl des protéines dénaturées, réduites et alkylées résultantes ont été séparées en masse par des gels NuPAGE Novex 4-12 % Bis-Tris (Life Technologies) avec du tampon MOPS. Les gels ont été lavés trois fois pendant 5 min avec de l'eau, colorés pendant 45 min avec Simply Blue™ Safe Stain (Life Technologies) et lavés à l'eau pendant 1 h.

Les bandes de gel ont été excisées et décolorées avec 30 % d'acétonitrile dans 0,1 M NH4HCO3 (pH 8), rétrécies avec 100 % d'acétonitrile et séchées dans un concentrateur sous vide (Concentrator 5301, Eppendorf, Allemagne). Les digestions ont été effectuées avec 0,1 µg de protéase (trypsine, élastase, thermolysine ou papaïne) par bande de gel pendant une

nuit à 37 °C dans du NH4HCO3 0,1 M (pH 8). Après avoir retiré le surnageant, les peptides ont été extraits des tranches de gel avec de l'acide formique à 5 %, et les peptides extraits ont été regroupés avec le surnageant.

6 - Analyse NanoLC-MS/MS

Les analyses NanoLC-MS/MS ont été réalisées sur un Orbitrap Fusion (Thermo Scientific) équipé d'une source d'ions EASY-Spray et couplé à un EASY-nLC 1000 (Thermo Scientific). Les peptides ont été chargés sur une colonne de piégeage (2 cm x 75 µm ID, PepMap C18, particules de 3 µm, taille des pores 100 Å) et séparés sur une colonne EASY-Spray (25 cm x 75 µm ID, PepMap C18, particules de 2 µm, taille des pores 100 Å) avec un gradient linéaire de 30 minutes de 3 % à 40 % d'acétonitrile et 0,1 % d'acide formique.

Les scans MS et MS/MS ont été acquis dans l'analyseur Orbitrap avec une résolution de 60 000 pour les scans MS et de 15 000 pour les scans MS/MS. Une fragmentation HCD avec une énergie de collision normalisée de 35 % a été appliquée. Une méthode MS/MS Top Speed dépendante des données avec un temps de cycle fixe de 3 secondes a été utilisée. L'exclusion dynamique a été appliquée avec un nombre de répétitions de 1 et une durée d'exclusion de 30 secondes ; les précurseurs à charge unique ont été exclus de la sélection. Le seuil minimum pour la sélection des précurseurs a été fixé à 50 000. Un AGC prédictif a été utilisé avec une valeur cible d'AGC de 2e5 pour les balayages MS et 5e4 pour les balayages MS/MS. EASY-IC a été utilisé pour l'étalonnage interne.

6.1 - Analyse des données MS

Les données MS ont été analysées avec PEAKS Studio X+ (Bioinformatics Solutions Inc., Canada). Le raffinement des données brutes a été effectué avec les paramètres suivants : Merge Options: no merge, Precursor Options: corrected, Charge Options: 1-6, Filter Options: no filter, Process: true, Default: true, Associate Chimera: yes. Le séquençage de novo et la recherche dans les bases de données ont été effectués avec une tolérance d'erreur de masse des parents de 10 ppm. La tolérance d'erreur sur la masse du fragment a été fixée à 0,02 Da, et l'enzyme a été fixée à 0. Les modifications variables suivantes ont été utilisées : Oxydation (M), pyro-Glu de Q (N-term Q), phosphorylation (STY), acétylation (N-terminal de la protéine) et carbamidométhylation (C). Un maximum de 3 MPT variables était autorisé par peptide.

Les données ont été recherchées dans une base de données fasta concaténée à partir d'UniProt_mouse (UP000000589, protéome de référence, 55408 protéines, 5-Nov-2019, toutes variantes), des séquences de géphyrine prédites (XP_) et validées (NP_) du NCBI et d'une base de données ORF personnalisée construite comme décrit ci-dessus. La liste des peptides identifiés a été filtrée à 1% PSM-FDR. Tous les peptides dérivés de la géphyrine ont été appariés aux entrées de la base de données ORF en utilisant ProteoMapper.

7 - Constructions :

Les ADN circulaires correspondant aux variants d’épissage sélectionnés de *Gphn* ont été construits en utilisant le kit QuikChange II Site-Directed Mutagenesis et clonés dans une version modifiée de vecteur pLVX-puro

pour lequel le promoteur CMV a été remplacé par le promoteur hSyn (human synapsin). Chaque cDNA est cloné avec Scarlet et des tags Flag-V5 ajoutés du côté 5'. Les particules lentivirales ont été produites en utilisant des cellules HEK-293 co-transfectées avec pLVX-FV5-Scarlet-GPHNs et pCMV-VSV-G, puis les particules ont été concentrées par gradient de centrifugation. L'expression de protéines exogènes a été testé par Western Blot en utilisant un anticorps anti-V5 (Invitrogen).

8 - Immunohistochimie :

8.1 - Immunohistochimie sur coupe flottante :

Les coupes sont d'abord incubées dans une solution de blocking (0,1% Triton, 5% Sérum de cheval dans du TBS) pendant 2h à température ambiante sur plateau agitant. La solution est ensuite aspirée et remplacée par une solution d'anticorps primaire (0,1% Triton, 5% Sérum de cheval dans du TBS) additionnée des anticorps adéquats aux dilutions indiquées sur le tableau des anticorps, l'incubation s'effectue à 4°C sur la nuit, soit 12h. Les coupes sont ensuite lavées avec du PBS à trois reprises pendant 10 minutes sur plateau agitant, puis la solution d'anticorps secondaire (0,02% Triton, 5% Sérum de cheval dans du TBS) contenant les anticorps secondaires adéquats aux dilutions indiquées sur le tableau des anticorps est ajoutée, l'incubation dure 1h à température ambiante sur plateau agitant. Les coupes sont à nouveau lavées avec du PBS à trois reprises pendant 10 minutes sur plateau agitant. Les coupes sont enfin montées entre lame et lamelle dans un milieu durcissant (Vectashield Hard Set).

8.2 - Immunohistochimie sur culture cellulaire :

Les cultures sont récupérées 12 à 14 jours après mise en culture. Un rinçage au PBS à 37°C est effectué pour éliminer le milieu de culture, puis chaque puits reçoit 1 mL de PFA 4% pendant 5 min sous agitation. La PFA est ensuite éliminée par trois rinçages au PBS de 10 min sous agitation. Les cultures sont ensuite perméabilisées avec une incubation de 5 min dans du PBS à 0.02% de Triton. La solution est ensuite aspirée et remplacée par une solution d'anticorps primaire (0,1% Triton, 5% Sérum de cheval dans du TBS) additionnée des anticorps adéquats aux dilutions indiquées sur le tableau des anticorps, l'incubation s'effectue à température ambiante pendant 2h. Les cultures sont ensuite lavées avec du PBS à trois reprises pendant 10 minutes sur plateau agitant, puis la solution d'anticorps secondaire (0,02% Triton, 5% Sérum de cheval dans du TBS) contenant les anticorps secondaires adéquats aux dilutions indiquées sur le tableau des anticorps est ajoutée, l'incubation dure 1h à température ambiante sur plateau agitant. Les cultures sont à nouveau lavées avec du PBS à trois reprises pendant 10 minutes sur plateau agitant. Les lamelles sont enfin récupérées et légèrement séchées afin d'éliminer un excès de PBS, puis montées sur une lame en utilisant un milieu de montage durcissant (Vectashield Hard Set).

8.3 - Tableau des anticorps:

Antigène	Espèce	Dilution	Provenance	n° catalog	RRID
GAD-65	Souris	1:500	Chemicon	MAB351R	RRID:AB_94905

Gphn (A)	Lapin	1:1000	Abcam	ab32206	RRID:AB_2112628
Gphn (B)	Poule	1:500	Abcam	ab136343	RRID: none
Gphn (C)	Souris	1:500	Synaptic System	147111	RRID:AB_887719
Gphn (D)	Cochon d'inde	1:250	Synaptic System	147318	RRID:AB_2661777
VGAT	Cochon d'inde	1:500	Synaptic System	131004	RRID:AB_887873
α-dystroglycan	Souris	1:500	Millipore	05-298	RRID:AB_309674
$GABA_AR\alpha1$	Lapin	1:1000	Alomone Labs	AGA-001	RRID:AB_2039862
$GABA_AR\alpha3$	Lapin	1:1000	Alomone Labs	AGA-003	RRID:AB_2039866
$GABA_AR\alpha6$	Lapin	1:1000	Alomone Labs	AGA-004	RRID:AB_2039868
Calbindin	Lapin	1:1000	Swant	CB38	RRID:AB_2721225
GFP	Poule	1:1000	Aves Lab	GFP-1020	RRID:AB_10000240

Secondaire	Espèce	Dilution	Provenance	N° catalog	RRID
Mouse Alexa 488	Âne	1:500	Molecular probes	A-21202	RRID:AB_141607
Mouse Alexa 405	Chèvre	1:500	Molecular probes	A-31553	RRID:AB_221604
Mouse Alexa 546	Chèvre	1:500	Molecular probes	A-11003	RRID:AB_2534071
Rabbit Alexa 546	Chèvre	1:500	Molecular probes	A-11010	RRID:AB_2534077
Chicken Alexa 488	Chèvre	1:500	Molecular probes	A-11039	RRID:AB_142924
Guinea pig Alexa 647	Âne	1:500	Jackson ImmunoResearch Labs	706-605	RRID:AB_2340476

9 - Culture cellulaire

9.1 - Culture de cellules HEK

Les cellules HEK-293H sont maintenues en culture dans un milieu DMEM augmenté de sérum de veau fœtal et d'antibiotiques (Pénicilline-Streptomycine) dans des flasques de 75cm² ensemencées avec 30000 cellules par cm² dans un incubateur à 37°C, 5% de CO_2 et humidité contrôlée. Pour les expériences, des lamelles de 12 mm sont placées dans des plaques 24 puits. Les cellules sont rincées au PBS stérile avant d'être incubées 5 min dans 5 mL de trypsine-EDTA chauffée à 37°C. L'action de la trypsine est arrêtée avec l'ajout de 10 mL de milieu DMEM complet, les tubes sont ensuite centrifugés 8 min à 1000 rpm, le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 5 mL de milieu DMEM complet. La suspension est dispensée pour obtenir environ 200000-300000 cellules par puits.

9.2 - Culture primaire de neurones hippocampiques:

Un jour avant la mise en culture, des lamelles de verre stérilisées de 12 mm de diamètre sont insérées dans une plaque 24 puits où elles sont coatées avec une solution de poly-L-ornithine. Les plaques sont conservées 12h dans un incubateur à 37°C avec une concentration en CO_2 à 5% et un taux d'humidité contrôlé. Le jour de la manipulation, les plaques sont rincées 3 fois avec du PBS. Des souris Swiss à 18 jours de gestation sont préalablement anesthésiées profondément par isoflurane, puis euthanasiées par dislocation cervicale. Les embryons sont ensuite décapités et les têtes sont placées dans des boîtes de Pétri posées sur de la glace remplies de PBS froid additionné de glucose et d'antibiotiques (Pénicilline-Streptomycine). Les têtes sont ensuite disséquées pour extraire le cerveau, puis les cerveaux sont disséqués pour séparer les hippocampes, qui sont ensuite placés dans des tubes contenant du milieu Neurobasal (Gibco) à 37°C. Les hippocampes sont ensuite dissociés par trituration avec trois pipettes Pasteur en verre chauffées

au bec Bunsen pour obtenir des diamètres différents, le diamètre le plus élevé étant utilisé en premier, le surnageant est récolté en prenant soin de ne pas récupérer du tissu non dissocié, puis le procédé est répété avec les pipettes de diamètre inférieur. La suspension est ensuite centrifugée pendant 8 minutes à 1000 rpm. Le surnageant est éliminé, et le culot est re-suspendu dans du Neurobasal complet (supplémenté de B27, L-glutamine et antibiotiques) à 37°C. Un comptage est effectué pour déterminer la concentration de cellules vivantes dans la suspension. Les neurones sont ensuite disséminés dans les plaques 24 puits coatées à la poly-L-ornithine à raison de 200000 cellules par puits. Les cultures sont ensuite conservées dans un incubateur à 37°C avec une concentration en CO_2 à 5% et un taux d'humidité contrôlé.

9.3 - Culture primaire de neurones du cervelet:

Un jour avant la mise en culture, des lamelles de verre stérilisées de 12 mm de diamètre sont insérées dans une plaque 24 puits où elles sont coatées avec une solution de poly-L-ornithine. Les plaques sont conservées 12h dans un incubateur à 37°C avec une concentration en CO_2 à 5% et un taux d'humidité contrôlé. Le jour de la manipulation, les plaques sont rincées 3 fois avec du PBS. Les souris G42 ou C57/Bl6 à P3-5 sont décapitées et les têtes sont placées dans des boîtes de Pétri posées sur de la glace remplies de PBS froid additionné de glucose et d'antibiotiques (Pénicilline-Streptomycine). Les têtes sont ensuite disséquées pour extraire le cerveau, puis les méninges entourant le cervelet sont enlevées à l'aide de pinces. Une fois nettoyé, les cervelets sont extraits puis placés dans des tubes contenant du milieu Neurobasal (Gibco) à 37°C. La dissociation et la mise en culture se fait

ensuite exactement comme pour les cultures d'hippocampes décrites précédemment.

9.4 - Infection des cultures cellulaires:

Un jour après la mise en culture, l'état des neurones est vérifié. Si la culture paraît en bonne santé, chaque puits reçoit une dose d'1 µL de la suspension de lentivirus contenant le plasmide adéquat. Les cultures sont remises en incubateur et sont maintenues pendant 10 jours supplémentaires dans les mêmes conditions décrites précédemment.

10 - Injection stéréotaxique dans le cervelet:

Des souris mâles C57BL/6 âgées de 40 à 50 jours ont été utilisées. Les souris ont été profondément anesthésiées par isoflurane avant d'être placées sur un cadre stéréotaxique avec un masque à isoflurane fabriqué sur place. Du gel ophtalmique (Ocry-gel) a été étalé sur les yeux de la souris puis une injection sous cutané de lidocaïne (Xylocaïne) suivi d'une application de bétadine ont été pratiquées sur l'aire ciblée (nuque) avant incision de la peau. Après incision, les muscles ont été séparés et écartés du site d'injection en utilisant des pinces et en limitant autant que possible leur lésion. La craniotomie a été effectuée bilatéralement avec une perceuse fine. Des capillaires de verres préalablement remplis d'huile minérale puis chargés avec une suspension de lentivirus sont fixés à la pompe stéréotaxique, puis insérés dans le cortex cérébelleux par les trous opérés dans le crâne. La pompe utilisée est le NanoLiter Injector avec la micro-pompe et commande UMP3000 (World Precision Instruments). Chaque site d'injection a reçu 1 µL, l'injection se

produisant sur un laps de 3 minutes. Le capillaire est ensuite laissé en place pendant 3 minutes supplémentaires avant d'être retiré lentement sur un laps de 2 minutes. Les bords de la peau au niveau de l'incision ont ensuite été recollés avec de la colle chirurgicale pour peau (Vetbond). Les souris ont ensuite reçu une injection de buprénorphine (Vetergesic) pour gérer la douleur post-opératoire. Les animaux ont été surveillés chaque jour pour s'assurer l'absence de troubles liés à la douleur, le cas échéant des administrations de buprénorphine sont opérées. Les animaux ont été gardés 10 jours avant prélèvement des cerveaux pour les expériences d'immunohistochimie.

11 - Acquisition et quantification des images:

Les échantillons de tissus et les cultures ont été imagés sur un microscope confocal Zeiss LSM780 pour obtenir un stack; le pinhole, les paramètres du filtre de détection, le dwell time et la taille du pas ont été conservés pour chaque expérience. (40X objectif à immersion dans l'huile, 1.3 NA, 1024x1024 en résolution, 16 bits, 0,4 µm taille de pas). Les photomicrographes ont été obtenus avec les paramètres de filtres band-pass et long band-pass suivants: alexafluor 405 (filtre band pass: 460/50), alexafluor 488/Cy2 (filtre band pass: 505–530), Cy3 (filtre band pass: 10 560–615) et Cy5 (filtre band pass 650). Tous les paramètres ont été conservés pour chaque section d'une même expérience. Au moins trois coupes par site d'injection ont été utilisées pour chaque analyse d'immunofluorescence (n = 3 souris / marquage). Les cultures de neurones d'hippocampe ont été répétées au moins trois fois, et les neurones infectés ont été analysés. Pour chaque neurone, les dendrites proximaux (50-100µm) ont été utilisés comme ROI. Les analyses ont été effectuées sur le logiciel

Fiji (ImageJ). Les images ont été traitées par l'application d'un seuil en utilisant la commande MaxEntropy Auto-Threshold. Les clusters de GPHN ou les puncta de GAD65 ont été ensuite annotés et comptés. La fonction Measure Particle a été utilisée pour mesurer l'aire d'un cluster de GPHN. Pour les analyses d'immunofluorescence, au moins trois souris ont été utilisées et au moins trois coupes par souris ont été imagées. Pour chaque image, des ROI de taille identique ont été sélectionnées. Pour les coupes de cervelet, les images ont été prises de manière à contenir les trois couches. Toutes les analyses ont été effectuées sur la couche moléculaire à l'exception de l'analyse sur les corps cellulaires des Purkinje avec le marquage α-dg et sur les dendrites de cellules granulaires avec le marquage GABAARα6. Pour les cultures de cellules HEK, les marquages ont été répétés trois fois, et chaque image contient plusieurs cellules sélectionnées pour l'analyse. La colocalisation entre les clusters a été analysée avec le logiciel Icy en utilisant le plugin SODA (Statistical Object Distance Analysis) lorsque le nombre de canaux étudié était en dessous de trois. Des ROI ont été délimitées sur les images, et les protocoles SODA 2 colors ou SODA 3 colors ont été appliqués. Les résultats ont été vérifiés par comptage manuel utilisant la méthode décrite plus bas pour s'assurer que les paramètres de threshold et de distance entre deux points étaient adéquats. Pour les images avec quatre canaux et pour la vérification des analyses par SODA, le logiciel Fiji (ImageJ) a été utilisé. Les images ont été traitées par l'application d'un threshold en utilisant la commande MaxEntropy Auto-Threshold. Au sein d'une ROI, tous les clusters de chaque canal ont été annotés et comptés, et les clusters ont été considérés comme colocalisés si la distance qui les sépare est inférieure à 210 nm, ce qui est la résolution optique du microscope et

objectif choisis. Cette analyse a été effectuée indépendamment par deux expérimentateurs.

11.1 - Analyses statistiques des quantifications sur images:

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées sur GraphPad Prism 8 (GraphPad Softwares). Les tests de normalité ont été effectués avec le test de Shapiro-Wilk. L'homoscedasticité a été testée avec le test de Barlett. Les données paramétriques avec le même écart-type ont été analysées par t-test, en one-way ANOVA ou two-way ANOVA, suivi par une comparaison des multiples échantillons avec l'analyse post hoc Tukey. Les données paramétriques avec un écart-type significativement différent ont été analysées par ANOVA de Welch, suivi d'une comparaison des multiples échantillons par l'analyse post hoc de Dunett. Les données non-paramétriques ont été traitées avec l'analyse de la variance en one-way pour chaque rang, suivi d'une comparaison des multiples échantillons par analyse post hoc de Dunn. Les valeurs de $P < 0.05$ sont considérées comme statistiquement significatives. *$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$, ****$p<0.0001$. ns: non significatif. Les données sont présentées comme moyenne ± SEM (erreur standard de la moyenne).

ANNEXE

eLIFE elifesciences.org

INSIGHT

CEREBELLUM

Sensing how to balance

How does the inner ear communicate with the cerebellar cortex to maintain balance and posture?

FABRICE ANGO AND RAPHAËL DOS REIS

Related research article Balmer TS, Trussell LO. 2019. Selective targeting of unipolar brush cell subtypes by cerebellar mossy fibers. *eLife* **8**:e44964. DOI: 10.7554/eLife.44964

Keeping your head upright may seem like a trivial task, but the neural circuitry required to perform this task is rather complex and not fully understood. This circuitry starts with the vestibular system: a sensory system in the inner ear that relies on hair cells to detect movements, and to provide our sense of balance and spatial awareness. The vestibular system contains five organs that are sensitive to different types of movement. The sacculus and the utricle detect gravity and linear movements, respectively, and there are three semi-circular canals that detect rotation. Information about these movements is sent from the vestibular system to the cerebellum, which co-ordinates the motor movements needed to maintain posture and balance (***Ito, 2006***).

The hair cells in the vestibular system contact VG (vestibular ganglion) neurons, which then send sensory information along nerve cells called mossy fibers to the vestibular region of the cerebellum (***Dow, 1936***). The fibers that send signals directly to the cerebellum are called primary afferents, and the fibers that send signals indirectly via the brainstem nuclei (which also receive information from other sensory systems) are called secondary afferents (***Maklad and Fritzsch, 2003***; see ***Figure 1***).

Both the primary and secondary afferents form synapses with neurons called granule cells in the cerebellum: granule cells are the most numerous excitatory neurons in the brain (***Chadderton et al., 2004***). A single mossy fiber can activate hundreds of granule cells which, in turn, form synapses with the dendrites of Purkinje cells. These cells are the sole output neurons from the cerebellar cortex and they have a crucial role in motor learning.

However, this is not the full story because the vestibular region of the cerebellum also contains a high proportion of excitatory neurons called unipolar brush cells (UBCs). These cells, which receive input from just a single mossy fiber, form synapses with the granule cells (***Mugnaini et al., 2011***). UBCs essentially create an intermediate step in the circuitry, where signals sent between mossy fibers and granule cells can be modified. How the signal is modified depends on the type of UBC involved: ON UBCs will have an amplified response, whereas OFF UBCs will have a dampened response (***Borges-Merjane and Trussell, 2015***). However, there is much about the pathways connecting the vestibular system and cerebellum that is not fully understood: for instance, how is information from the vestibular system processed once it reaches the cerebellum? Now, in eLife, Timothy Balmer and Laurence Trussell of Oregon Health and Science University report the results from experiments on genetically-modified mice that will help to answer such questions (***Balmer and Trussell, 2019***).

The two researchers used a combination of transgenic mice and retrograde-infecting viruses to map the morphology of the VG neurons. These experiments showed that the primary afferents largely originated at the three semi-

© Copyright Ango and Dos Reis. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

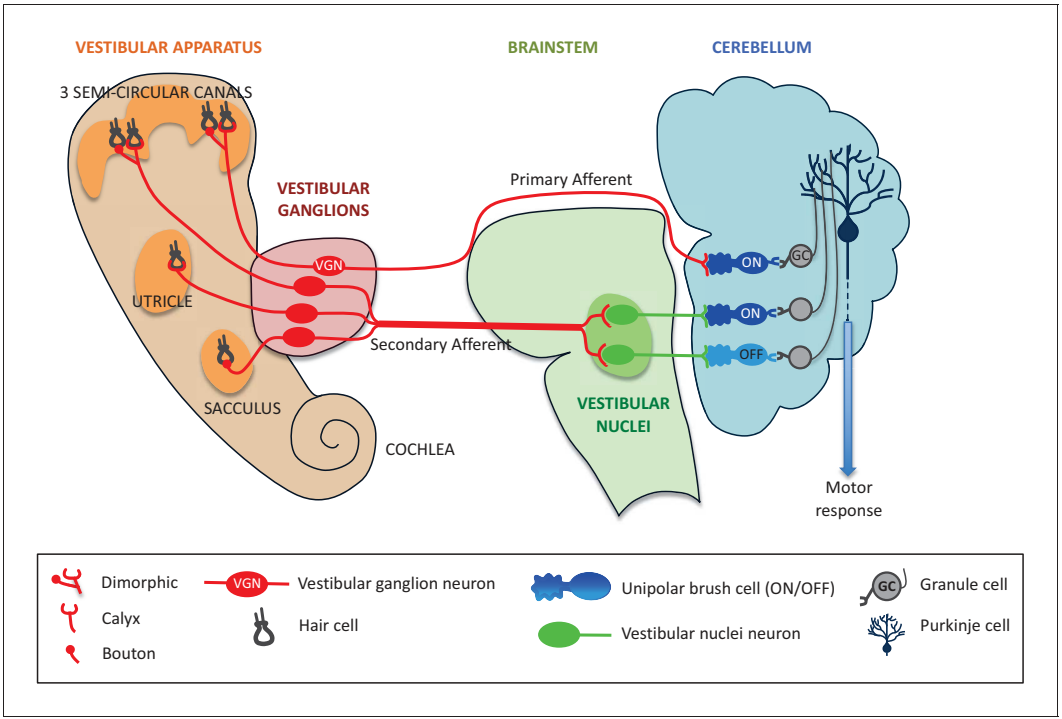


Figure 1. Primary and secondary afferents from the vestibular system to the cerebellum. Neurons from the hair cells (black) within the five organs of the vestibular system (left) form different types of synapses – dimorphic, calyx or bouton – with vestibular ganglion (VG) neurons (red). Mossy fibers (also in red) can project directly from the VG neurons to the cerebellum (in which case they are called primary afferents), or indirectly via vestibular nuclei within the brainstem (secondary afferents). The primary afferents (red) form synapses with a type of unipolar brush cell (UBC) called an ON UBC, whereas secondary afferents form synapses with both ON UBCs (dark blue) and OFF UBCs (light blue). UBCs form synapses with granule cells (grey), which in turn make contact with Purkinje cells (dark blue), which convey motor responses to the rest of the body.

circular canals of the vestibular system, and that the dendrites of the VG neurons mostly had a dimorphic morphology (see ***Figure 1***). These results, combined with our current knowledge of the sensory organs of the vestibular system, led Balmer and Trussell to conclude that the primary afferents are responsible for sensing rotational movements of the head (***Fernández et al., 1988***).

An optogenetic approach was then employed to assess which neurons in the cerebellum were targeted by these dimorphic VG neurons. Using light to stimulate light-sensitive ion channels in VG neurons led to electric impulses being observed in UBCs in the cerebellum. The characteristics of this response were distinctive of ON UBCs, and a response could not be detected from the OFF UBCs. This finding was further bolstered by immunohistochemical staining, which showed primary afferent synapses projecting solely onto the ON UBC subtype. These data suggest that direct projections of VG neurons solely target ON UBCs, but not OFF UBCs.

Finally, Balmer and Trussell investigated the differences between the direct and the indirect pathways by expressing a light-sensitive channel in the vestibular region of the brainstem. In contrast with primary afferents, secondary afferents targeted both ON and OFF UBCs to a similar degree (see ***Figure 1***).

The complexity of the circuitry revealed by Balmer and Trussell seems suited to the delicate task of balancing one's head, but a number of questions remain. In particular, how and where do the primary and secondary afferent pathways converge to trigger the relevant responses? An interesting follow up to this study would be to compare the role played by UBCs in maintaining balance and posture with their role in processing the other types of sensory inputs that are sent to the cerebellum.

Fabrice Ango is in the Department of Neuroscience, Institut de Génomique Fonctionnelle, Université de Montpellier, CNRS and INSERM, Montpellier, France

fabrice.ango@igf.cnrs.fr
http://orcid.org/0000-0002-5548-209X

Raphaël Dos Reis is in the Department of Neuroscience, Institut de Génomique Fonctionnelle, Université de Montpellier, CNRS and INSERM, Montpellier, France
http://orcid.org/0000-0003-2432-669X

Competing interests: The authors declare that no competing interests exist.

Published 17 April 2019

References

Balmer TS, Trussell LO. 2019. Selective targeting of unipolar brush cell subtypes by cerebellar mossy fibers. *eLife* **8**:e44964. DOI: https://doi.org/10.7554/eLife.44964

Borges-Merjane C, Trussell LO. 2015. ON and OFF unipolar brush cells transform multisensory inputs to the auditory system. *Neuron* **85**:1029–1042. DOI: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.02.009, PMID: 25741727

Chadderton P, Margrie TW, Häusser M. 2004. Integration of quanta in cerebellar granule cells during sensory processing. *Nature* **428**:856–860. DOI: https://doi.org/10.1038/nature02442, PMID: 15103377

Dow RS. 1936. The fiber connections of the posterior parts of the cerebellum in the rat and cat. *The Journal of Comparative Neurology* **63**:527–548. DOI: https://doi.org/10.1002/cne.900630308

Fernández C, Baird RA, Goldberg JM. 1988. The vestibular nerve of the chinchilla. I. peripheral innervation patterns in the horizontal and superior semicircular canals. *Journal of Neurophysiology* **60**:167–181. DOI: https://doi.org/10.1152/jn.1988.60.1.167, PMID: 3404215

Ito M. 2006. Cerebellar circuitry as a neuronal machine. *Progress in Neurobiology* **78**:272–303. DOI: https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.02.006, PMID: 16759785

Maklad A, Fritzsch B. 2003. Development of vestibular afferent projections into the hindbrain and their central targets. *Brain Research Bulletin* **60**:497–510. DOI: https://doi.org/10.1016/S0361-9230(03)00054-6, PMID: 12787869

Mugnaini E, Sekerková G, Martina M. 2011. The unipolar brush cell: a remarkable neuron finally receiving deserved attention. *Brain Research Reviews* **66**:220–245. DOI: https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2010.10.001, PMID: 20937306

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- A -

Ackermann, Frauke, Clarissa L Waites, et Craig C Garner. « Presynaptic active zones in invertebrates and vertebrates ». *EMBO reports* 16, nº 8 (1 août 2015): 923-38. https://doi.org/10.15252/embr.201540434.

Ali, Heba, Lena Marth, et Dilja Krueger-Burg. « Neuroligin-2 as a Central Organizer of Inhibitory Synapses in Health and Disease ». *Science Signaling* 13, nº 663 (22 décembre 2020). https://doi.org/10.1126/scisignal.abd8379.

Allison, D. W., A. S. Chervin, V. I. Gelfand, et A. M. Craig. « Postsynaptic Scaffolds of Excitatory and Inhibitory Synapses in Hippocampal Neurons: Maintenance of Core Components Independent of Actin Filaments and Microtubules ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 20, nº 12 (15 juin 2000): 4545-54.

Alvarez, Francisco J. « Gephyrin and the Regulation of Synaptic Strength and Dynamics at Glycinergic Inhibitory Synapses ». *Brain Research Bulletin* 129 (mars 2017): 50-65. https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.09.003.

Anggono, Victor, Roger L. Clem, et Richard L. Huganir. « PICK1 Loss of Function Occludes Homeostatic Synaptic Scaling ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 31, nº 6 (9 février 2011): 2188-96. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5633-10.2011.

Ango, Fabrice, Graziella di Cristo, Hiroyuki Higashiyama, Vann Bennett, Priscilla Wu, et Z. Josh Huang. « Ankyrin-Based Subcellular Gradient of Neurofascin, an Immunoglobulin Family Protein, Directs GABAergic Innervation at Purkinje Axon Initial Segment ». *Cell* 119, nº 2 (15 octobre 2004): 257-72. https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.10.004.

Aoki, C., I. Miko, H. Oviedo, T. Mikeladze-Dvali, L. Alexandre, N. Sweeney, et D. S. Bredt. « Electron Microscopic Immunocytochemical Detection of PSD-95, PSD-93, SAP-102, and SAP-97 at Postsynaptic, Presynaptic, and Nonsynaptic Sites of Adult and Neonatal Rat Visual Cortex ». *Synapse (New York, N.Y.)* 40, nº 4 (15 juin 2001): 239-57. https://doi.org/10.1002/syn.1047.

Aoto, Jason, David C. Martinelli, Robert C. Malenka, Katsuhiko Tabuchi, et Thomas C. Südhof. « Presynaptic Neurexin-3 Alternative Splicing Trans-Synaptically Controls Postsynaptic AMPA-Receptor Trafficking ». *Cell* 154, nº 1 (3 juillet 2013): 75-88. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.060.

- B -

Balla, Tamas. « Phosphoinositides: Tiny Lipids with Giant Impact on Cell Regulation ». *Physiological Reviews* 93, nº 3 (juillet 2013): 1019-1137. https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2012.

Battaglia, Sereina, Marianne Renner, Marion Russeau, Etienne Côme, Shiva K. Tyagarajan, et Sabine Lévi. « Activity-Dependent Inhibitory Synapse Scaling Is Determined by Gephyrin Phosphorylation and Subsequent Regulation of GABAA Receptor Diffusion ». *ENeuro* 5, nº 1 (février 2018). https://doi.org/10.1523/ENEURO.0203-17.2017.

Baumann, Sabine W., Roland Baur, et Erwin Sigel. « Forced Subunit Assembly in Alpha1beta2gamma2 GABAA Receptors. Insight into the Absolute Arrangement ». *The Journal of Biological Chemistry* 277, nº 48 (29 novembre 2002): 46020-25. https://doi.org/10.1074/jbc.M207663200.

Baur, Roland, Kuldeep H. Kaur, et Erwin Sigel. « Structure of Alpha6 Beta3 Delta GABA(A) Receptors and Their Lack of Ethanol Sensitivity ». *Journal of Neurochemistry* 111, nº 5 (décembre 2009): 1172-81. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06387.x.

Baur, Roland, Frédéric Minier, et Erwin Sigel. « A GABA(A) Receptor of Defined Subunit Composition and Positioning: Concatenation of Five Subunits ». *FEBS Letters* 580, nº 6 (6 mars 2006): 1616-20. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.02.002.

Bausen, Melanie, Jens C. Fuhrmann, Heinrich Betz, et Gregory A. O'sullivan. « The State of the Actin Cytoskeleton Determines Its Association with Gephyrin: Role of Ena/VASP Family Members ». *Molecular and Cellular Neurosciences* 31, nº 2 (février 2006): 376-86. https://doi.org/10.1016/j.mcn.2005.11.004.

Bausen, Melanie, Felix Weltzien, Heinrich Betz, et Gregory A. O'Sullivan. « Regulation of Postsynaptic Gephyrin Cluster Size by Protein Phosphatase 1 ». *Molecular and Cellular Neurosciences* 44, nº 3 (juillet 2010): 201-9. https://doi.org/10.1016/j.mcn.2010.02.007.

Becker, Esther B. E., et Catherine J. Stoodley. « Autism Spectrum Disorder and the Cerebellum ». *International Review of Neurobiology* 113 (2013): 1-34. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418700-9.00001-0.

Bedet, Cécile, Jo C. Bruusgaard, Sandra Vergo, Line Groth-Pedersen, Stefan Eimer, Antoine Triller, et Christian Vannier. « Regulation of Gephyrin Assembly and Glycine Receptor Synaptic Stability ». *The Journal of Biological Chemistry* 281, nº 40 (6 octobre 2006): 30046-56. https://doi.org/10.1074/jbc.M602155200.

Benson, D. L., Y. Yoshihara, et K. Mori. « Polarized Distribution and Cell Type-Specific Localization of Telencephalin, an Intercellular Adhesion Molecule ». *Journal of Neuroscience Research* 52, nº 1 (1 avril 1998): 43-53. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19980401)52:1<43::AID-JNR5>3.0.CO;2-K.

Betz, Heinrich, et Bodo Laube. « Glycine Receptors: Recent Insights into Their Structural Organization and Functional Diversity ». *Journal of Neurochemistry* 97, nº 6 (juin 2006): 1600-1610. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03908.x.

Biederer, Thomas, Yildirim Sara, Marina Mozhayeva, Deniz Atasoy, Xinran Liu, Ege T. Kavalali, et Thomas C. Südhof. « SynCAM, a Synaptic Adhesion Molecule That Drives Synapse Assembly ». *Science (New York, N.Y.)* 297, nº 5586 (30 août 2002): 1525-31. https://doi.org/10.1126/science.1072356.

Biederer, Thomas, et Thomas C. Südhof. « CASK and Protein 4.1 Support F-Actin Nucleation on Neurexins * ». *Journal of Biological Chemistry* 276, nº 51 (21 décembre 2001): 47869-76. https://doi.org/10.1074/jbc.M105287200.

Billups, Brian, et Ian D. Forsythe. « Presynaptic Mitochondrial Calcium Sequestration Influences Transmission at Mammalian Central Synapses ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 22, nº 14 (15 juillet 2002): 5840-47. https://doi.org/20026597.

Boeckers, T. M., M. R. Kreutz, C. Winter, W. Zuschratter, K. H. Smalla, L. Sanmarti-Vila, H. Wex, et al. « Proline-Rich Synapse-Associated Protein-1/Cortactin Binding Protein 1 (ProSAP1/CortBP1) Is a PDZ-Domain Protein Highly Enriched in the Postsynaptic Density ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 19, nº 15 (1 août 1999): 6506-18.

Boivin, Josiah R., et Elly Nedivi. « Functional implications of inhibitory synapse placement on signal processing in pyramidal neuron dendrites ». *Current opinion in neurobiology* 51 (août 2018): 16-22. https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.01.013.

Bollan, Karen A., Roland Baur, Tim G. Hales, Erwin Sigel, et Christopher N. Connolly. « The Promiscuous Role of the Epsilon Subunit in GABAA Receptor Biogenesis ». *Molecular and Cellular Neurosciences* 37, nº 3 (mars 2008): 610-21. https://doi.org/10.1016/j.mcn.2007.12.011.

Booker, Sam A., et Imre Vida. « Morphological Diversity and Connectivity of Hippocampal Interneurons ». *Cell and Tissue Research* 373, nº 3 (1 septembre 2018): 619-41. https://doi.org/10.1007/s00441-018-2882-2.

Bouzioukh, Farima, George A. Wilkinson, Giselind Adelmann, Michael Frotscher, Valentin Stein, et Rüdiger Klein. « Tyrosine Phosphorylation Sites in EphrinB2 Are Required for Hippocampal Long-Term Potentiation But Not Long-Term Depression ». *Journal of Neuroscience* 27, nº 42 (17 octobre 2007): 11279-88. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3393-07.2007.

Bozdagi, Ozlem, Takeshi Sakurai, Danae Papapetrou, Xiaobin Wang, Dara L. Dickstein, Nagahide Takahashi, Yuji Kajiwara, et al. « Haploinsufficiency of the Autism-Associated Shank3 Gene Leads to Deficits in Synaptic Function, Social Interaction, and Social Communication ». *Molecular Autism* 1, nº 1 (17 décembre 2010): 15. https://doi.org/10.1186/2040-2392-1-15.

Brady, Roscoe O., Irene Gonsalvez, Ivy Lee, Dost Öngür, Larry J. Seidman, Jeremy D. Schmahmann, Shaun M. Eack, Matcheri S. Keshavan, Alvaro Pascual-Leone, et Mark A. Halko. « Cerebellar-Prefrontal Network Connectivity and Negative Symptoms in Schizophrenia ». *The American Journal of Psychiatry* 176, nº 7 (1 juillet 2019): 512-20. https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2018.18040429.

Bresler, Tal, Yaron Ramati, Pedro L. Zamorano, Rong Zhai, Craig C. Garner, et Noam E. Ziv. « The Dynamics of SAP90/PSD-95 Recruitment to New Synaptic Junctions ». *Molecular and Cellular Neuroscience* 18, nº 2 (août 2001): 149-67. https://doi.org/10.1006/mcne.2001.1012.

Brückner, K., J. Pablo Labrador, P. Scheiffele, A. Herb, P. H. Seeburg, et R. Klein. « EphrinB Ligands Recruit GRIP Family PDZ Adaptor Proteins into Raft Membrane Microdomains ». *Neuron* 22, nº 3 (mars 1999): 511-24. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80706-0.

Brunger, A. T. « Structural Insights into the Molecular Mechanism of Ca(2+)-Dependent Exocytosis ». *Current Opinion in Neurobiology* 10, nº 3 (juin 2000): 293-302. https://doi.org/10.1016/s0959-4388(00)00098-2.

Brunton, Laurence, Bruce Chabner, Louis Goodman, et Bjorn Knollmann. *Goodman & Gilman'S The Pharmacological Basis Of Therapeutics*. Vol. 1, 2011.

Budnik, V., Y. H. Koh, B. Guan, B. Hartmann, C. Hough, D. Woods, et M. Gorczyca. « Regulation of Synapse Structure and Function by the Drosophila Tumor Suppressor Gene Dlg ». *Neuron* 17, nº 4 (octobre 1996): 627-40. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80196-8.

Buhl, E. H., K. Halasy, et P. Somogyi. « Diverse Sources of Hippocampal Unitary Inhibitory Postsynaptic Potentials and the Number of Synaptic Release Sites ». *Nature* 368, nº 6474 (28 avril 1994): 823-28. https://doi.org/10.1038/368823a0.

Buhl, Eberhard H., Katalin Halasy, et Peter Somogyi. « Diverse Sources of Hippocampal Unitary Inhibitory Postsynaptic Potentials and the Number of Synaptic Release Sites ». *Nature* 368, nº 6474 (avril 1994): 823-28. https://doi.org/10.1038/368823a0.

Bukalo, Olena, et Alexander Dityatev. « Synaptic Cell Adhesion Molecules ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 970 (2012): 97-128. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0932-8_5.

Burzomato, Valeria, Paul J. Groot-Kormelink, Lucia G. Sivilotti, et Marco Beato. « Stoichiometry of Recombinant Heteromeric Glycine Receptors Revealed by a Pore-Lining Region Point Mutation ». *Receptors & Channels* 9, nº 6 (2003): 353-61. https://doi.org/10.3109/714041016.

- C -

C, Müller, et Remy S. « Dendritic Inhibition Mediated by O-LM and Bistratified Interneurons in the Hippocampus. » *Frontiers in Synaptic Neuroscience* 6 (30 septembre 2014): 23-23. https://doi.org/10.3389/fnsyn.2014.00023.

Cadilhac, Christelle, Isabelle Bachy, Antoine Forget, David J. Hodson, Céline Jahannault-Talignani, Andrew J. Furley, Olivier Ayrault, Patrice Mollard, Constantino Sotelo, et Fabrice Ango. « Excitatory Granule Neuron Precursors Orchestrate Laminar Localization and Differentiation of Cerebellar Inhibitory Interneuron Subtypes ». Cell Reports 34, nº 13 (30 mars 2021): 108904. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108904.

Camp, Aaron James, et Rajiv Wijesinghe. « Calretinin: Modulator of Neuronal Excitability ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41, nº 11 (novembre 2009): 2118-21. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.05.007.

Cancedda, Laura, Hubert Fiumelli, Karen Chen, et Mu-ming Poo. « Excitatory GABA Action Is Essential for Morphological Maturation of Cortical Neurons in Vivo ». *The Journal of*

Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience 27, nº 19 (9 mai 2007): 5224-35. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5169-06.2007.

Chamberland, Simon, Charleen Salesse, Dimitry Topolnik, et Lisa Topolnik. « Synapse-Specific Inhibitory Control of Hippocampal Feedback Inhibitory Circuit ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 4 (2010): 130. https://doi.org/10.3389/fncel.2010.00130.

Chattopadhyaya, Bidisha, et Graziella Di Cristo. « GABAergic Circuit Dysfunctions in Neurodevelopmental Disorders ». *Frontiers in Psychiatry* 3 (2012): 51. https://doi.org/10.3389/fpsyt.2012.00051.

Chen, Chia-Chien, Ju Lu, et Yi Zuo. « Spatiotemporal dynamics of dendritic spines in the living brain ». *Frontiers in Neuroanatomy* 8 (9 mai 2014). https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00028.

Chen, Jerry L., Katherine L. Villa, Jae Won Cha, Peter T. C. So, Yoshiyuki Kubota, et Elly Nedivi. « Clustered Dynamics of Inhibitory Synapses and Dendritic Spines in the Adult Neocortex ». *Neuron* 74, nº 2 (26 avril 2012): 361-73. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.030.

Chen, Zi-Wei, et Richard W. Olsen. « GABAA Receptor Associated Proteins: A Key Factor Regulating GABAA Receptor Function ». *Journal of Neurochemistry* 100, nº 2 (janvier 2007): 279-94. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04206.x.

Chia, Poh Hui, Pengpeng Li, et Kang Shen. « Cell Biology in Neuroscience: Cellular and Molecular Mechanisms Underlying Presynapse Formation ». *The Journal of Cell Biology* 203, nº 1 (14 octobre 2013): 11-22. https://doi.org/10.1083/jcb.201307020.

Chih, Ben, Holly Engelman, et Peter Scheiffele. « Control of Excitatory and Inhibitory Synapse Formation by Neuroligins ». *Science (New York, N.Y.)* 307, nº 5713 (25 février 2005): 1324-28. https://doi.org/10.1126/science.1107470.

Chiou, Tzu-Ting, Bevan Bonhomme, Hongbing Jin, Celia P. Miralles, Haiyan Xiao, Zhanyan Fu, Robert J. Harvey, Kirsten Harvey, Stefano Vicini, et Angel L. De Blas. « Differential Regulation of the Postsynaptic Clustering of γ-Aminobutyric Acid Type A (GABAA) Receptors by Collybistin Isoforms ». *The Journal of Biological Chemistry* 286, nº 25 (24 juin 2011): 22456-68. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.236190.

Chiou, Tzu-Ting, Philip Long, Alexandra Schumann-Gillett, Venkateswarlu Kanamarlapudi, Stefan A. Haas, Kirsten Harvey, Megan L. O'Mara, Angel L. De Blas, Vera M. Kalscheuer, et Robert J. Harvey. « Mutation p.R356Q in the Collybistin Phosphoinositide Binding Site Is Associated With Mild Intellectual Disability ». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 12 (2019): 60. https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00060.

Choii, Gayoung, et Jaewon Ko. « Gephyrin: A Central GABAergic Synapse Organizer ». *Experimental & Molecular Medicine* 47, nº 4 (avril 2015): e158-e158. https://doi.org/10.1038/emm.2015.5.

Chomczynski, Piotr, et Nicoletta Sacchi. « The Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction: Twenty-Something Years On ». *Nature Protocols* 1, nº 2 (2006): 581-85. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.83.

Choquet, Daniel, et Antoine Triller. « The Dynamic Synapse ». *Neuron* 80, nº 3 (30 octobre 2013): 691-703. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.013.

Chuang, Shu-Hui, et Doodipala Samba Reddy. « Genetic and Molecular Regulation of Extrasynaptic GABA-A Receptors in the Brain: Therapeutic Insights for Epilepsy ». *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 364, nº 2 (1 février 2018): 180-97. https://doi.org/10.1124/jpet.117.244673.

Chubykin, Alexander A., Deniz Atasoy, Mark R. Etherton, Nils Brose, Ege T. Kavalali, Jay R. Gibson, et Thomas C. Südhof. « Activity-Dependent Validation of Excitatory versus Inhibitory Synapses by Neuroligin-1 versus Neuroligin-2 ». *Neuron* 54, nº 6 (21 juin 2007): 919-31. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.05.029.

Cobos, Inma, Maria Elisa Calcagnotto, Alex J. Vilaythong, Myo T. Thwin, Jeffrey L. Noebels, Scott C. Baraban, et John L. R. Rubenstein. « Mice Lacking Dlx1 Show Subtype-Specific Loss of Interneurons, Reduced Inhibition and Epilepsy ». *Nature Neuroscience* 8, nº 8 (août 2005): 1059-68. https://doi.org/10.1038/nn1499.

Conroy, William G., Zhaoping Liu, Qiang Nai, Jay S. Coggan, et Darwin K. Berg. « PDZ-Containing Proteins Provide a Functional Postsynaptic Scaffold for Nicotinic Receptors in Neurons ». *Neuron* 38, nº 5 (5 juin 2003): 759-71. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00324-6.

Corringer, P. J., N. Le Novère, et J. P. Changeux. « Nicotinic Receptors at the Amino Acid Level ». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 40 (2000): 431-58. https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.40.1.431.

Craig, Ann Marie, Gary Banker, Weiru Chang, Maureen E. McGrath, et Anna S. Serpinskaya. « Clustering of Gephyrin at GABAergic but Not Glutamatergic Synapses in Cultured Rat Hippocampal Neurons ». The Journal of Neuroscience 16, nº 10 (15 mai 1996): 3166-77. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-10-03166.1996.

Craven, S. E., et D. S. Bredt. « PDZ Proteins Organize Synaptic Signaling Pathways ». *Cell* 93, nº 4 (15 mai 1998): 495-98. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81179-4.

- D -

D'Angelo, Egidio. « Physiology of the Cerebellum ». *Handbook of Clinical Neurology* 154 (2018): 85-108. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63956-1.00006-0.

Davies, J E. « The pharmacological basis of therapeutics ». *Occupational and Environmental Medicine* 64, nº 8 (août 2007): e2. https://doi.org/10.1136/oem.2007.033902.

De Marco García, Natalia V., Theofanis Karayannis, et Gord Fishell. « Neuronal Activity Is Required for the Development of Specific Cortical Interneuron Subtypes ». *Nature* 472, nº 7343 (21 avril 2011): 351-55. https://doi.org/10.1038/nature09865.

Dean, Camin, Francisco G. Scholl, Jenny Choih, Shannon DeMaria, James Berger, Ehud Isacoff, et Peter Scheiffele. « Neurexin Mediates the Assembly of Presynaptic Terminals ». *Nature Neuroscience* 6, nº 7 (juillet 2003): 708-16. https://doi.org/10.1038/nn1074.

DeFelipe, J., et I. Fariñas. « The Pyramidal Neuron of the Cerebral Cortex: Morphological and Chemical Characteristics of the Synaptic Inputs ». *Progress in Neurobiology* 39, nº 6 (décembre 1992): 563-607. https://doi.org/10.1016/0301-0082(92)90015-7.

DeFelipe, Javier, Pedro L. López-Cruz, Ruth Benavides-Piccione, Concha Bielza, Pedro Larrañaga, Stewart Anderson, Andreas Burkhalter, et al. « New Insights into the Classification and Nomenclature of Cortical GABAergic Interneurons ». *Nature Reviews Neuroscience* 14, nº 3 (mars 2013): 202-16. https://doi.org/10.1038/nrn3444.

Dejanovic, Borislav, Dennis Lal, Claudia B. Catarino, Sita Arjune, Abdel A. Belaidi, Holger Trucks, Christian Vollmar, et al. « Exonic Microdeletions of the Gephyrin Gene Impair GABAergic Synaptic Inhibition in Patients with Idiopathic Generalized Epilepsy ». *Neurobiology of Disease* 67 (juillet 2014): 88-96. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.02.001.

Dejanovic, Borislav, Marcus Semtner, Silvia Ebert, Tobias Lamkemeyer, Franziska Neuser, Bernhard Lüscher, Jochen C. Meier, et Guenter Schwarz. « Palmitoylation of Gephyrin Controls Receptor Clustering and Plasticity of GABAergic Synapses ». *PLoS Biology* 12, nº 7 (juillet 2014): e1001908. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001908.

Dev, K. K., A. Nishimune, J. M. Henley, et S. Nakanishi. « The Protein Kinase C Alpha Binding Protein PICK1 Interacts with Short but Not Long Form Alternative Splice Variants of AMPA Receptor Subunits ». *Neuropharmacology* 38, nº 5 (mai 1999): 635-44. https://doi.org/10.1016/s0028-3908(98)00230-5.

Dobin, Alexander, Carrie A. Davis, Felix Schlesinger, Jorg Drenkow, Chris Zaleski, Sonali Jha, Philippe Batut, Mark Chaisson, et Thomas R. Gingeras. « STAR: Ultrafast Universal RNA-Seq Aligner ». *Bioinformatics (Oxford, England)* 29, nº 1 (1 janvier 2013): 15-21. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635.

Dong, H., R. J. O'Brien, E. T. Fung, A. A. Lanahan, P. F. Worley, et R. L. Huganir. « GRIP: A Synaptic PDZ Domain-Containing Protein That Interacts with AMPA Receptors ». *Nature* 386, nº 6622 (20 mars 1997): 279-84. https://doi.org/10.1038/386279a0.

Dong, H., P. Zhang, I. Song, R. S. Petralia, D. Liao, et R. L. Huganir. « Characterization of the Glutamate Receptor-Interacting Proteins GRIP1 and GRIP2 ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 19, nº 16 (15 août 1999): 6930-41.

Du, Y., S. A. Weed, W. C. Xiong, T. D. Marshall, et J. T. Parsons. « Identification of a Novel Cortactin SH3 Domain-Binding Protein and Its Localization to Growth Cones of Cultured Neurons ». *Molecular and Cellular Biology* 18, nº 10 (octobre 1998): 5838-51. https://doi.org/10.1128/MCB.18.10.5838.

Duchen, Michael R. « Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death ». *The Journal of Physiology* 529, nº Pt 1 (15 novembre 2000): 57-68. https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00057.x.

Dutertre, Sébastien, Cord-Michael Becker, et Heinrich Betz. « Inhibitory Glycine Receptors: An Update ». *The Journal of Biological Chemistry* 287, nº 48 (23 novembre 2012): 40216-23. https://doi.org/10.1074/jbc.R112.408229.

- E -

Eberth, Alexander, Richard Lundmark, Lothar Gremer, Radovan Dvorsky, Katja T. Koessmeier, Harvey T. McMahon, et Mohammad Reza Ahmadian. « A BAR Domain-Mediated Autoinhibitory Mechanism for RhoGAPs of the GRAF Family ». *The Biochemical Journal* 417, nº 1 (1 janvier 2009): 371-77. https://doi.org/10.1042/BJ20081535.

El-Husseini, Alaa El-Din, Eric Schnell, Srikanth Dakoji, Neal Sweeney, Qiang Zhou, Oliver Prange, Catherine Gauthier-Campbell, Andrea Aguilera-Moreno, Roger A. Nicoll, et David S. Bredt. « Synaptic Strength Regulated by Palmitate Cycling on PSD-95 ». *Cell* 108, nº 6 (22 mars 2002): 849-63. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00683-9.

Elias, Guillermo M., et Roger A. Nicoll. « Synaptic Trafficking of Glutamate Receptors by MAGUK Scaffolding Proteins ». *Trends in Cell Biology* 17, nº 7 (juillet 2007): 343-52. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.07.005.

Erecińska, M., et I. A. Silver. « Metabolism and Role of Glutamate in Mammalian Brain ». *Progress in Neurobiology* 35, nº 4 (1990): 245-96. https://doi.org/10.1016/0301-0082(90)90013-7.

Essrich, C., M. Lorez, J. A. Benson, J. M. Fritschy, et B. Lüscher. « Postsynaptic Clustering of Major GABAA Receptor Subtypes Requires the Gamma 2 Subunit and Gephyrin ». *Nature Neuroscience* 1, nº 7 (novembre 1998): 563-71. https://doi.org/10.1038/2798.

- F -

Fagni, Laurent, Paul F. Worley, et Fabrice Ango. « Homer as Both a Scaffold and Transduction Molecule ». *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment* 2002, nº 137 (18 juin 2002): re8. https://doi.org/10.1126/stke.2002.137.re8.

Favuzzi, Emilia, Rubén Deogracias, André Marques-Smith, Patricia Maeso, Julie Jezequel, David Exposito-Alonso, Maddalena Balia, et al. « Distinct Molecular Programs Regulate Synapse Specificity in Cortical Inhibitory Circuits ». *Science (New York, N.Y.)* 363, nº 6425 (25 janvier 2019): 413-17. https://doi.org/10.1126/science.aau8977.

Feng, G., H. Tintrup, J. Kirsch, M. C. Nichol, J. Kuhse, H. Betz, et J. R. Sanes. « Dual Requirement for Gephyrin in Glycine Receptor Clustering and Molybdoenzyme Activity ». *Science (New York, N.Y.)* 282, nº 5392 (13 novembre 1998): 1321-24. https://doi.org/10.1126/science.282.5392.1321.

Feng, Wei, et Mingjie Zhang. « Organization and Dynamics of PDZ-Domain-Related Supramodules in the Postsynaptic Density ». *Nature Reviews Neuroscience* 10, nº 2 (février 2009): 87-99. https://doi.org/10.1038/nrn2540.

Fields, Alexander P., Edwin H. Rodriguez, Marko Jovanovic, Noam Stern-Ginossar, Brian J. Haas, Philipp Mertins, Raktima Raychowdhury, et al. « A Regression-Based Analysis of Ribosome-Profiling Data Reveals a Conserved Complexity to Mammalian Translation ». *Molecular Cell* 60, nº 5 (3 décembre 2015): 816-27. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.11.013.

Fine, Edward J., Catalina C. Ionita, et Linda Lohr. « The History of the Development of the Cerebellar Examination ». *Seminars in Neurology* 22, nº 4 (décembre 2002): 375-84. https://doi.org/10.1055/s-2002-36759.

Flores, Carmen E., Irina Nikonenko, Pablo Mendez, Jean-Marc Fritschy, Shiva K. Tyagarajan, et Dominique Muller. « Activity-Dependent Inhibitory Synapse Remodeling through Gephyrin Phosphorylation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, nº 1 (6 janvier 2015): E65-72. https://doi.org/10.1073/pnas.1411170112.

Fogel, Adam I., Michael R. Akins, Alexander J. Krupp, Massimiliano Stagi, Valentin Stein, et Thomas Biederer. « SynCAMs Organize Synapses through Heterophilic Adhesion ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27, nº 46 (14 novembre 2007): 12516-30. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2739-07.2007.

Förstera, Benjamin, Abdel Ali Belaidi, René Jüttner, Carola Bernert, Michael Tsokos, Thomas-N. Lehmann, Peter Horn, Christoph Dehnicke, Günter Schwarz, et Jochen C. Meier. « Irregular RNA Splicing Curtails Postsynaptic Gephyrin in the Cornu Ammonis of Patients with Epilepsy ». *Brain: A Journal of Neurology* 133, nº Pt 12 (décembre 2010): 3778-94. https://doi.org/10.1093/brain/awq298.

Fu, Wing-Yu, Yu Chen, Mustafa Sahin, Xiao-Su Zhao, Lei Shi, Jay B. Bikoff, Kwok-On Lai, et al. « Cdk5 Regulates EphA4-Mediated Dendritic Spine Retraction through an Ephexin1-Dependent Mechanism ». *Nature Neuroscience* 10, nº 1 (janvier 2007): 67-76. https://doi.org/10.1038/nn1811.

Fu, Yu, Jason M. Tucciarone, J. Sebastian Espinosa, Nengyin Sheng, Daniel P. Darcy, Roger A. Nicoll, Z. Josh Huang, et Michael P. Stryker. « A Cortical Circuit for Gain Control by Behavioral State ». *Cell* 156, nº 6 (13 mars 2014): 1139-52. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.050.

Fuhrmann, Jens C., Stefan Kins, Philippe Rostaing, Oussama El Far, Joachim Kirsch, Morgan Sheng, Antoine Triller, Heinrich Betz, et Matthias Kneussel. « Gephyrin Interacts with Dynein Light Chains 1 and 2, Components of Motor Protein Complexes ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 22, nº 13 (1 juillet 2002): 5393-5402. https://doi.org/20026552.

Furlanis, Elisabetta, et Peter Scheiffele. « Regulation of Neuronal Differentiation, Function, and Plasticity by Alternative Splicing ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 34 (6 octobre 2018): 451-69. https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100617-062826.

Furlanis, Elisabetta, Lisa Traunmüller, Geoffrey Fucile, et Peter Scheiffele. « Landscape of Ribosome-Engaged Transcript Isoforms Reveals Extensive Neuronal-Cell-Class-Specific Alternative Splicing Programs ». *Nature Neuroscience* 22, nº 10 (octobre 2019): 1709-17. https://doi.org/10.1038/s41593-019-0465-5.

- G -

Galas, Ludovic, Magalie Bénard, Alexis Lebon, Yutaro Komuro, Damien Schapman, Hubert Vaudry, David Vaudry, et Hitoshi Komuro. « Postnatal Migration of Cerebellar Interneurons ». *Brain Sciences* 7, nº 6 (6 juin 2017). https://doi.org/10.3390/brainsci7060062.

Galiano, Mauricio R., Smita Jha, Tammy Szu-Yu Ho, Chuansheng Zhang, Yasuhiro Ogawa, Kae-Jiun Chang, Michael C. Stankewich, Peter J. Mohler, et Matthew N. Rasband. « A Distal Axonal Cytoskeleton Forms an Intra-Axonal Boundary That Controls Axon Initial Segment Assembly ». *Cell* 149, nº 5 (25 mai 2012): 1125-39. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.039.

Galliano, Elisa, Paolo Mazzarello, et Egidio D'Angelo. « Discovery and Rediscoveries of Golgi Cells ». *The Journal of Physiology* 588, nº Pt 19 (1 octobre 2010): 3639-55. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.189605.

Garner, C. C., J. Nash, et R. L. Huganir. « PDZ Domains in Synapse Assembly and Signalling ». *Trends in Cell Biology* 10, nº 7 (juillet 2000): 274-80. https://doi.org/10.1016/s0962-8924(00)01783-9.

Garner, Craig, Clarissa Waites, et Noam Ziv. « Synapse development: Still looking for the forest, still lost in the trees ». *Cell and tissue research* 326 (1 décembre 2006): 249-62. https://doi.org/10.1007/s00441-006-0278-1.

Ghosh, Himanish, Luca Auguadri, Sereina Battaglia, Zahra Simone Thirouin, Khaled Zemoura, Simon Messner, Mario A. Acuña, et al. « Several Posttranslational Modifications Act in Concert to Regulate Gephyrin Scaffolding and GABAergic Transmission ». *Nature Communications* 7 (7 novembre 2016): 13365. https://doi.org/10.1038/ncomms13365.

Giagtzoglou, Nikolaos, Cindy V. Ly, et Hugo J. Bellen. « Cell Adhesion, the Backbone of the Synapse: "Vertebrate" and "Invertebrate" Perspectives ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1, nº 4 (octobre 2009). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003079.

Goda, Yukiko, et Graeme W. Davis. « Mechanisms of Synapse Assembly and Disassembly ». *Neuron* 40, nº 2 (9 octobre 2003): 243-64. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00608-1.

Good, Matthew C., Jesse G. Zalatan, et Wendell A. Lim. « Scaffold Proteins: Hubs for Controlling the Flow of Cellular Information ». *Science (New York, N.Y.)* 332, nº 6030 (6 mai 2011): 680-86. https://doi.org/10.1126/science.1198701.

Goodwin, Patricia R., Jennifer M. Sasaki, et Peter Juo. « Cyclin-Dependent Kinase 5 Regulates the Polarized Trafficking of Neuropeptide-Containing Dense-Core Vesicles in Caenorhabditis Elegans Motor Neurons ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 32, nº 24 (13 juin 2012): 8158-72. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0251-12.2012.

Govek, Eve-Ellen, Sarah E. Newey, Colin J. Akerman, Justin R. Cross, Lieven Van der Veken, et Linda Van Aelst. « The X-Linked Mental Retardation Protein Oligophrenin-1 Is Required for Dendritic Spine Morphogenesis ». *Nature Neuroscience* 7, nº 4 (avril 2004): 364-72. https://doi.org/10.1038/nn1210.

Graf, Ethan R., Richard W. Daniels, Robert W. Burgess, Thomas L. Schwarz, et Aaron DiAntonio. « Rab3 Dynamically Controls Protein Composition at Active Zones ». *Neuron* 64, nº 5 (10 décembre 2009): 663-77. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.11.002.

Graf, Ethan R., XueZhao Zhang, Shan-Xue Jin, Michael W. Linhoff, et Ann Marie Craig. « Neurexins Induce Differentiation of GABA and Glutamate Postsynaptic Specializations via Neuroligins ». *Cell* 119, nº 7 (29 décembre 2004): 1013-26. https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.035.

Graham, D., F. Pfeiffer, et H. Betz. « Photoaffinity-Labelling of the Glycine Receptor of Rat Spinal Cord ». *European Journal of Biochemistry* 131, nº 3 (5 avril 1983): 519-25. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1983.tb07292.x.

Grenningloh, G., I. Pribilla, P. Prior, G. Multhaup, K. Beyreuther, O. Taleb, et H. Betz. « Cloning and Expression of the 58 Kd Beta Subunit of the Inhibitory Glycine Receptor ». *Neuron* 4, nº 6 (juin 1990): 963-70. https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90149-a.

Grenningloh, G., A. Rienitz, B. Schmitt, C. Methfessel, M. Zensen, K. Beyreuther, E. D. Gundelfinger, et H. Betz. « The Strychnine-Binding Subunit of the Glycine Receptor Shows Homology with Nicotinic Acetylcholine Receptors ». *Nature* 328, nº 6127 (16 juillet 1987): 215-20. https://doi.org/10.1038/328215a0.

Grenningloh, G., V. Schmieden, P. R. Schofield, P. H. Seeburg, T. Siddique, T. K. Mohandas, C. M. Becker, et H. Betz. « Alpha Subunit Variants of the Human Glycine Receptor: Primary Structures, Functional Expression and Chromosomal Localization of the Corresponding Genes ». *The EMBO Journal* 9, nº 3 (mars 1990): 771-76.

Grillner, Sten. « The Motor Infrastructure: From Ion Channels to Neuronal Networks ». *Nature Reviews. Neuroscience* 4, nº 7 (juillet 2003): 573-86. https://doi.org/10.1038/nrn1137.

Groeneweg, Femke L., Christa Trattnig, Jochen Kuhse, Ralph A. Nawrotzki, et Joachim Kirsch. « Gephyrin: A Key Regulatory Protein of Inhibitory Synapses and Beyond ». *Histochemistry and Cell Biology* 150, nº 5 (novembre 2018): 489-508. https://doi.org/10.1007/s00418-018-1725-2.

Groot, Claire de, Amalia Floriou-Servou, Yuan-Chen Tsai, Simon Früh, Manuela Kohler, Georgia Parkin, Cornelia Schwerdel, et al. « RhoGEF9 Splice Isoforms Influence Neuronal Maturation and Synapse Formation Downstream of A2 GABAA Receptors ». *PLoS Genetics* 13, nº 10 (octobre 2017): e1007073. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007073.

Grosskreutz, Y., A. Hermann, S. Kins, J. C. Fuhrmann, H. Betz, et M. Kneussel. « Identification of a Gephyrin-Binding Motif in the GDP/GTP Exchange Factor Collybistin ». *Biological Chemistry* 382, nº 10 (octobre 2001): 1455-62. https://doi.org/10.1515/BC.2001.179.

Grudzinska, Joanna, Rudolf Schemm, Svenja Haeger, Annette Nicke, Guenther Schmalzing, Heinrich Betz, et Bodo Laube. « The Beta Subunit Determines the Ligand Binding Properties of Synaptic Glycine Receptors ». *Neuron* 45, nº 5 (3 mars 2005): 727-39. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.01.028.

Guan, Ji-Song, Susan C. Su, Jun Gao, Nadine Joseph, Zhigang Xie, Ying Zhou, Omer Durak, et al. « Cdk5 Is Required for Memory Function and Hippocampal Plasticity via the CAMP Signaling Pathway ». *PloS One* 6, nº 9 (2011): e25735. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025735.

- H -

Hanley, Jonathan G. « PICK1: A Multi-Talented Modulator of AMPA Receptor Trafficking ». *Pharmacology & Therapeutics* 118, nº 1 (avril 2008): 152-60. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.02.002.

Hanus, Cyril, Marie-Virginie Ehrensperger, et Antoine Triller. « Activity-Dependent Movements of Postsynaptic Scaffolds at Inhibitory Synapses ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26, nº 17 (26 avril 2006): 4586-95. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5123-05.2006.

Hanus, Cyril, Christian Vannier, et Antoine Triller. « Intracellular Association of Glycine Receptor with Gephyrin Increases Its Plasma Membrane Accumulation Rate ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24, nº 5 (4 février 2004): 1119-28. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4380-03.2004.

Harvey, Kirsten, Ian C. Duguid, Melissa J. Alldred, Sarah E. Beatty, Hamish Ward, Nicholas H. Keep, Sue E. Lingenfelter, et al. « The GDP-GTP Exchange Factor Collybistin: An Essential Determinant of Neuronal Gephyrin Clustering ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24, nº 25 (23 juin 2004): 5816-26. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1184-04.2004.

Haucke, Volker, Erwin Neher, et Stephan J. Sigrist. « Protein Scaffolds in the Coupling of Synaptic Exocytosis and Endocytosis ». *Nature Reviews. Neuroscience* 12, nº 3 (mars 2011): 127-38. https://doi.org/10.1038/nrn2948.

He, Kaiming, Xiangyu Zhang, Shaoqing Ren, et Jian Sun. « Identity Mappings in Deep Residual Networks ». *arXiv:1603.05027 [cs]*, 25 juillet 2016. http://arxiv.org/abs/1603.05027.

Hemsath, Lars, Radovan Dvorsky, Dennis Fiegen, Marie-France Carlier, et Mohammad Reza Ahmadian. « An Electrostatic Steering Mechanism of Cdc42 Recognition by Wiskott-Aldrich Syndrome Proteins ». *Molecular Cell* 20, nº 2 (28 octobre 2005): 313-24. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.08.036.

Henkemeyer, Mark, Olga S. Itkis, Michelle Ngo, Peter W. Hickmott, et Iryna M. Ethell. « Multiple EphB receptor tyrosine kinases shape dendritic spines in the hippocampus ». *The Journal of Cell Biology* 163, nº 6 (22 décembre 2003): 1313-26. https://doi.org/10.1083/jcb.200306033.

Herweg, Jens, et Guenter Schwarz. « Splice-Specific Glycine Receptor Binding, Folding, and Phosphorylation of the Scaffolding Protein Gephyrin ». *The Journal of Biological Chemistry* 287, nº 16 (13 avril 2012): 12645-56. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.341826.

Hestrin, Shaul, et William E. Armstrong. « Morphology and Physiology of Cortical Neurons in Layer I ». *The Journal of Neuroscience* 16, nº 17 (1 septembre 1996): 5290-5300. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-17-05290.1996.

Hibi, Masahiko, et Takashi Shimizu. « Development of the Cerebellum and Cerebellar Neural Circuits ». *Developmental Neurobiology* 72, nº 3 (mars 2012): 282-301. https://doi.org/10.1002/dneu.20875.

Hines, Rochelle M., Hans Michael Maric, Dustin J. Hines, Amit Modgil, Patrizia Panzanelli, Yasuko Nakamura, Anna J. Nathanson, et al. « Developmental Seizures and Mortality Result from Reducing GABAA Receptor A2-Subunit Interaction with Collybistin ». *Nature Communications* 9, nº 1 (7 août 2018): 3130. https://doi.org/10.1038/s41467-018-05481-1.

Hirano, Tomoo. « Purkinje Neurons: Development, Morphology, and Function ». *Cerebellum (London, England)* 17, nº 6 (décembre 2018): 699-700. https://doi.org/10.1007/s12311-018-0985-7.

Hirbec, Hélène, Olga Perestenko, Guido Meyer, Shigetada Nakanishi, Jeremy Henley, et Kapil Dev. « The PDZ proteins PICK1, GRIP, and syntenin bind multiple glutamate receptor subtypes. Analysis of PDZ binding motifs ». *The Journal of biological chemistry* 277 (1 juin 2002): 15221-24. https://doi.org/10.1074/jbc.C200112200.

Hirono, Moritoshi, Fumihito Saitow, Moeko Kudo, Hidenori Suzuki, Yuchio Yanagawa, Masahisa Yamada, Soichi Nagao, Shiro Konishi, et Kunihiko Obata. « Cerebellar Globular Cells Receive Monoaminergic Excitation and Monosynaptic Inhibition from Purkinje Cells ». *PloS One* 7, nº 1 (2012): e29663. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029663.

Hoogenraad, Casper C., Aaron D. Milstein, Iryna M. Ethell, Mark Henkemeyer, et Morgan Sheng. « GRIP1 Controls Dendrite Morphogenesis by Regulating EphB Receptor Trafficking ». *Nature Neuroscience* 8, nº 7 (juillet 2005): 906-15. https://doi.org/10.1038/nn1487.

Hoon, Mrinalini, Tolga Soykan, Björn Falkenburger, Matthieu Hammer, Annarita Patrizi, Karl-Friedrich Schmidt, Marco Sassoè-Pognetto, et al. « Neuroligin-4 Is Localized to Glycinergic Postsynapses and Regulates Inhibition in the Retina ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, nº 7 (15 février 2011): 3053-58. https://doi.org/10.1073/pnas.1006946108.

Hortsch, Michael, Kakanahalli Nagaraj, et Tanja A. Godenschwege. « The Interaction between L1-Type Proteins and Ankyrins--a Master Switch for L1-Type CAM Function ». *Cellular & Molecular Biology Letters* 14, nº 1 (2009): 57-69. https://doi.org/10.2478/s11658-008-0035-4.

Hotulainen, Pirta, et Casper C. Hoogenraad. « Actin in Dendritic Spines: Connecting Dynamics to Function ». *The Journal of Cell Biology* 189, nº 4 (17 mai 2010): 619-29. https://doi.org/10.1083/jcb.201003008.

Hu, Mei-Chen, Pamela C. Griesler, Melanie M. Wall, et Denise B. Kandel. « Reciprocal Associations between Cigarette Consumption and DSM-IV Nicotine Dependence Criteria in Adolescent Smokers ». *Addiction (Abingdon, England)* 109, nº 9 (septembre 2014): 1518-28. https://doi.org/10.1111/add.12619.

Huang, Guojin, Joo Young Kim, Marlin Dehoff, Yusuke Mizuno, Kristine E. Kamm, Paul F. Worley, Shmuel Muallem, et Weizhong Zeng. « Ca2+ Signaling in Microdomains: Homer1 Mediates the Interaction between RyR2 and Cav1.2 to Regulate Excitation-Contraction Coupling ». *The Journal of Biological Chemistry* 282, nº 19 (11 mai 2007): 14283-90. https://doi.org/10.1074/jbc.M611529200.

Huang, Z. Josh, et Anirban Paul. « The Diversity of GABAergic Neurons and Neural Communication Elements ». *Nature Reviews. Neuroscience* 20, nº 9 (septembre 2019): 563-72. https://doi.org/10.1038/s41583-019-0195-4.

.

Hull, Court. « Prediction Signals in the Cerebellum: Beyond Supervised Motor Learning ». *ELife* 9 (30 mars 2020). https://doi.org/10.7554/eLife.54073.

Hung, Albert Y., Clifford C. Sung, Ilana L. Brito, et Morgan Sheng. « Degradation of Postsynaptic Scaffold GKAP and Regulation of Dendritic Spine Morphology by the TRIM3 Ubiquitin Ligase in Rat Hippocampal Neurons ». *PloS One* 5, nº 3 (24 mars 2010): e9842. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009842.

- I -

Iasevoli, Felice, Carmine Tomasetti, et Andrea de Bartolomeis. « Scaffolding Proteins of the Post-Synaptic Density Contribute to Synaptic Plasticity by Regulating Receptor Localization and Distribution: Relevance for Neuropsychiatric Diseases ». *Neurochemical Research* 38, nº 1 (janvier 2013): 1-22. https://doi.org/10.1007/s11064-012-0886-y.

- J -

Jacob, Tija C., Stephen J. Moss, et Rachel Jurd. « GABA(A) Receptor Trafficking and Its Role in the Dynamic Modulation of Neuronal Inhibition ». *Nature Reviews. Neuroscience* 9, nº 5 (mai 2008): 331-43. https://doi.org/10.1038/nrn2370.

Jiang, Xiaolong, Shan Shen, Cathryn R. Cadwell, Philipp Berens, Fabian Sinz, Alexander S. Ecker, Saumil Patel, et Andreas S. Tolias. « Principles of Connectivity among Morphologically Defined Cell Types in Adult Neocortex ». *Science* 350, nº 6264 (27 novembre 2015). https://doi.org/10.1126/science.aac9462.

Jin, Wenying, Woo-Ping Ge, Junyu Xu, Mian Cao, Lisheng Peng, Wingho Yung, Dezhi Liao, Shumin Duan, Mingjie Zhang, et Jun Xia. « Lipid Binding Regulates Synaptic Targeting of PICK1, AMPA Receptor Trafficking, and Synaptic Plasticity ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26, nº 9 (1 mars 2006): 2380-90. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3503-05.2006.

Jin, Yishi, et Craig Garner. « Molecular Mechanisms of Presynaptic Differentiation ». *Annual review of cell and developmental biology* 24 (1 juillet 2008): 237-62. https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123417.

- K -

Kalbouneh, Heba, Andrea Schlicksupp, Joachim Kirsch, et Jochen Kuhse. « Cyclin-Dependent Kinase 5 Is Involved in the Phosphorylation of Gephyrin and Clustering of GABAA Receptors at Inhibitory Synapses of Hippocampal Neurons ». *PloS One* 9, nº 8 (2014): e104256. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104256.

Kalscheuer, Vera M., Luciana Musante, Cheng Fang, Kirsten Hoffmann, Celine Fuchs, Eloisa Carta, Emma Deas, et al. « A Balanced Chromosomal Translocation Disrupting ARHGEF9 Is

Associated with Epilepsy, Anxiety, Aggression, and Mental Retardation ». *Human Mutation* 30, nº 1 (janvier 2009): 61-68. https://doi.org/10.1002/humu.20814.

Karson, Miranda A., Ai-Hui Tang, Teresa A. Milner, et Bradley E. Alger. « Synaptic Cross Talk between Perisomatic-Targeting Interneuron Classes Expressing Cholecystokinin and Parvalbumin in Hippocampus ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29, nº 13 (1 avril 2009): 4140-54. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5264-08.2009.

Katz, L. C., et C. J. Shatz. « Synaptic Activity and the Construction of Cortical Circuits ». *Science (New York, N.Y.)* 274, nº 5290 (15 novembre 1996): 1133-38. https://doi.org/10.1126/science.274.5290.1133.

Katz, P. S. « Neurons, Networks, and Motor Behavior ». *Neuron* 16, nº 2 (février 1996): 245-53. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80043-4.

Kaur, Kuldeep H., Roland Baur, et Erwin Sigel. « Unanticipated Structural and Functional Properties of Delta-Subunit-Containing GABAA Receptors ». *The Journal of Biological Chemistry* 284, nº 12 (20 mars 2009): 7889-96. https://doi.org/10.1074/jbc.M806484200.

Kayser, Matthew S., Andrew C. McClelland, Ethan G. Hughes, et Matthew B. Dalva. « Intracellular and Trans-Synaptic Regulation of Glutamatergic Synaptogenesis by EphB Receptors ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26, nº 47 (22 novembre 2006): 12152-64. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3072-06.2006.

Kayser, Matthew S., Mark J. Nolt, et Matthew B. Dalva. « EphB Receptors Couple Dendritic Filopodia Motility to Synapse Formation ». *Neuron* 59, nº 1 (10 juillet 2008): 56-69. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.05.007.

Kepecs, Adam, et Gordon Fishell. « Interneuron Cell Types Are Fit to Function ». *Nature* 505, nº 7483 (janvier 2014): 318-26. https://doi.org/10.1038/nature12983.

Kilisch, Markus, Simone Mayer, Miso Mitkovski, Heiko Roehse, Jennifer Hentrich, Blanche Schwappach, et Theofilos Papadopoulos. « A GTPase-Induced Switch in Phospholipid Affinity of Collybistin Contributes to Synaptic Gephyrin Clustering ». *Journal of Cell Science* 133, nº 2 (23 janvier 2020). https://doi.org/10.1242/jcs.232835.

Kim, E., S. Naisbitt, Y. P. Hsueh, A. Rao, A. Rothschild, A. M. Craig, et M. Sheng. « GKAP, a Novel Synaptic Protein That Interacts with the Guanylate Kinase-like Domain of the PSD-95/SAP90 Family of Channel Clustering Molecules ». *The Journal of Cell Biology* 136, nº 3 (10 février 1997): 669-78. https://doi.org/10.1083/jcb.136.3.669.

Kim, Eun Young, Nils Schrader, Birthe Smolinsky, Cécile Bedet, Christian Vannier, Günter Schwarz, et Hermann Schindelin. « Deciphering the Structural Framework of Glycine Receptor Anchoring by Gephyrin ». *The EMBO Journal* 25, nº 6 (22 mars 2006): 1385-95. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601029.

Kim, Seho, Alain Burette, Hye Sun Chung, Seok-Kyu Kwon, Jooyeon Woo, Hyun Woo Lee, Karam Kim, Hyun Kim, Richard J. Weinberg, et Eunjoon Kim. « NGL Family PSD-95-

Interacting Adhesion Molecules Regulate Excitatory Synapse Formation ». *Nature Neuroscience* 9, nº 10 (octobre 2006): 1294-1301. https://doi.org/10.1038/nn1763.

Kins, S., H. Betz, et J. Kirsch. « Collybistin, a Newly Identified Brain-Specific GEF, Induces Submembrane Clustering of Gephyrin ». *Nature Neuroscience* 3, nº 1 (janvier 2000): 22-29. https://doi.org/10.1038/71096.

Kirsch, J., et H. Betz. « The Postsynaptic Localization of the Glycine Receptor-Associated Protein Gephyrin Is Regulated by the Cytoskeleton ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 15, nº 6 (juin 1995): 4148-56.

Kirsch, J., M. L. Malosio, I. Wolters, et H. Betz. « Distribution of Gephyrin Transcripts in the Adult and Developing Rat Brain ». The European Journal of Neuroscience 5, nº 9 (1 septembre 1993): 1109-17. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1993.tb00965.x.

Kirsch, J., A. Zutra, et U. Z. Littauer. « Differential Distribution of Cytoskeletal Elements upon Differentiation of Human Neuroblastoma Cells: Expression of a Unique MAP2 Species ». *Progress in Clinical and Biological Research* 366 (1991): 327-33.

Kittler, Josef T., I. Lorena Arancibia-Carcamo, et Stephen J. Moss. « Association of GRIP1 with a GABA(A) Receptor Associated Protein Suggests a Role for GRIP1 at Inhibitory Synapses ». *Biochemical Pharmacology* 68, nº 8 (15 octobre 2004): 1649-54. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.07.028.

Kittler, Josef T., et Stephen J. Moss. « Modulation of GABAA Receptor Activity by Phosphorylation and Receptor Trafficking: Implications for the Efficacy of Synaptic Inhibition ». *Current Opinion in Neurobiology* 13, nº 3 (juin 2003): 341-47. https://doi.org/10.1016/s0959-4388(03)00064-3.

Klausberger, Thomas, Laszlo F. Marton, Joseph O'Neill, Jojanneke H. J. Huck, Yannis Dalezios, Pablo Fuentealba, Wai Yee Suen, et al. « Complementary Roles of Cholecystokinin- and Parvalbumin-Expressing GABAergic Neurons in Hippocampal Network Oscillations ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25, nº 42 (19 octobre 2005): 9782-93. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3269-05.2005.

Klein, Rüdiger. « Bidirectional Modulation of Synaptic Functions by Eph/Ephrin Signaling ». *Nature Neuroscience* 12, nº 1 (janvier 2009): 15-20. https://doi.org/10.1038/nn.2231.

Klinger, Neil, et Sandeep Mittal. « Deep Brain Stimulation for Seizure Control in Drug-Resistant Epilepsy ». *Neurosurgical Focus* 45, nº 2 (août 2018): E4. https://doi.org/10.3171/2018.4.FOCUS1872.

Kneussel, M., et H. Betz. « Clustering of Inhibitory Neurotransmitter Receptors at Developing Postsynaptic Sites: The Membrane Activation Model ». *Trends in Neurosciences* 23, nº 9 (septembre 2000): 429-35. https://doi.org/10.1016/s0166-2236(00)01627-1.

Kneussel, M., J. H. Brandstätter, B. Laube, S. Stahl, U. Müller, et H. Betz. « Loss of Postsynaptic GABA(A) Receptor Clustering in Gephyrin-Deficient Mice ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 19, nº 21 (1 novembre 1999): 9289-97.

Kneussel, M., S. Haverkamp, J. C. Fuhrmann, H. Wang, H. Wässle, R. W. Olsen, et H. Betz. « The Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor (GABAAR)-Associated Protein GABARAP Interacts with Gephyrin but Is Not Involved in Receptor Anchoring at the Synapse ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, nº 15 (18 juillet 2000): 8594-99. https://doi.org/10.1073/pnas.97.15.8594.

Ko, Jaewon, Marc V. Fuccillo, Robert C. Malenka, et Thomas C. Südhof. « LRRTM2 Functions as a Neurexin Ligand in Promoting Excitatory Synapse Formation ». *Neuron* 64, nº 6 (24 décembre 2009): 791-98. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.12.012.

Kornau, H. C., P. H. Seeburg, et M. B. Kennedy. « Interaction of Ion Channels and Receptors with PDZ Domain Proteins ». *Current Opinion in Neurobiology* 7, nº 3 (juin 1997): 368-73. https://doi.org/10.1016/s0959-4388(97)80064-5.

Koziol, Leonard F., Deborah Budding, Nancy Andreasen, Stefano D'Arrigo, Sara Bulgheroni, Hiroshi Imamizu, Masao Ito, et al. « Consensus Paper: The Cerebellum's Role in Movement and Cognition ». *Cerebellum (London, England)* 13, nº 1 (février 2014): 151-77. https://doi.org/10.1007/s12311-013-0511-x.

Kubota, Yoshiyuki, Fuyuki Karube, Masaki Nomura, et Yasuo Kawaguchi. « The Diversity of Cortical Inhibitory Synapses ». *Frontiers in Neural Circuits* 10 (25 avril 2016). https://doi.org/10.3389/fncir.2016.00027.

Kuhse, J., V. Schmieden, et H. Betz. « Identification and Functional Expression of a Novel Ligand Binding Subunit of the Inhibitory Glycine Receptor ». *The Journal of Biological Chemistry* 265, nº 36 (25 décembre 1990): 22317-20.

Kuhse, Jochen, Heba Kalbouneh, Andrea Schlicksupp, Susanne Mükusch, Ralph Nawrotzki, et Joachim Kirsch. « Phosphorylation of Gephyrin in Hippocampal Neurons by Cyclin-Dependent Kinase CDK5 at Ser-270 Is Dependent on Collybistin ». *The Journal of Biological Chemistry* 287, nº 37 (7 septembre 2012): 30952-66. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.349597.

Kwon, Seok-Kyu, Jooyeon Woo, Soo-Young Kim, Hyun Kim, et Eunjoon Kim. « Trans-Synaptic Adhesions between Netrin-G Ligand-3 (NGL-3) and Receptor Tyrosine Phosphatases LAR, Protein-Tyrosine Phosphatase δ (PTPδ), and PTPσ via Specific Domains Regulate Excitatory Synapse Formation* ». *Journal of Biological Chemistry* 285, nº 18 (30 avril 2010): 13966-78. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.061127.

- L -

Lainé, J., et H. Axelrad. « Lugaro Cells Target Basket and Stellate Cells in the Cerebellar Cortex ». *Neuroreport* 9, nº 10 (13 juillet 1998): 2399-2403. https://doi.org/10.1097/00001756-199807130-00045.

Langosch, D., W. Hoch, et H. Betz. « The 93 KDa Protein Gephyrin and Tubulin Associated with the Inhibitory Glycine Receptor Are Phosphorylated by an Endogenous Protein Kinase ». *FEBS Letters* 298, nº 2-3 (24 février 1992): 113-17. https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80034-e.

Langosch, D., L. Thomas, et H. Betz. « Conserved Quaternary Structure of Ligand-Gated Ion Channels: The Postsynaptic Glycine Receptor Is a Pentamer ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, nº 19 (octobre 1988): 7394-98. https://doi.org/10.1073/pnas.85.19.7394.

Lape, Remigijus, David Colquhoun, et Lucia G. Sivilotti. « On the Nature of Partial Agonism in the Nicotinic Receptor Superfamily ». *Nature* 454, nº 7205 (7 août 2008): 722-27. https://doi.org/10.1038/nature07139.

Laube, Bodo, Gábor Maksay, Rudolf Schemm, et Heinrich Betz. « Modulation of Glycine Receptor Function: A Novel Approach for Therapeutic Intervention at Inhibitory Synapses? » *Trends in Pharmacological Sciences* 23, nº 11 (novembre 2002): 519-27. https://doi.org/10.1016/s0165-6147(02)02138-7.

Laurén, Juha, Matti S. Airaksinen, Mart Saarma, et Tõnis Timmusk. « A Novel Gene Family Encoding Leucine-Rich Repeat Transmembrane Proteins Differentially Expressed in the Nervous System ». *Genomics* 81, nº 4 (avril 2003): 411-21. https://doi.org/10.1016/s0888-7543(03)00030-2.

Lee, SooHyun, Jens Hjerling-Leffler, Edward Zagha, Gord Fishell, et Bernardo Rudy. « The Largest Group of Superficial Neocortical GABAergic Interneurons Expresses Ionotropic Serotonin Receptors ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30, nº 50 (15 décembre 2010): 16796-808. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1869-10.2010.

Lee, Soohyun, Illya Kruglikov, Z. Josh Huang, Gord Fishell, et Bernardo Rudy. « A Disinhibitory Circuit Mediates Motor Integration in the Somatosensory Cortex ». *Nature Neuroscience* 16, nº 11 (novembre 2013): 1662-70. https://doi.org/10.1038/nn.3544.

Lee, Sue-Hyun, Jun-Hyeok Choi, Nuribalhae Lee, Hye-Ryeon Lee, Jae-Ick Kim, Nam-Kyung Yu, Sun-Lim Choi, Seung-Hee Lee, Hyoung Kim, et Bong-Kiun Kaang. « Synaptic Protein Degradation Underlies Destabilization of Retrieved Fear Memory ». *Science (New York, N.Y.)* 319, nº 5867 (29 février 2008): 1253-56. https://doi.org/10.1126/science.1150541.

Leil, Tarek A., Zi-Wei Chen, Chang-Sheng S. Chang, et Richard W. Olsen. « GABAA Receptor-Associated Protein Traffics GABAA Receptors to the Plasma Membrane in Neurons ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24, nº 50 (15 décembre 2004): 11429-38. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3355-04.2004.

Lévi, Sabine, R. Mark Grady, Michael D. Henry, Kevin P. Campbell, Joshua R. Sanes, et Ann Marie Craig. « Dystroglycan Is Selectively Associated with Inhibitory GABAergic Synapses but Is Dispensable for Their Differentiation ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 22, nº 11 (1 juin 2002): 4274-85. https://doi.org/20026440.

Levy, Michael, Guido C. Faas, Peter Saggau, William J. Craigen, et J. David Sweatt. « Mitochondrial Regulation of Synaptic Plasticity in the Hippocampus* ». *Journal of Biological Chemistry* 278, nº 20 (16 mai 2003): 17727-34. https://doi.org/10.1074/jbc.M212878200.

Lie, Eunkyung, Yan Li, Ryunhee Kim, et Eunjoon Kim. « SALM/Lrfn Family Synaptic Adhesion Molecules ». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 11 (5 avril 2018). https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00105.

Lim, Lynette, Da Mi, Alfredo Llorca, et Oscar Marín. « Development and Functional Diversification of Cortical Interneurons ». *Neuron* 100 (1 octobre 2018): 294-313. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.10.009.

Lim, Seung T., Kuei-Cheng Lim, Rita E. Giuliano, et Howard J. Federoff. « Temporal and Spatial Localization of Nectin-1 and l-Afadin during Synaptogenesis in Hippocampal Neurons ». *The Journal of Comparative Neurology* 507, nº 2 (10 mars 2008): 1228-44. https://doi.org/10.1002/cne.21608.

Linhoff, Michael W., Juha Laurén, Robert M. Cassidy, Frederick A. Dobie, Hideto Takahashi, Haakon B. Nygaard, Matti S. Airaksinen, Stephen M. Strittmatter, et Ann Marie Craig. « An Unbiased Expression Screen for Synaptogenic Proteins Identifies the LRRTM Protein Family as Synaptic Organizers ». *Neuron* 61, nº 5 (12 mars 2009): 734-49. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.01.017.

Lionel, Anath C., Andrea K. Vaags, Daisuke Sato, Matthew J. Gazzellone, Elyse B. Mitchell, Hong Yang Chen, Gregory Costain, et al. « Rare Exonic Deletions Implicate the Synaptic Organizer Gephyrin (GPHN) in Risk for Autism, Schizophrenia and Seizures ». *Human Molecular Genetics* 22, nº 10 (15 mai 2013): 2055-66. https://doi.org/10.1093/hmg/ddt056.

Liu, Guosong. « Local Structural Balance and Functional Interaction of Excitatory and Inhibitory Synapses in Hippocampal Dendrites ». *Nature Neuroscience* 7, nº 4 (avril 2004): 373-79. https://doi.org/10.1038/nn1206.

Liu, Jun, Dong Chuan Wu, et Yu Tian Wang. « Allosteric Potentiation of Glycine Receptor Chloride Currents by Glutamate ». *Nature Neuroscience* 13, nº 10 (octobre 2010): 1225-32. https://doi.org/10.1038/nn.2633.

Long, Philip, Melanie M. May, Victoria M. James, Simone Grannò, John P. Johnson, Patrick Tarpey, Roger E. Stevenson, Kirsten Harvey, Charles E. Schwartz, et Robert J. Harvey. « Missense Mutation R338W in ARHGEF9 in a Family with X-Linked Intellectual Disability with Variable Macrocephaly and Macro-Orchidism ». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 8 (2015): 83. https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00083.

Lou, Wilson Pak-Kin, Avni Baser, Stefan Klußmann, et Ana Martin-Villalba. « In Vivo Interrogation of Central Nervous System Translatome by Polyribosome Fractionation ». *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, nº 86 (30 avril 2014). https://doi.org/10.3791/51255.

Lovinger, David M. « Communication Networks in the Brain ». *Alcohol Research & Health* 31, nº 3 (2008): 196-214.

Lv, Shan, Zhen-Ni Guo, Hang Jin, Xin Sun, Meiyan Jia, Hongyin Ma, Yudan Lv, Quanli Qiu, Jia Liu, et Yi Yang. « Compromised Dynamic Cerebral Autoregulation in Patients with Epilepsy ». *BioMed Research International* 2018 (2018): 6958476. https://doi.org/10.1155/2018/6958476.

Lynch, Joseph W. « Molecular Structure and Function of the Glycine Receptor Chloride Channel ». *Physiological Reviews* 84, nº 4 (octobre 2004): 1051-95. https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2003.

- M -

Müller, Christina, et Stefan Remy. « Dendritic Inhibition Mediated by O-LM and Bistratified Interneurons in the Hippocampus ». *Frontiers in Synaptic Neuroscience* 6 (30 septembre 2014). https://doi.org/10.3389/fnsyn.2014.00023.

Maas, Christoph, Dorthe Belgardt, Han Kyu Lee, Frank F. Heisler, Corinna Lappe-Siefke, Maria M. Magiera, Juliette van Dijk, Torben J. Hausrat, Carsten Janke, et Matthias Kneussel. « Synaptic Activation Modifies Microtubules Underlying Transport of Postsynaptic Cargo ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, nº 21 (26 mai 2009): 8731-36. https://doi.org/10.1073/pnas.0812391106.

Maas, Christoph, Nadia Tagnaouti, Sven Loebrich, Bardo Behrend, Corinna Lappe-Siefke, et Matthias Kneussel. « Neuronal Cotransport of Glycine Receptor and the Scaffold Protein Gephyrin ». *The Journal of Cell Biology* 172, nº 3 (30 janvier 2006): 441-51. https://doi.org/10.1083/jcb.200506066.

Mah, Won, Jaewon Ko, Jungyong Nam, Kihoon Han, Woo Suk Chung, et Eunjoon Kim. « Selected SALM (Synaptic Adhesion-Like Molecule) Family Proteins Regulate Synapse Formation ». *Journal of Neuroscience* 30, nº 16 (21 avril 2010): 5559-68. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4839-09.2010.

Maniar, Tapan, Miriam Kaplan, George Wang, Kang Shen, Li Wei, Jocelyn Shaw, Sandhya Koushika, et Cornelia Bargmann. « UNC-33 (CRMP) and ankyrin organize microtubules and localize kinesin to polarize axon-dendrite sorting ». *Nature neuroscience* 15 (20 novembre 2011): 48-56. https://doi.org/10.1038/nn.2970.

Maric, Hans Michael, Vikram Babu Kasaragod, et Hermann Schindelin. « Modulation of Gephyrin-Glycine Receptor Affinity by Multivalency ». *ACS Chemical Biology* 9, nº 11 (21 novembre 2014): 2554-62. https://doi.org/10.1021/cb500303a.

Mariën, Peter, et Renato Borgatti. « Language and the Cerebellum ». *Handbook of Clinical Neurology* 154 (2018): 181-202. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63956-1.00011-4.

Marín, Oscar. « Interneuron Dysfunction in Psychiatric Disorders ». *Nature Reviews. Neuroscience* 13, nº 2 (18 janvier 2012): 107-20. https://doi.org/10.1038/nrn3155.

Markram, Henry, Maria Toledo-Rodriguez, Yun Wang, Anirudh Gupta, Gilad Silberberg, et Caizhi Wu. « Interneurons of the Neocortical Inhibitory System ». *Nature Reviews Neuroscience* 5, nº 10 (octobre 2004): 793-807. https://doi.org/10.1038/nrn1519.

Marsden, Jonathan F. « Cerebellar Ataxia ». *Handbook of Clinical Neurology* 159 (2018): 261-81. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63916-5.00017-3.

Marsden, Kurt C., Jennifer B. Beattie, Jenna Friedenthal, et Reed C. Carroll. « NMDA Receptor Activation Potentiates Inhibitory Transmission through GABA Receptor-Associated Protein-Dependent Exocytosis of GABA(A) Receptors ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27, nº 52 (26 décembre 2007): 14326-37. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4433-07.2007.

Matzenbach, B., Y. Maulet, L. Sefton, B. Courtier, P. Avner, J. L. Guénet, et H. Betz. « Structural Analysis of Mouse Glycine Receptor Alpha Subunit Genes. Identification and Chromosomal Localization of a Novel Variant ». *The Journal of Biological Chemistry* 269, nº 4 (28 janvier 1994): 2607-12.

Mayer, Simone, Rohit Kumar, Mamta Jaiswal, Tolga Soykan, Mohammad Reza Ahmadian, Nils Brose, Heinrich Betz, Jeong-Seop Rhee, et Theofilos Papadopoulos. « Collybistin Activation by GTP-TC10 Enhances Postsynaptic Gephyrin Clustering and Hippocampal GABAergic Neurotransmission ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, nº 51 (17 décembre 2013): 20795-800. https://doi.org/10.1073/pnas.1309078110.

McAllister, A. Kimberley. « Dynamic Aspects of Synapse Formation ». *Annual review of neuroscience* 30 (2007): 425-50. https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.112830.

McBain, C. J., T. J. DiChiara, et J. A. Kauer. « Activation of Metabotropic Glutamate Receptors Differentially Affects Two Classes of Hippocampal Interneurons and Potentiates Excitatory Synaptic Transmission ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 14, nº 7 (juillet 1994): 4433-45.

Meier, Jochen C., Christian Henneberger, Igor Melnick, Claudia Racca, Robert J. Harvey, Uwe Heinemann, Volker Schmieden, et Rosemarie Grantyn. « RNA Editing Produces Glycine Receptor Alpha3(P185L), Resulting in High Agonist Potency ». *Nature Neuroscience* 8, nº 6 (juin 2005): 736-44. https://doi.org/10.1038/nn1467.

Meier, J., M. De Chaldée, A. Triller, et C. Vannier. « Functional Heterogeneity of Gephyrins ». Molecular and Cellular Neurosciences 16, nº 5 (novembre 2000): 566-77. https://doi.org/10.1006/mcne.2000.0899.

Melik-Musyan, A. B., et V. V. Fanardzhyan. « Morphological Characteristics of Lugaro Cells in the Cerebellar Cortex ». *Neuroscience and Behavioral Physiology* 34, nº 6 (juillet 2004): 633-38. https://doi.org/10.1023/b:neab.0000028297.30474.f9.

Melzer, Nima, Carmen Villmann, Kristina Becker, Kirsten Harvey, Robert J. Harvey, Nico Vogel, Christoph J. Kluck, Matthias Kneussel, et Cord-Michael Becker. « Multifunctional Basic Motif in the Glycine Receptor Intracellular Domain Induces Subunit-Specific Sorting ». *The Journal of Biological Chemistry* 285, nº 6 (5 février 2010): 3730-39. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.030460.

Mendez, Pablo, Mathias De Roo, Lorenzo Poglia, Paul Klauser, et Dominique Muller. « N-cadherin mediates plasticity-induced long-term spine stabilization ». *The Journal of Cell Biology* 189, nº 3 (3 mai 2010): 589-600. https://doi.org/10.1083/jcb.201003007.

Mickelsen, Laura E., Mohan Bolisetty, Brock R. Chimileski, Akie Fujita, Eric J. Beltrami, James T. Costanzo, Jacob R. Naparstek, Paul Robson, et Alexander C. Jackson. « Single-cell transcriptomic analysis of the lateral hypothalamic area reveals molecularly distinct populations of inhibitory and excitatory neurons ». *Nature neuroscience* 22, nº 4 (avril 2019): 642-56. https://doi.org/10.1038/s41593-019-0349-8.

Mihaljević, Bojan, Ruth Benavides-Piccione, Concha Bielza, Pedro Larrañaga, et Javier DeFelipe. « Classification of GABAergic Interneurons by Leading Neuroscientists ». *Scientific Data* 6, nº 1 (22 octobre 2019): 221. https://doi.org/10.1038/s41597-019-0246-8.

Mihic, S. J., Q. Ye, M. J. Wick, V. V. Koltchine, M. D. Krasowski, S. E. Finn, M. P. Mascia, et al. « Sites of Alcohol and Volatile Anaesthetic Action on GABA(A) and Glycine Receptors ». *Nature* 389, nº 6649 (25 septembre 1997): 385-89. https://doi.org/10.1038/38738.

Miller, Paul S., Helena M. A. Da Silva, et Trevor G. Smart. « Molecular Basis for Zinc Potentiation at Strychnine-Sensitive Glycine Receptors ». *The Journal of Biological Chemistry* 280, nº 45 (11 novembre 2005): 37877-84. https://doi.org/10.1074/jbc.M508303200.

Miller, Paul S., Robert J. Harvey, et Trevor G. Smart. « Differential Agonist Sensitivity of Glycine Receptor Alpha2 Subunit Splice Variants ». *British Journal of Pharmacology* 143, nº 1 (septembre 2004): 19-26. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705875.

Minier, Frédéric, et Erwin Sigel. « Positioning of the Alpha-Subunit Isoforms Confers a Functional Signature to Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, nº 20 (18 mai 2004): 7769-74. https://doi.org/10.1073/pnas.0400220101.

Mizoguchi, Tsuyoshi, Kay Wheatley, Yoshie Hanzawa, Louisa Wright, Mutsuko Mizoguchi, Hae Ryong Song, Isabelle A. Carré, et George Coupland. « LHY and CCA1 Are Partially Redundant Genes Required to Maintain Circadian Rhythms in Arabidopsis ». *Developmental Cell* 2, nº 5 (mai 2002): 629-41. https://doi.org/10.1016/s1534-5807(02)00170-3.

Monyer, Hannah, et Henry Markram. « Interneuron Diversity Series: Molecular and Genetic Tools to Study GABAergic Interneuron Diversity and Function ». *Trends in Neurosciences* 27, nº 2 (février 2004): 90-97. https://doi.org/10.1016/j.tins.2003.12.008.

Mugnaini, E., M. R. Diño, et D. Jaarsma. « The Unipolar Brush Cells of the Mammalian Cerebellum and Cochlear Nucleus: Cytology and Microcircuitry ». *Progress in Brain Research* 114 (1997): 131-50. https://doi.org/10.1016/s0079-6123(08)63362-2.

Mukherjee, Jayanta, Karla Kretschmannova, Geraldine Gouzer, Hans-Michael Maric, Sarah Ramsden, Verena Tretter, Kirsten Harvey, et al. « The Residence Time of GABA(A)Rs at Inhibitory Synapses Is Determined by Direct Binding of the Receptor A1 Subunit to Gephyrin ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 31, nº 41 (12 octobre 2011): 14677-87. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2001-11.2011.

Mukherjee, Sourav Prasanna, Fiona M. Lyng, Amaya Garcia, Maria Davoren, et Hugh J. Byrne. « Mechanistic Studies of in Vitro Cytotoxicity of Poly(Amidoamine) Dendrimers in

Mammalian Cells ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 248, nº 3 (1 novembre 2010): 259-68. https://doi.org/10.1016/j.taap.2010.08.016.

Müller, B. M., U. Kistner, S. Kindler, W. J. Chung, S. Kuhlendahl, S. D. Fenster, L. F. Lau, et al. « SAP102, a Novel Postsynaptic Protein That Interacts with NMDA Receptor Complexes in Vivo ». *Neuron* 17, nº 2 (août 1996): 255-65. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80157-9.

Murai, Keith K., Dinah Misner, et Barbara Ranscht. « Contactin Supports Synaptic Plasticity Associated with Hippocampal Long-Term Depression but Not Potentiation ». *Current Biology* 12, nº 3 (5 février 2002): 181-90. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00680-2.

Murai, Keith K., et Elena B. Pasquale. « 'Eph'ective Signaling: Forward, Reverse and Crosstalk ». *Journal of Cell Science* 116, nº Pt 14 (15 juillet 2003): 2823-32. https://doi.org/10.1242/jcs.00625.

Murase, Sachiko, Eric Mosser, et Erin M. Schuman. « Depolarization Drives Beta-Catenin into Neuronal Spines Promoting Changes in Synaptic Structure and Function ». *Neuron* 35, nº 1 (3 juillet 2002): 91-105. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)00764-x.

Mushtaq, Gohar, Nigel H. Greig, Firoz Anwar, Fahad A. Al-Abbasi, Mazin A. Zamzami, Hasan A. Al-Talhi, et Mohammad A. Kamal. « Neuroprotective Mechanisms Mediated by CDK5 Inhibition ». *Current Pharmaceutical Design* 22, nº 5 (2016): 527-34. https://doi.org/10.2174/1381612822666151124235028.

- N -

Nadim, Farzan, et Dirk Bucher. « Neuromodulation of Neurons and Synapses ». *Current opinion in neurobiology* 0 (décembre 2014): 48-56. https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.05.003.

Nagashima, Shunta, Manami Kodaka, Hiroaki Iwasa, et Yutaka Hata. « MAGI2/S-SCAM outside brain ». *The Journal of Biochemistry* 157, nº 4 (1 avril 2015): 177-84. https://doi.org/10.1093/jb/mvv009.

Naisbitt, S., E. Kim, J. C. Tu, B. Xiao, C. Sala, J. Valtschanoff, R. J. Weinberg, P. F. Worley, et M. Sheng. « Shank, a Novel Family of Postsynaptic Density Proteins That Binds to the NMDA Receptor/PSD-95/GKAP Complex and Cortactin ». *Neuron* 23, nº 3 (juillet 1999): 569-82. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80809-0.

Naisbitt, S., J. Valtschanoff, D. W. Allison, C. Sala, E. Kim, A. M. Craig, R. J. Weinberg, et M. Sheng. « Interaction of the Postsynaptic Density-95/Guanylate Kinase Domain-Associated Protein Complex with a Light Chain of Myosin-V and Dynein ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 20, nº 12 (15 juin 2000): 4524-34.

Nakamoto, Kyle T., Jeffrey G. Mellott, Jeanette Killius, Megan E. Storey-Workley, Colleen S. Sowick, et Brett R. Schofield. « Ultrastructural Characterization of GABAergic and Excitatory Synapses in the Inferior Colliculus ». *Frontiers in Neuroanatomy* 8 (2014): 108. https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00108.

Nakamura, Kazuhiro, Kiyoshi Matsumura, Thomas Hübschle, Yoshiko Nakamura, Hiroyuki Hioki, Fumino Fujiyama, Zsolt Boldogköi, et al. « Identification of Sympathetic Premotor Neurons in Medullary Raphe Regions Mediating Fever and Other Thermoregulatory Functions ». *Journal of Neuroscience* 24, nº 23 (9 juin 2004): 5370-80. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1219-04.2004.

Nawrotzki, Ralph, Markus Islinger, Ingeborg Vogel, Alfred Völkl, et Joachim Kirsch. « Expression and Subcellular Distribution of Gephyrin in Non-Neuronal Tissues and Cells ». Histochemistry and Cell Biology 137, nº 4 (avril 2012): 471-82. https://doi.org/10.1007/s00418-012-0914-7.

Nayak, S. V., P. Rondé, A. D. Spier, S. C. Lummis, et R. A. Nichols. « Calcium Changes Induced by Presynaptic 5-Hydroxytryptamine-3 Serotonin Receptors on Isolated Terminals from Various Regions of the Rat Brain ». *Neuroscience* 91, nº 1 (1999): 107-17. https://doi.org/10.1016/s0306-4522(98)00520-x.

Neal, M. J. « The uptake of [14C]glycine by slices of mammalian spinal cord ». *The Journal of Physiology* 215, nº 1 (mai 1971): 103-17.

Nelson, Andrew D., et Paul M. Jenkins. « Axonal Membranes and Their Domains: Assembly and Function of the Axon Initial Segment and Node of Ranvier ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 11 (9 mai 2017). https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00136.

Neudauer, C. L., G. Joberty, N. Tatsis, et I. G. Macara. « Distinct Cellular Effects and Interactions of the Rho-Family GTPase TC10 ». *Current Biology: CB* 8, nº 21 (22 octobre 1998): 1151-60. https://doi.org/10.1016/s0960-9822(07)00486-1.

Nicholls, David G. « The Glutamatergic Nerve Terminal ». *European Journal of Biochemistry* 212, nº 3 (1993): 613-31. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb17700.x.

Nigro, Maximiliano José, Yoshiko Hashikawa-Yamasaki, et Bernardo Rudy. « Diversity and Connectivity of Layer 5 Somatostatin-Expressing Interneurons in the Mouse Barrel Cortex ». *Journal of Neuroscience* 38, nº 7 (14 février 2018): 1622-33. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2415-17.2017.

Nikolic, Z., B. Laube, R. G. Weber, P. Lichter, P. Kioschis, A. Poustka, C. Mülhardt, et C. M. Becker. « The Human Glycine Receptor Subunit Alpha3. Glra3 Gene Structure, Chromosomal Localization, and Functional Characterization of Alternative Transcripts ». *The Journal of Biological Chemistry* 273, nº 31 (31 juillet 1998): 19708-14. https://doi.org/10.1074/jbc.273.31.19708.

Oertel, Jana, Carmen Villmann, Helmut Kettenmann, Frank Kirchhoff, et Cord-Michael Becker. « A Novel Glycine Receptor Beta Subunit Splice Variant Predicts an Unorthodox Transmembrane Topology. Assembly into Heteromeric Receptor Complexes ». *The Journal of Biological Chemistry* 282, nº 5 (2 février 2007): 2798-2807. https://doi.org/10.1074/jbc.M608941200.

Olsen, Olav, et David S. Bredt. « Functional Analysis of the Nucleotide Binding Domain of Membrane-Associated Guanylate Kinases* ». *Journal of Biological Chemistry* 278, nº 9 (28 février 2003): 6873-78. https://doi.org/10.1074/jbc.M210165200.

Olsen, Olav, Kimberly A. Moore, Masaki Fukata, Toshinari Kazuta, Jonathan C. Trinidad, Fred W. Kauer, Michel Streuli, et al. « Neurotransmitter release regulated by a MALS–liprin-α presynaptic complex ». *The Journal of Cell Biology* 170, nº 7 (26 septembre 2005): 1127-34. https://doi.org/10.1083/jcb.200503011.

Ou, Chan-Yen, Vivian Y. Poon, Celine I. Maeder, Shigeki Watanabe, Emily K. Lehrman, Amy K. Y. Fu, Mikyoung Park, et al. « Two Cyclin-Dependent Kinase Pathways Are Essential for Polarized Trafficking of Presynaptic Components ». *Cell* 141, nº 5 (28 mai 2010): 846-58. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.011.

- P -

Paarmann, Ingo, Bertram Schmitt, Björn Meyer, Michael Karas, et Heinrich Betz. « Mass Spectrometric Analysis of Glycine Receptor-Associated Gephyrin Splice Variants ». *The Journal of Biological Chemistry* 281, nº 46 (17 novembre 2006): 34918-25. https://doi.org/10.1074/jbc.M607764200.

Pan, Qun, Ofer Shai, Leo J. Lee, Brendan J. Frey, et Benjamin J. Blencowe. « Deep Surveying of Alternative Splicing Complexity in the Human Transcriptome by High-Throughput Sequencing ». *Nature Genetics* 40, nº 12 (décembre 2008): 1413-15. https://doi.org/10.1038/ng.259.

Papadopoulos, Theofilos, Hong Jun Rhee, Devaraj Subramanian, Foteini Paraskevopoulou, Rainer Mueller, Carsten Schultz, Nils Brose, Jeong-Seop Rhee, et Heinrich Betz. « Endosomal Phosphatidylinositol 3-Phosphate Promotes Gephyrin Clustering and GABAergic Neurotransmission at Inhibitory Postsynapses ». *The Journal of Biological Chemistry* 292, nº 4 (27 janvier 2017): 1160-77. https://doi.org/10.1074/jbc.M116.771592.

Papadopoulos, Theofilos, Rudolf Schemm, Helmut Grubmüller, et Nils Brose. « Lipid Binding Defects and Perturbed Synaptogenic Activity of a Collybistin R290H Mutant That Causes Epilepsy and Intellectual Disability ». *The Journal of Biological Chemistry* 290, nº 13 (27 mars 2015): 8256-70. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.633024.

Papadopoulos, Theofilos, et Tolga Soykan. « The Role of Collybistin in Gephyrin Clustering at Inhibitory Synapses: Facts and Open Questions ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 5 (2011): 11. https://doi.org/10.3389/fncel.2011.00011.

Paul, Anirban, Megan Crow, Ricardo Raudales, Miao He, Jesse Gillis, et Z. Josh Huang. « Transcriptional Architecture of Synaptic Communication Delineates GABAergic Neuron Identity ». *Cell* 171, nº 3 (19 octobre 2017): 522-539.e20. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.032.

Pelkey, Kenneth A., Ramesh Chittajallu, Michael T. Craig, Ludovic Tricoire, Jason C. Wester, et Chris J. McBain. « Hippocampal GABAergic Inhibitory Interneurons ». *Physiological Reviews* 97, nº 4 (1 octobre 2017): 1619-1747. https://doi.org/10.1152/physrev.00007.2017.

Penzes, Peter, Alexander Beeser, Jonathan Chernoff, Martin R. Schiller, Betty A. Eipper, Richard E. Mains, et Richard L. Huganir. « Rapid Induction of Dendritic Spine Morphogenesis by

Trans-Synaptic EphrinB-EphB Receptor Activation of the Rho-GEF Kalirin ». *Neuron* 37, nº 2 (23 janvier 2003): 263-74. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)01168-6.

Perez-Catalan, Nelson A., Chris Q. Doe, et Sarah D. Ackerman. « The Role of Astrocyte-Mediated Plasticity in Neural Circuit Development and Function ». *Neural Development* 16, nº 1 (7 janvier 2021): 1. https://doi.org/10.1186/s13064-020-00151-9.

Perkins, Daya I., James R. Trudell, Daniel K. Crawford, Ronald L. Alkana, et Daryl L. Davies. « Molecular Targets and Mechanisms for Ethanol Action in Glycine Receptors ». *Pharmacology & Therapeutics* 127, nº 1 (juillet 2010): 53-65. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.03.003.

Perroy, J., O. El Far, F. Bertaso, J. P. Pin, H. Betz, J. Bockaert, et L. Fagni. « PICK1 Is Required for the Control of Synaptic Transmission by the Metabotropic Glutamate Receptor 7 ». *The EMBO Journal* 21, nº 12 (17 juin 2002): 2990-99. https://doi.org/10.1093/emboj/cdf313.

Petilla Interneuron Nomenclature Group, Giorgio A. Ascoli, Lidia Alonso-Nanclares, Stewart A. Anderson, German Barrionuevo, Ruth Benavides-Piccione, Andreas Burkhalter, et al. « Petilla Terminology: Nomenclature of Features of GABAergic Interneurons of the Cerebral Cortex ». *Nature Reviews. Neuroscience* 9, nº 7 (juillet 2008): 557-68. https://doi.org/10.1038/nrn2402.

Pfeiffer, F., D. Graham, et H. Betz. « Purification by Affinity Chromatography of the Glycine Receptor of Rat Spinal Cord ». *The Journal of Biological Chemistry* 257, nº 16 (25 août 1982): 9389-93.

Pino, Isabel del, Ingo Paarmann, Michael Karas, Manfred W. Kilimann, et Heinrich Betz. « The Trafficking Proteins Vacuolar Protein Sorting 35 and Neurobeachin Interact with the Glycine Receptor β-Subunit ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 412, nº 3 (2 septembre 2011): 435-40. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.07.110.

Pizzarelli, Rocco, Marilena Griguoli, Paola Zacchi, Enrica Maria Petrini, Andrea Barberis, Antonino Cattaneo, et Enrico Cherubini. « Tuning GABAergic Inhibition: Gephyrin Molecular Organization and Functions ». *Neuroscience* 439 (15 juillet 2020): 125-36. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.07.036.

Polo-Parada, Luis, Florian Plattner, Christian Bose, et Lynn T. Landmesser. « NCAM 180 Acting via a Conserved C-Terminal Domain and MLCK Is Essential for Effective Transmission with Repetitive Stimulation ». *Neuron* 46, nº 6 (16 juin 2005): 917-31. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.05.018.

Poulopoulos, Alexandros, Guido Meyer, Tolga Soykan, Mrinalini Hoon, Theofilos Papadopoulos, Mingyue Zhang, Ingo Paarmann, et al. « Neuroligin 2 Drives Postsynaptic Assembly at Perisomatic Inhibitory Synapses through Gephyrin and Collybistin ». *Neuron* 63, nº 5 (10 septembre 2009): 628-42. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.08.023.

Priestley, J. V., P. Somogyi, et A. C. Cuello. « Immunocytochemical Localization of Substance P in the Spinal Trigeminal Nucleus of the Rat: A Light and Electron Microscopic Study ». *The Journal of Comparative Neurology* 211, nº 1 (10 octobre 1982): 31-49. https://doi.org/10.1002/cne.902110105.

Prior, P., B. Schmitt, G. Grenningloh, I. Pribilla, G. Multhaup, K. Beyreuther, Y. Maulet, P. Werner, D. Langosch, et J. Kirsch. « Primary Structure and Alternative Splice Variants of Gephyrin, a Putative Glycine Receptor-Tubulin Linker Protein ». *Neuron* 8, nº 6 (juin 1992): 1161-70. https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90136-2.

- Q -

Qualmann, Britta, Tobias M. Boeckers, Monika Jeromin, Eckart D. Gundelfinger, et Michael M. Kessels. « Linkage of the Actin Cytoskeleton to the Postsynaptic Density via Direct Interactions of Abp1 with the ProSAP/Shank Family ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24, nº 10 (10 mars 2004): 2481-95. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5479-03.2004.

- R -

Raiborg, Camilla, Kay O. Schink, et Harald Stenmark. « Class III Phosphatidylinositol 3-Kinase and Its Catalytic Product PtdIns3P in Regulation of Endocytic Membrane Traffic ». *The FEBS Journal* 280, nº 12 (juin 2013): 2730-42. https://doi.org/10.1111/febs.12116.

Rajendra, S., J. W. Lynch, K. D. Pierce, C. R. French, P. H. Barry, et P. R. Schofield. « Mutation of an Arginine Residue in the Human Glycine Receptor Transforms Beta-Alanine and Taurine from Agonists into Competitive Antagonists ». *Neuron* 14, nº 1 (janvier 1995): 169-75. https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90251-1.

Ramming, M., S. Kins, N. Werner, A. Hermann, H. Betz, et J. Kirsch. « Diversity and Phylogeny of Gephyrin: Tissue-Specific Splice Variants, Gene Structure, and Sequence Similarities to Molybdenum Cofactor-Synthesizing and Cytoskeleton-Associated Proteins ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, nº 18 (29 août 2000): 10266-71. https://doi.org/10.1073/pnas.97.18.10266.

Ramser, Elisa M., Gerrit Wolters, Galina Dityateva, Alexander Dityatev, Melitta Schachner, et Thomas Tilling. « The 14-3-3ζ Protein Binds to the Cell Adhesion Molecule L1, Promotes L1 Phosphorylation by CKII and Influences L1-Dependent Neurite Outgrowth ». *PLOS ONE* 5, nº 10 (18 octobre 2010): e13462. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013462.

Rasband, Matthew N. « The Axon Initial Segment and the Maintenance of Neuronal Polarity ». *Nature Reviews. Neuroscience* 11, nº 8 (août 2010): 552-62. https://doi.org/10.1038/nrn2852.

Rathgeber, Louisa, Kira V. Gromova, Irina Schaefer, Petra Breiden, Christian Lohr, et Matthias Kneussel. « GSK3 and KIF5 Regulate Activity-Dependent Sorting of Gephyrin between Axons and Dendrites ». *European Journal of Cell Biology* 94, nº 3-4 (avril 2015): 173-78. https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2015.01.005.

Reddy-Alla, Suneel, Bertram Schmitt, Jörg Birkenfeld, Volker Eulenburg, Sebastien Dutertre, Christian Böhringer, Magdalena Götz, Heinrich Betz, et Theofilos Papadopoulos. « PH-Domain-Driven Targeting of Collybistin but Not Cdc42 Activation Is Required for Synaptic

Gephyrin Clustering ». *The European Journal of Neuroscience* 31, nº 7 (avril 2010): 1173-84. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07149.x.

Reid, T., A. Bathoorn, M. R. Ahmadian, et J. G. Collard. « Identification and Characterization of HPEM-2, a Guanine Nucleotide Exchange Factor Specific for Cdc42 ». *The Journal of Biological Chemistry* 274, nº 47 (19 novembre 1999): 33587-93. https://doi.org/10.1074/jbc.274.47.33587.

Rettig, Jens, et Erwin Neher. « Emerging Roles of Presynaptic Proteins in Ca++-Triggered Exocytosis ». *Science (New York, N.Y.)* 298, nº 5594 (25 octobre 2002): 781-85. https://doi.org/10.1126/science.1075375.

Robertson, Holly, John D. Hayes, et Calum Sutherland. « A Partnership with the Proteasome; the Destructive Nature of GSK3 ». *Biochemical Pharmacology* 147 (janvier 2018): 77-92. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.10.016.

Roostaei, Tina, Arash Nazeri, Mohammad Ali Sahraian, et Alireza Minagar. « The Human Cerebellum: A Review of Physiologic Neuroanatomy ». *Neurologic Clinics* 32, nº 4 (novembre 2014): 859-69. https://doi.org/10.1016/j.ncl.2014.07.013.

Rosenmund, Christian, Jens Rettig, et Nils Brose. « Molecular Mechanisms of Active Zone Function ». *Current Opinion in Neurobiology* 13, nº 5 (1 octobre 2003): 509-19. https://doi.org/10.1016/j.conb.2003.09.011.

Roth, Michael G. « Phosphoinositides in Constitutive Membrane Traffic ». *Physiological Reviews* 84, nº 3 (juillet 2004): 699-730. https://doi.org/10.1152/physrev.00033.2003.

- S -

Saiepour, Leila, Celine Fuchs, Annarita Patrizi, Marco Sassoè-Pognetto, Robert J. Harvey, et Kirsten Harvey. « Complex Role of Collybistin and Gephyrin in GABAA Receptor Clustering ». *The Journal of Biological Chemistry* 285, nº 38 (17 septembre 2010): 29623-31. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.121368.

Saiyed, Taslimarif, Ingo Paarmann, Bertram Schmitt, Svenja Haeger, Maria Sola, Günther Schmalzing, Winfried Weissenhorn, et Heinrich Betz. « Molecular Basis of Gephyrin Clustering at Inhibitory Synapses: Role of G- and E-Domain Interactions ». *The Journal of Biological Chemistry* 282, nº 8 (23 février 2007): 5625-32. https://doi.org/10.1074/jbc.M610290200.

Sakurai, Akira, et Paul S. Katz. « Functional Recovery after Lesion of a Central Pattern Generator ». *Journal of Neuroscience* 29, nº 42 (21 octobre 2009): 13115-25. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3485-09.2009.

Sala, Carlo, Gautier Roussignol, Jacopo Meldolesi, et Laurent Fagni. « Key Role of the Postsynaptic Density Scaffold Proteins Shank and Homer in the Functional Architecture of Ca2+ Homeostasis at Dendritic Spines in Hippocampal Neurons ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25, nº 18 (4 mai 2005): 4587-92. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4822-04.2005.

Sanes, Joshua R., et Masahito Yamagata. « Many Paths to Synaptic Specificity ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 25 (2009): 161-95. https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175402.

Sankaranarayanan, Sethuraman, Pradeep P. Atluri, et Timothy A. Ryan. « Actin Has a Molecular Scaffolding, Not Propulsive, Role in Presynaptic Function ». *Nature Neuroscience* 6, nº 2 (février 2003): 127-35. https://doi.org/10.1038/nn1002.

Schmahmann, Jeremy D. « The Cerebellum and Cognition ». *Neuroscience Letters* 688 (1 janvier 2019): 62-75. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.07.005.

Schorova, Lenka, et Stéphane Martin. « Sumoylation in Synaptic Function and Dysfunction ». *Frontiers in Synaptic Neuroscience* 8 (2016): 9. https://doi.org/10.3389/fnsyn.2016.00009.

Schreiner, Dietmar, Thi-Minh Nguyen, Giancarlo Russo, Steffen Heber, Andrea Patrignani, Erik Ahrné, et Peter Scheiffele. « Targeted Combinatorial Alternative Splicing Generates Brain Region-Specific Repertoires of Neurexins ». *Neuron* 84, nº 2 (22 octobre 2014): 386-98. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.09.011.

Schubert, Vanessa, et Carlos G. Dotti. « Transmitting on Actin: Synaptic Control of Dendritic Architecture ». *Journal of Cell Science* 120, nº Pt 2 (15 janvier 2007): 205-12. https://doi.org/10.1242/jcs.03337.

Seeger, Mark A., et Sarah E. Rice. « Microtubule-Associated Protein-like Binding of the Kinesin-1 Tail to Microtubules ». *The Journal of Biological Chemistry* 285, nº 11 (12 mars 2010): 8155-62. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.068247.

Seira, Oscar, et José Antonio Del Río. « Glycogen Synthase Kinase 3 Beta (GSK3β) at the Tip of Neuronal Development and Regeneration ». *Molecular Neurobiology* 49, nº 2 (avril 2014): 931-44. https://doi.org/10.1007/s12035-013-8571-y.

Setou, Mitsutoshi, Dae-Hyung Seog, Yosuke Tanaka, Yoshimitsu Kanai, Yosuke Takei, Masahiko Kawagishi, et Nobutaka Hirokawa. « Glutamate-Receptor-Interacting Protein GRIP1 Directly Steers Kinesin to Dendrites ». *Nature* 417, nº 6884 (2 mai 2002): 83-87. https://doi.org/10.1038/nature743.

Shapira, Mika, R. Grace Zhai, Thomas Dresbach, Tal Bresler, Viviana I. Torres, Eckart D. Gundelfinger, Noam E. Ziv, et Craig C. Garner. « Unitary Assembly of Presynaptic Active Zones from Piccolo-Bassoon Transport Vesicles ». *Neuron* 38, nº 2 (24 avril 2003): 237-52. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00207-1.

Shelly, Maya, Laura Cancedda, Sarah Heilshorn, Germán Sumbre, et Mu-Ming Poo. « LKB1/STRAD Promotes Axon Initiation during Neuronal Polarization ». *Cell* 129, nº 3 (4 mai 2007): 565-77. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.012.

Sheng, Morgan, et Myung Jong Kim. « Postsynaptic Signaling and Plasticity Mechanisms ». *Science (New York, N.Y.)* 298, nº 5594 (25 octobre 2002): 776-80. https://doi.org/10.1126/science.1075333.

Sheng, Morgan, et Carlo Sala. « Sheng M, Sala C. PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. Annu Rev Neurosci 24: 1-29 ». *Annual review of neuroscience* 24 (1 février 2001): 1-29. https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.1.

Shimoda, Yasushi, et Kazutada Watanabe. « Contactins: Emerging Key Roles in the Development and Function of the Nervous System ». *Cell Adhesion & Migration* 3, nº 1 (mars 2009): 64-70. https://doi.org/10.4161/cam.3.1.7764.

Shin, Hyewon, Michael Wyszynski, Kyung-Hye Huh, Juli G. Valtschanoff, Jae-Ran Lee, Jaewon Ko, Michel Streuli, Richard J. Weinberg, Morgan Sheng, et Eunjoon Kim. « Association of the Kinesin Motor KIF1A with the Multimodular Protein Liprin-A* ». *Journal of Biological Chemistry* 278, nº 13 (28 mars 2003): 11393-401. https://doi.org/10.1074/jbc.M211874200.

Siddiqui, Tabrez J., Raika Pancaroglu, Yunhee Kang, Amanda Rooyakkers, et Ann Marie Craig. « LRRTMs and Neuroligins Bind Neurexins with a Differential Code to Cooperate in Glutamate Synapse Development ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30, nº 22 (2 juin 2010): 7495-7506. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0470-10.2010.

Sieghart, W. « Structure and Pharmacology of Gamma-Aminobutyric AcidA Receptor Subtypes ». *Pharmacological Reviews* 47, nº 2 (juin 1995): 181-234.

Sigel, E., R. Baur, G. Trube, H. Möhler, et P. Malherbe. « The Effect of Subunit Composition of Rat Brain GABAA Receptors on Channel Function ». *Neuron* 5, nº 5 (novembre 1990): 703-11. https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90224-4.

Sigel, Erwin, et Michael E. Steinmann. « Structure, Function, and Modulation of GABA(A) Receptors ». *The Journal of Biological Chemistry* 287, nº 48 (23 novembre 2012): 40224-31. https://doi.org/10.1074/jbc.R112.386664.

Sik, A., M. Penttonen, A. Ylinen, et G. Buzsáki. « Hippocampal CA1 Interneurons: An in Vivo Intracellular Labeling Study ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 15, nº 10 (octobre 1995): 6651-65.

Simat, Marija, Franziska Parpan, et Jean-Marc Fritschy. « Heterogeneity of Glycinergic and Gabaergic Interneurons in the Granule Cell Layer of Mouse Cerebellum ». *The Journal of Comparative Neurology* 500, nº 1 (1 janvier 2007): 71-83. https://doi.org/10.1002/cne.21142.

Smith, Katharine R., Katherine J. Kopeikina, Jessica M. Fawcett-Patel, Katherine Leaderbrand, Ruoqi Gao, Britta Schürmann, Kristoffer Myczek, Jelena Radulovic, Geoffrey T. Swanson, et Peter Penzes. « Psychiatric Risk Factor ANK3/Ankyrin-G Nanodomains Regulate the Structure and Function of Glutamatergic Synapses ». *Neuron* 84, nº 2 (22 octobre 2014): 399-415. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.10.010.

Somogyi, P., J. V. Priestley, A. C. Cuello, A. D. Smith, et H. Takagi. « Synaptic Connections of Enkephalin-Immunoreactive Nerve Terminals in the Neostriatum: A Correlated Light and Electron Microscopic Study ». *Journal of Neurocytology* 11, nº 5 (octobre 1982): 779-807. https://doi.org/10.1007/BF01153519.

Sotelo, Constantino. « Molecular Layer Interneurons of the Cerebellum: Developmental and Morphological Aspects ». *Cerebellum (London, England)* 14, nº 5 (octobre 2015): 534-56. https://doi.org/10.1007/s12311-015-0648-x.

Soykan, Tolga, Daniela Schneeberger, Giancarlo Tria, Claudia Buechner, Nicole Bader, Dmitri Svergun, Ingrid Tessmer, et al. « A Conformational Switch in Collybistin Determines the Differentiation of Inhibitory Postsynapses ». *The EMBO Journal* 33, nº 18 (17 septembre 2014): 2113-33. https://doi.org/10.15252/embj.201488143.

Specht, Christian G., Nora Grünewald, Olivier Pascual, Nina Rostgaard, Günter Schwarz, et Antoine Triller. « Regulation of Glycine Receptor Diffusion Properties and Gephyrin Interactions by Protein Kinase C ». *The EMBO Journal* 30, nº 18 (9 août 2011): 3842-53. https://doi.org/10.1038/emboj.2011.276.

Specht, Christian G., Ignacio Izeddin, Pamela C. Rodriguez, Mohamed El Beheiry, Philippe Rostaing, Xavier Darzacq, Maxime Dahan, et Antoine Triller. « Quantitative Nanoscopy of Inhibitory Synapses: Counting Gephyrin Molecules and Receptor Binding Sites ». *Neuron* 79, nº 2 (24 juillet 2013): 308-21. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.05.013.

Stagi, Massimiliano, Adam I. Fogel, et Thomas Biederer. « SynCAM 1 participates in axo-dendritic contact assembly and shapes neuronal growth cones ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, nº 16 (20 avril 2010): 7568-73. https://doi.org/10.1073/pnas.0911798107.

Stevens, Beth, Nicola J. Allen, Luis E. Vazquez, Gareth R. Howell, Karen S. Christopherson, Navid Nouri, Kristina D. Micheva, et al. « The Classical Complement Cascade Mediates CNS Synapse Elimination ». *Cell* 131, nº 6 (14 décembre 2007): 1164-78. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.036.

Streng, Martha L., et Esther Krook-Magnuson. « The Cerebellum and Epilepsy ». *Epilepsy & Behavior: E&B*, 5 février 2020, 106909. https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2020.106909.

Südhof, T. C. « The Synaptic Vesicle Cycle: A Cascade of Protein-Protein Interactions ». *Nature* 375, nº 6533 (22 juin 1995): 645-53. https://doi.org/10.1038/375645a0.

Südhof, Thomas C. « The Synaptic Vesicle Cycle: A Cascade of Protein–Protein Interactions ». *Nature* 375, nº 6533 (juin 1995): 645-53. https://doi.org/10.1038/375645a0.

Sugita, S., F. Saito, J. Tang, J. Satz, K. Campbell, et T. C. Südhof. « A Stoichiometric Complex of Neurexins and Dystroglycan in Brain ». *The Journal of Cell Biology* 154, nº 2 (23 juillet 2001): 435-45. https://doi.org/10.1083/jcb.200105003.

Sugiyama, J., D. C. Bowen, et Z. W. Hall. « Dystroglycan Binds Nerve and Muscle Agrin ». *Neuron* 13, nº 1 (juillet 1994): 103-15. https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90462-6.

Sultan, Khadeejah T., et Song-Hai Shi. « Generation of Diverse Cortical Inhibitory Interneurons ». *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology* 7, nº 2 (mars 2018). https://doi.org/10.1002/wdev.306.

Sytnyk, Vladimir, Iryna Leshchyns'ka, Markus Delling, Galina Dityateva, Alexander Dityatev, et Melitta Schachner. « Neural cell adhesion molecule promotes accumulation of TGN organelles at sites of neuron-to-neuron contacts ». *The Journal of cell biology* 159 (1 décembre 2002): 649-61. https://doi.org/10.1083/jcb.200205098.

- T -

Tabuchi, Katsuhiko, et Thomas C. Südhof. « Structure and Evolution of Neurexin Genes: Insight into the Mechanism of Alternative Splicing ». *Genomics* 79, nº 6 (juin 2002): 849-59. https://doi.org/10.1006/geno.2002.6780.

Takahashi, Hideto, Kei-ichi Katayama, Kazuhiro Sohya, Hiroyuki Miyamoto, Tuhina Prasad, Yoshifumi Matsumoto, Maya Ota, et al. « Selective control of inhibitory synapse development by Slitrk3-PTPδ trans-synaptic interaction ». *Nature neuroscience* 15, nº 3 (29 janvier 2012): 389-S2. https://doi.org/10.1038/nn.3040.

Takahashi, Naoya, Kazuo Kitamura, Naoki Matsuo, Mark Mayford, Masanobu Kano, Norio Matsuki, et Yuji Ikegaya. « Locally Synchronized Synaptic Inputs ». *Science (New York, N.Y.)* 335, nº 6066 (20 janvier 2012): 353-56. https://doi.org/10.1126/science.1210362.

Takamiya, Kogo, Lifang Mao, Richard L. Huganir, et David J. Linden. « The Glutamate Receptor-Interacting Protein Family of GluR2-Binding Proteins Is Required for Long-Term Synaptic Depression Expression in Cerebellar Purkinje Cells ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 28, nº 22 (28 mai 2008): 5752-55. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0654-08.2008.

Takeuchi, M., Y. Hata, K. Hirao, A. Toyoda, M. Irie, et Y. Takai. « SAPAPs. A Family of PSD-95/SAP90-Associated Proteins Localized at Postsynaptic Density ». *The Journal of Biological Chemistry* 272, nº 18 (2 mai 1997): 11943-51. https://doi.org/10.1074/jbc.272.18.11943.

Tallafuss, Alexandra, John R. L. Constable, et Philip Washbourne. « Organization of Central Synapses by Adhesion Molecules ». *The European Journal of Neuroscience* 32, nº 2 (juillet 2010): 198-206. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07340.x.

Tanabe, K., T. Tachibana, T. Yamashita, Y. H. Che, Y. Yoneda, T. Ochi, M. Tohyama, H. Yoshikawa, et H. Kiyama. « The Small GTP-Binding Protein TC10 Promotes Nerve Elongation in Neuronal Cells, and Its Expression Is Induced during Nerve Regeneration in Rats ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 20, nº 11 (1 juin 2000): 4138-44.

Tanaka, H., W. Shan, G. R. Phillips, K. Arndt, O. Bozdagi, L. Shapiro, G. W. Huntley, D. L. Benson, et D. R. Colman. « Molecular Modification of N-Cadherin in Response to Synaptic Activity ». *Neuron* 25, nº 1 (janvier 2000): 93-107. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80874-0.

Tasic, Bosiljka, Vilas Menon, Thuc Nghi Nguyen, Tae Kyung Kim, Tim Jarsky, Zizhen Yao, Boaz Levi, et al. « Adult Mouse Cortical Cell Taxonomy by Single Cell Transcriptomics ». *Nature neuroscience* 19, nº 2 (février 2016): 335-46. https://doi.org/10.1038/nn.4216.

Tasic, Bosiljka, Zizhen Yao, Kimberly A. Smith, Lucas Graybuck, Thuc Nghi Nguyen, Darren Bertagnolli, Jeff Goldy, et al. « Shared and Distinct Transcriptomic Cell Types across Neocortical Areas ». *BioRxiv*, 6 décembre 2017, 229542. https://doi.org/10.1101/229542.

Thomas, Lisa A., Michael R. Akins, et Thomas Biederer. « Expression and Adhesion Profiles of SynCAM Molecules Indicate Distinct Neuronal Functions ». *The Journal of Comparative Neurology* 510, nº 1 (1 septembre 2008): 47-67. https://doi.org/10.1002/cne.21773.

Thompson, A. J., et S. C. R. Lummis. « 5-HT3 Receptors ». *Current pharmaceutical design* 12, nº 28 (2006): 3615-30.

Torres, G. E., W. D. Yao, A. R. Mohn, H. Quan, K. M. Kim, A. I. Levey, J. Staudinger, et M. G. Caron. « Functional Interaction between Monoamine Plasma Membrane Transporters and the Synaptic PDZ Domain-Containing Protein PICK1 ». *Neuron* 30, nº 1 (avril 2001): 121-34. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00267-7.

Tretter, V., N. Ehya, K. Fuchs, et W. Sieghart. « Stoichiometry and Assembly of a Recombinant GABAA Receptor Subtype ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 17, nº 8 (15 avril 1997): 2728-37.

Treutlein, Barbara, Ozgun Gokce, Stephen R. Quake, et Thomas C. Südhof. « Cartography of Neurexin Alternative Splicing Mapped by Single-Molecule Long-Read MRNA Sequencing ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, nº 13 (1 avril 2014): E1291-1299. https://doi.org/10.1073/pnas.1403244111.

Tseng, Wei Chou, Paul M. Jenkins, Masashi Tanaka, Richard Mooney, et Vann Bennett. « Giant Ankyrin-G Stabilizes Somatodendritic GABAergic Synapses through Opposing Endocytosis of GABAA Receptors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, nº 4 (27 janvier 2015): 1214-19. https://doi.org/10.1073/pnas.1417989112.

Tyagarajan, Shiva K., Himanish Ghosh, Kirsten Harvey, et Jean-Marc Fritschy. « Collybistin Splice Variants Differentially Interact with Gephyrin and Cdc42 to Regulate Gephyrin Clustering at GABAergic Synapses ». *Journal of Cell Science* 124, nº Pt 16 (15 août 2011): 2786-96. https://doi.org/10.1242/jcs.086199.

Tyagarajan, Shiva K., Himanish Ghosh, Gonzalo E. Yévenes, Susumu Y. Imanishi, Hanns Ulrich Zeilhofer, Bertran Gerrits, et Jean-Marc Fritschy. « Extracellular Signal-Regulated Kinase and Glycogen Synthase Kinase 3β Regulate Gephyrin Postsynaptic Aggregation and GABAergic Synaptic Function in a Calpain-Dependent Mechanism ». *The Journal of Biological Chemistry* 288, nº 14 (5 avril 2013): 9634-47. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.442616.

Tyan, Leonid, Simon Chamberland, Elise Magnin, Olivier Camiré, Ruggiero Francavilla, Linda Suzanne David, Karl Deisseroth, et Lisa Topolnik. « Dendritic Inhibition Provided by Interneuron-Specific Cells Controls the Firing Rate and Timing of the Hippocampal Feedback Inhibitory Circuitry ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 34, nº 13 (26 mars 2014): 4534-47. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3813-13.2014.

- U -

Ule, Jernej, et Benjamin J. Blencowe. « Alternative Splicing Regulatory Networks: Functions, Mechanisms, and Evolution ». *Molecular Cell* 76, nº 2 (17 octobre 2019): 329-45. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.017.

Ule, Jernej, Kirk B. Jensen, Matteo Ruggiu, Aldo Mele, Aljaz Ule, et Robert B. Darnell. « CLIP Identifies Nova-Regulated RNA Networks in the Brain ». Science (New York, N.Y.) 302, nº 5648 (14 novembre 2003): 1212-15. https://doi.org/10.1126/science.1090095.

Urban-Ciecko, Joanna, et Alison L. Barth. « Somatostatin-expressing neurons in cortical networks ». *Nature reviews. Neuroscience* 17, nº 7 (juillet 2016): 401-9. https://doi.org/10.1038/nrn.2016.53.

- V -

Varoqueaux, Frédérique, Gayane Aramuni, Randi L. Rawson, Ralf Mohrmann, Markus Missler, Kurt Gottmann, Weiqi Zhang, Thomas C. Südhof, et Nils Brose. « Neuroligins Determine Synapse Maturation and Function ». *Neuron* 51, nº 6 (21 septembre 2006): 741-54. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.09.003.

Verpelli, Chiara, Michael J. Schmeisser, Carlo Sala, et Tobias M. Boeckers. « Scaffold Proteins at the Postsynaptic Density ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 970 (2012): 29-61. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0932-8_2.

Verpelli, Chiara, Michael Schmeisser, Carlo Sala, et Tobias Boeckers. « Scaffold Proteins at the Postsynaptic Density ». *Advances in experimental medicine and biology* 970 (27 janvier 2012): 29-61. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0932-8_2.

Víg, J., J. Takács, H. Abrahám, G. G. Kovács, et J. Hámori. « Calretinin-Immunoreactive Unipolar Brush Cells in the Developing Human Cerebellum ». *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 23, nº 8 (décembre 2005): 723-29. https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2005.10.002.

Volk, Lenora, Chong-Hyun Kim, Kogo Takamiya, Yilin Yu, et Richard L. Huganir. « Developmental Regulation of Protein Interacting with C Kinase 1 (PICK1) Function in Hippocampal Synaptic Plasticity and Learning ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, nº 50 (14 décembre 2010): 21784-89. https://doi.org/10.1073/pnas.1016103107.

Voogd, J., et M. Glickstein. « The Anatomy of the Cerebellum ». *Trends in Neurosciences* 21, nº 9 (septembre 1998): 370-75. https://doi.org/10.1016/s0166-2236(98)01318-6.

- W -

Wagner, D. A., et C. Czajkowski. « Structure and Dynamics of the GABA Binding Pocket: A Narrowing Cleft That Constricts during Activation ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 21, nº 1 (1 janvier 2001): 67-74.

Wahl, Markus C., Cindy L. Will, et Reinhard Lührmann. « The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine ». *Cell* 136, nº 4 (20 février 2009): 701-18. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.009.

Waites, Clarissa, Ann Craig, et Craig Garner. « Mechanisms of vertebrate synaptogenesis ». *Annual review of neuroscience* 28 (1 février 2005): 251-74. https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144336.

Waldvogel, H. J., K. Baer, R. G. Snell, M. J. During, R. L. M. Faull, et M. I. Rees. « Distribution of Gephyrin in the Human Brain: An Immunohistochemical Analysis ». Neuroscience 116, nº 1 (2003): 145-56. https://doi.org/10.1016/s0306-4522(02)00550-x.

Wang, Chang-Yu, Kai Chang, Ronald S. Petralia, Ya-Xian Wang, Gail K. Seabold, et Robert J. Wenthold. « A Novel Family of Adhesion-Like Molecules That Interacts with the NMDA Receptor ». *Journal of Neuroscience* 26, nº 8 (22 février 2006): 2174-83. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3799-05.2006.

Wang, Eric, et Iannis Aifantis. « RNA Splicing and Cancer ». *Trends in Cancer* 6, nº 8 (août 2020): 631-44. https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.04.011.

Wang, Eric T., Rickard Sandberg, Shujun Luo, Irina Khrebtukova, Lu Zhang, Christine Mayr, Stephen F. Kingsmore, Gary P. Schroth, et Christopher B. Burge. « Alternative Isoform Regulation in Human Tissue Transcriptomes ». *Nature* 456, nº 7221 (27 novembre 2008): 470-76. https://doi.org/10.1038/nature07509.

Wang, Samuel S.-H., Alexander D. Kloth, et Aleksandra Badura. « The Cerebellum, Sensitive Periods, and Autism ». *Neuron* 83, nº 3 (6 août 2014): 518-32. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.07.016.

Wenk, Markus R., et Pietro De Camilli. « Protein-Lipid Interactions and Phosphoinositide Metabolism in Membrane Traffic: Insights from Vesicle Recycling in Nerve Terminals ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, nº 22 (1 juin 2004): 8262-69. https://doi.org/10.1073/pnas.0401874101.

Williams, Megan E., Sareina C.-Y. Wu, William L. McKenna, et Lindsay Hinck. « Surface Expression of the Netrin Receptor UNC5H1 Is Regulated through a Protein Kinase C-Interacting Protein/Protein Kinase-Dependent Mechanism ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 23, nº 36 (10 décembre 2003): 11279-88.

Williamson, R. A., M. D. Henry, K. J. Daniels, R. F. Hrstka, J. C. Lee, Y. Sunada, O. Ibraghimov-Beskrovnaya, et K. P. Campbell. « Dystroglycan Is Essential for Early Embryonic Development: Disruption of Reichert's Membrane in Dag1-Null Mice ». *Human Molecular Genetics* 6, nº 6 (juin 1997): 831-41. https://doi.org/10.1093/hmg/6.6.831.

Wit, Sanne de, Philip R. Corlett, Mike R. Aitken, Anthony Dickinson, et Paul C. Fletcher. « Differential Engagement of the Ventromedial Prefrontal Cortex by Goal-Directed and

Habitual Behavior toward Food Pictures in Humans ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29, nº 36 (9 septembre 2009): 11330-38. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1639-09.2009.

Woo, Jooyeon, Seok-Kyu Kwon, Seungwon Choi, Seho Kim, Jae-Ran Lee, Anthone W. Dunah, Morgan Sheng, et Eunjoon Kim. « Trans-Synaptic Adhesion between NGL-3 and LAR Regulates the Formation of Excitatory Synapses ». *Nature Neuroscience* 12, nº 4 (avril 2009): 428-37. https://doi.org/10.1038/nn.2279.

Wu, Ye E., Lin Huo, Celine I. Maeder, Wei Feng, et Kang Shen. « The Balance between Capture and Dissociation of Presynaptic Proteins Controls the Spatial Distribution of Synapses ». *Neuron* 78, nº 6 (19 juin 2013): 994-1011. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.04.035.

Wucherpfennig, Tanja, Michaela Wilsch-Bräuninger, et Marcos González-Gaitán. « Role of Drosophila Rab5 during Endosomal Trafficking at the Synapse and Evoked Neurotransmitter Release ». *The Journal of Cell Biology* 161, nº 3 (12 mai 2003): 609-24. https://doi.org/10.1083/jcb.200211087.

Wyszynski, Michael, Eunjoon Kim, Anthone W. Dunah, Maria Passafaro, Juli G. Valtschanoff, Carles Serra-Pagès, Michel Streuli, Richard J. Weinberg, et Morgan Sheng. « Interaction between GRIP and Liprin-Alpha/SYD2 Is Required for AMPA Receptor Targeting ». *Neuron* 34, nº 1 (28 mars 2002): 39-52. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)00640-2.

- X -

Xia, J., X. Zhang, J. Staudinger, et R. L. Huganir. « Clustering of AMPA Receptors by the Synaptic PDZ Domain-Containing Protein PICK1 ». *Neuron* 22, nº 1 (janvier 1999): 179-87. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80689-3.

Xiang, Song, Eun Young Kim, Jessica J. Connelly, Nicolas Nassar, Joachim Kirsch, Jan Winking, Günter Schwarz, et Hermann Schindelin. « The Crystal Structure of Cdc42 in Complex with Collybistin II, a Gephyrin-Interacting Guanine Nucleotide Exchange Factor ». *Journal of Molecular Biology* 359, nº 1 (26 mai 2006): 35-46. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.03.019.

Xu, Tian-Le, et Neng Gong. « Glycine and Glycine Receptor Signaling in Hippocampal Neurons: Diversity, Function and Regulation ». *Progress in Neurobiology* 91, nº 4 (août 2010): 349-61. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.04.008.

Xu, Xiangmin, Keith D. Roby, et Edward M. Callaway. « Mouse Cortical Inhibitory Neuron Type That Coexpresses Somatostatin and Calretinin ». *The Journal of Comparative Neurology* 499, nº 1 (1 novembre 2006): 144-60. https://doi.org/10.1002/cne.21101.

- Y -

Yamamoto, Kenji, Yu Sakagami, Shigeki Sugiura, Kaoru Inokuchi, Shun Shimohama, et Nobuo Kato. « Homer 1a Enhances Spike-Induced Calcium Influx via L-Type Calcium Channels in Neocortex Pyramidal Cells ». *The European Journal of Neuroscience* 22, nº 6 (septembre 2005): 1338-48. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04278.x.

Yan, Liying, Mingyu Yang, Hongshan Guo, Lu Yang, Jun Wu, Rong Li, Ping Liu, et al. « Single-Cell RNA-Seq Profiling of Human Preimplantation Embryos and Embryonic Stem Cells ».

Nature Structural & Molecular Biology 20, nº 9 (septembre 2013): 1131-39. https://doi.org/10.1038/nsmb.2660.

Yang, Feng, Xiang-ping He, James Russell, et Bai Lu. « Ca2+ influx–independent synaptic potentiation mediated by mitochondrial Na+-Ca2+ exchanger and protein kinase C ». *Journal of Cell Biology* 163, nº 3 (10 novembre 2003): 511-23. https://doi.org/10.1083/jcb.200307027.

Yang, Zhe, Elena Taran, Timothy I. Webb, et Joseph W. Lynch. « Stoichiometry and Subunit Arrangement of A1β Glycine Receptors as Determined by Atomic Force Microscopy ». *Biochemistry* 51, nº 26 (3 juillet 2012): 5229-31. https://doi.org/10.1021/bi300063m.

Yao, I., Y. Hata, K. Hirao, M. Deguchi, N. Ide, M. Takeuchi, et Y. Takai. « Synamon, a Novel Neuronal Protein Interacting with Synapse-Associated Protein 90/Postsynaptic Density-95-Associated Protein ». *The Journal of Biological Chemistry* 274, nº 39 (24 septembre 1999): 27463-66. https://doi.org/10.1074/jbc.274.39.27463.

Yasuda, Shin, Hidekazu Tanaka, Hiroko Sugiura, Ko Okamura, Taiki Sakaguchi, Uyen Tran, Takako Takemiya, et al. « Activity-Induced Protocadherin Arcadlin Regulates Dendritic Spine Number by Triggering N-Cadherin Endocytosis via TAO2β and p38 MAP Kinases ». *Neuron* 56, nº 3 (8 novembre 2007): 456-71. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.08.020.

Ye, B., D. Liao, X. Zhang, P. Zhang, H. Dong, et R. L. Huganir. « GRASP-1: A Neuronal RasGEF Associated with the AMPA Receptor/GRIP Complex ». *Neuron* 26, nº 3 (juin 2000): 603-17. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)81198-8.

Yeganeh-Doost, Peyman, Oliver Gruber, Peter Falkai, et Andrea Schmitt. « The Role of the Cerebellum in Schizophrenia: From Cognition to Molecular Pathways ». *Clinics (Sao Paulo, Brazil)* 66 Suppl 1 (2011): 71-77. https://doi.org/10.1590/s1807-59322011001300009.

Yévenes, Gonzalo E., et Hanns Ulrich Zeilhofer. « Molecular Sites for the Positive Allosteric Modulation of Glycine Receptors by Endocannabinoids ». *PLoS ONE* 6, nº 8 (25 août 2011). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023886.

Yu, Wendou, Erik I. Charych, David R. Serwanski, Rong-wen Li, Rashid Ali, Ben A. Bahr, et Angel L. De Blas. « Gephyrin Interacts with the Glutamate Receptor Interacting Protein 1 Isoforms at GABAergic Synapses ». *Journal of Neurochemistry* 105, nº 6 (1 juin 2008): 2300-2314. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05311.x.

Yuan, Joseph P., Kirill Kiselyov, Dong Ming Shin, Jin Chen, Nikolay Shcheynikov, Shin H. Kang, Marlin H. Dehoff, et al. « Homer Binds TRPC Family Channels and Is Required for Gating of TRPC1 by IP3 Receptors ». *Cell* 114, nº 6 (19 septembre 2003): 777-89. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00716-5.

- Z -

Zeisel, Amit, Ana B. Muñoz-Manchado, Simone Codeluppi, Peter Lönnerberg, Gioele La Manno, Anna Juréus, Sueli Marques, et al. « Brain Structure. Cell Types in the Mouse Cortex and Hippocampus Revealed by Single-Cell RNA-Seq ». *Science (New York, N.Y.)* 347, nº 6226 (6 mars 2015): 1138-42. https://doi.org/10.1126/science.aaa1934.

Zhai, R. G., H. Vardinon-Friedman, C. Cases-Langhoff, B. Becker, E. D. Gundelfinger, N. E. Ziv, et C. C. Garner. « Assembling the Presynaptic Active Zone: A Characterization of an Active One Precursor Vesicle ». *Neuron* 29, nº 1 (janvier 2001): 131-43. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00185-4.

Zhang, Ye, Kenian Chen, Steven A. Sloan, Mariko L. Bennett, Anja R. Scholze, Sean O'Keeffe, Hemali P. Phatnani, et al. « An RNA-Sequencing Transcriptome and Splicing Database of Glia, Neurons, and Vascular Cells of the Cerebral Cortex ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 34, nº 36 (3 septembre 2014): 11929-47. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1860-14.2014.

Zhu, Fei, Mélissa Cizeron, Zhen Qiu, Ruth Benavides-Piccione, Maksym V. Kopanitsa, Nathan G. Skene, Babis Koniaris, et al. « Architecture of the Mouse Brain Synaptome ». *Neuron* 99, nº 4 (22 août 2018): 781-799.e10. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.07.007.

Zita, M. Moretto, Ivan Marchionni, Elisa Bottos, Massimo Righi, Giannino Del Sal, Enrico Cherubini, et Paola Zacchi. « Post-Phosphorylation Prolyl Isomerisation of Gephyrin Represents a Mechanism to Modulate Glycine Receptors Function ». *The EMBO Journal* 26, nº 7 (4 avril 2007): 1761-71. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601625.

Ziv, N. E., et C. C. Garner. « Principles of Glutamatergic Synapse Formation: Seeing the Forest for the Trees ». *Current Opinion in Neurobiology* 11, nº 5 (octobre 2001): 536-43. https://doi.org/10.1016/s0959-4388(00)00246-4.