

Homer et le fonctionnement des synapses glutamatergiques

Le glutamate (glu) est le principal neurotransmetteur excitateur du système nerveux central des vertébrés. Il agit en se fixant sur des récepteurs ionotropes, NMDAR (*N-methyl-D-aspartate receptor*) et AMPAR (*α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor*), et des récepteurs métabotropes, mGluR, couplés aux protéines G. Dans les structures synaptiques, l'agencement de ces récepteurs est très précis et leur localisation est déterminante pour leur rôle dans la transmission du signal glutamatergique. Leurs fonctions (contrôle de la libération du neurotransmetteur, réponse à des stimulus de fréquence variable ou modulation de la fonction de récepteurs ou canaux adjacents) diffèrent en effet selon qu'ils se situent dans les membranes pré- ou postsynaptiques, au centre de la densité postsynaptique* (PSD) ou à sa périphérie. Chaque synapse comporte une mosaïque de récepteurs dont la cohérence fonctionnelle est probablement assurée par des protéines adaptatrices. Celles-ci, présentes sous la membrane pré- ou post-synaptique, interagissent simultanément avec des récepteurs, des éléments du cytosquelette et des enzymes impliquées dans la transmission du signal.

PSD95 est la première protéine adaptatrice mise en évidence au niveau des densités postsynaptiques des synapses glutamatergiques [1, 2]. Initialement caractérisée par la liaison de son domaine PDZ au domaine cytoplasmique des récepteurs NMDA,

PSD95 appartient en fait à une famille de plus en plus vaste de protéines contenant plusieurs domaines PDZ (*PSD-95, Discs-large and ZO-1*). Leur caractéristique est de se lier chacune à un ou plusieurs sous-types de récepteurs ionotropiques du glutamate ainsi qu'à des éléments structuraux de la synapse. Si leurs interactions biochimiques sont assez bien caractérisées, leur fonction au cours du développement et dans la régulation de la transmission synaptique est en revanche très mal connue.

Homer-1a/Ves11-s est une autre protéine adaptatrice: elle interagit avec les récepteurs mGluR et a été isolée fortuitement par les groupes de Worley et Inokushi qui recherchaient des gènes dont l'expression serait induite par des stimulations neuronales à haute fréquence [3, 4]. Plusieurs protéines de la même famille ont depuis été caractérisées. Elles interviennent dans le trafic intracellulaire et l'organisation membranaire des récepteurs dans la synapse, et la transduction du signal. Les protéines Homer suscitent un intérêt particulier car elles sont le premier exemple de protéines entrant dans la structure synaptique dont la fonction est contrôlée par l'activité neuronale.

Les protéines Homer

Homer-1a/Ves11-s est le produit d'un gène dont l'expression est induite très précocement lors des stimulations neuronales intenses [3, 4]. C'est une protéine de 186 acides aminés qui possède un domaine nommé EVH-1 (pour *Ena/VASP/Homer*) dont la structure est semblable à celle des protéines *Ena (Drosophila Enabled)* et *VASP* impliquées dans le contrôle de la dynamique des filaments d'actine (*figure 1*). Au centre

de ce domaine EVH-1, on trouve, comme dans les domaines PDZ, une séquence GLGF. Homer-1a se lie, par son domaine EVH-1, aux séquences poly-proline présentes dans les domaines C-terminaux des mGluR du groupe 1 (mGluR1a et mGluR5), mais la fonctionnalité du domaine *PDZ-like* n'est pas établie.

La recherche d'homologues d'*Homer-1a* a permis la caractérisation de plusieurs variants d'épissage du gène *Homer 1, Homer 1b/c*, et de deux autres gènes codant pour les protéines *Homer-2* et *3* [5, 6] (*figure 1*). Comme *Homer-1a*, ces protéines possèdent un domaine EVH-1 à leur extrémité amino-terminale. Elles sont en revanche plus longues (environ 350 aa) que *Homer-1a* et incluent un domaine carboxy-terminal supplémentaire correspondant à des structures de type leucine zipper. Ces structures *coiled-coil (CC)* peuvent s'associer entre elles pour former des homo- ou hétéro-multimères de protéines *Homer* dont la stœchiométrie n'est pas déterminée. *Homer-1a* est donc actuellement la seule protéine de cette famille qui ne possède pas de domaine de multimérisation.

Les différents variants de *Homer* sont exprimés de façon constitutive dans toutes les régions du cerveau chez le rat mais à des degrés divers comme en témoigne la forte expression de *Homer-3* dans le cervelet. Leur expression n'est pas restreinte au système nerveux puisque *Homer-2b* est présent aussi dans le muscle squelettique et *Homer-3* dans les poumons. Dans le cerveau, l'ensemble des variants présente un pic d'expression pendant la période post-natale et seule l'expression de *Homer-1a* est contrôlée par l'activité neuronale. A l'échelon cellulaire, *Homer 1* et *3* sont localisés dans les régions denses

* La densité post-synaptique est un épaissement, visible en microscopie électronique, de la membrane du neurone postsynaptique en regard d'une terminaison axonale. Des systèmes de réception et des canaux ioniques sont concentrés au niveau de cette région membranaire.

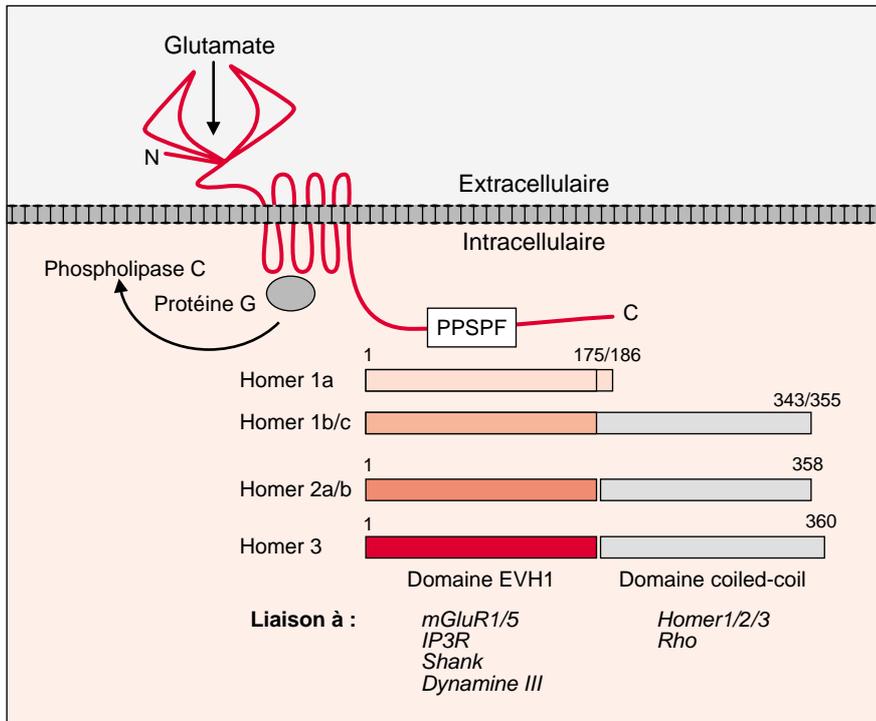


Figure 1. **Structure des mGluR de groupe 1 et des protéines Homer.** Les mGluR (récepteurs métabotropes du glutamate) sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Leur extrémité C terminale contient une séquence PPSPF par laquelle ils interagissent avec le domaine EVH-1 des protéines Homer. Homer 1a ne contient que ce domaine. Les autres protéines de la famille Homer contiennent, en plus du domaine EVH-1, un domaine coiled-coil permettant la formation d'homo- ou d'hétéro-multimères de protéines Homer. Le domaine EVH-1 peut aussi interagir avec le récepteur de l'IP3, la protéine Shank et peut-être la dynamine 3. Le domaine C-terminal se lie également à la petite protéine G, rho.

post-synaptiques des synapses glutamatergiques, tandis que la répartition de Homer-2 est plus diffuse dans le cytosol.

Les protéines Homer sont membres d'un réseau protéique complexe

Certaines protéines de la PSD possèdent plusieurs sites de liaison et sont donc capables d'interagir simultanément avec les protéines de la même famille et d'autres protéines de la PSD dont des récepteurs membranaires, des éléments de structure du cytosquelette, et des éléments de la chaîne de transduction du signal. Ces données suggèrent fortement l'existence d'un réseau de protéines interagissant entre elles et participant à une structure fonctionnelle au niveau de la synapse. De plus, cer-

taines de ces protéines n'ont qu'un seul domaine de fixation et sont donc capables d'interrompre le réseau.

De nombreuses protéines se lient *in vivo* et *in vitro* au domaine EVH-1 N-terminal des protéines Homer par des séquences riches en proline. C'est le cas des récepteurs mGluR de groupe I (mGluR1 et 5), du récepteur de l'IP3 (inositide tri-phosphate), des protéines Shank, de la F-actine, et probablement d'autres protéines comme la dynamine 3 [5-8]. Le domaine CC des formes longues de Homer permet non seulement la formation d'hétéromultimères, mais interagit aussi avec les formes activées des petites protéines G de la famille rho [9]. C'est ce domaine CC de multimérisation qui permet de faire le lien entre les diffé-

rentes protéines reconnues par les formes longues d'Homer. Comme Homer-1a ne possède pas de domaine CC permettant la formation de multimères, il joue donc un rôle d'inhibiteur de la formation de ces réseaux de protéines.

L'activation des mGluR de groupe 1 stimule la production d'IP3 qui active le récepteur de l'IP3 du réticulum endoplasmique et permet la libération du calcium du réticulum. Les protéines Homer, associées par leur domaine CC, peuvent interagir à la fois avec mGluR et le récepteur de l'IP3, permettant ainsi une liaison entre ces deux récepteurs, qui pourrait intervenir dans la transmission du signal. Dans les cellules de Purkinje, la surexpression de Homer-1a diminue la libération du calcium intracellulaire [7]. L'interruption, par Homer-1a du réseau de protéines permettant de relier mGluR au récepteur de l'IP3 pourrait expliquer cet effet.

La protéine Shank est un membre d'une nouvelle famille de protéines possédant de multiples sites de liaisons protéine-protéine [10]. Elle se lie par son domaine PDZ à mGluR1/5 et à la protéine GKAP (*guanylate kinase associated protein*), elle-même associée à la protéine PSD-95, et par ses domaines riches en proline à Homer et à la cortactine. De plus, Shank peut former des homomultimères grâce à son domaine SAM (*steryl alpha motif*). Les récepteurs ionotropes font aussi partie intégrante de ce réseau par l'intermédiaire d'une chaîne d'interactions successives Shank/GKAP/PSD-95/NMDAR (*figure 2*). L'interaction des protéines Shank et Homer suggère donc l'existence d'un lien entre les NMDAR et les protéines associées à Homer comme mGluR et le récepteur de l'IP3.

Les deux familles de protéines, Homer et Shank, paraissent ainsi jouer un rôle central dans l'organisation du domaine post-synaptique. Elles ont cependant des structures très différentes puisque Shank est constituée d'une juxtaposition de sites de liaison, tandis que Homer ne possède qu'un site liant différentes protéines de manière probablement exclusive.

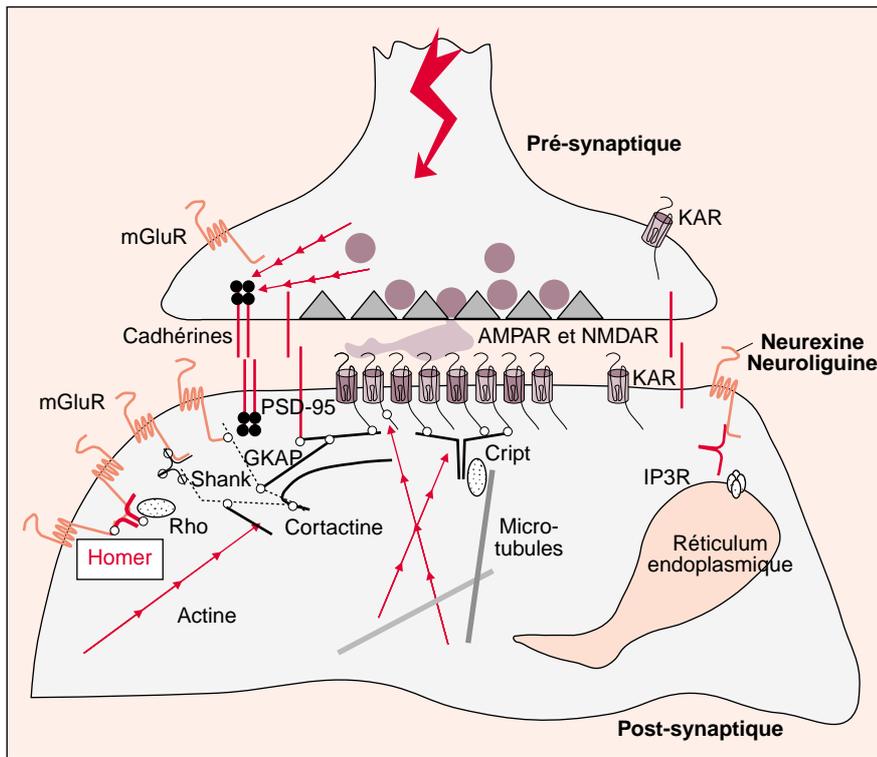


Figure 2. **Représentation schématique simplifiée de la structure d'une synapse glutamatergique.** Les vésicules synaptiques fusionnent avec la membrane présynaptique et libèrent le glutamate dans la fente synaptique. Le glutamate active les récepteurs ionotropiques (AMPA, NMDA, KAR) et métabotropiques (mGluR) présents majoritairement dans la membrane post-synaptique mais aussi dans la membrane présynaptique. La localisation des KAR est hypothétique à l'heure actuelle. Ces récepteurs interagissent avec de nombreuses protéines intracellulaires. Sur ce schéma sont principalement représentées les protéines qui participent au réseau de protéines contenant les mGluR. Homer et Shank interagissent directement avec les mGluR et peuvent également interagir entre elles. GKAP et PSD-95 font le lien avec les récepteurs NMDA. Certaines de ces protéines sont reliées au cytosquelette par l'intermédiaire d'adaptateurs : rho et la cortactine par exemple. Homer permet également la liaison entre les mGluR et les récepteurs de l'IP3. Des protéines d'adhérence, telles que les cadhérines ou la neurexine sont susceptibles de former le lien entre les membranes pré- et post-synaptiques. Les cercles noirs symbolisent les sites d'interaction connus.

Fonction potentielle d'Homer dans l'organisation membranaire des mGluR

En dehors des interactions biochimiques que ces protéines adaptatrices peuvent établir, on ne leur connaît pas encore de fonctions précises. Les protéines Homer semblent être impliquées dans l'agrégation des mGluR, processus qui requiert la présence des protéines Shank [8].

Nous avons observé que la surexpression simultanée d'Homer-1b et de

mGluR5 dans des cellules épithéliales conduit à la formation d'agrégats de mGluR5 dans la membrane plasmique. Ces agrégats ont une surface du même ordre de grandeur que celle de la synapse, soit quelques centaines de nm². De plus, ces agrégats non seulement sont extrêmement mobiles, mais leur structure est aussi dynamique puisque les récepteurs ne résident en fait dans un agrégat que pendant des périodes de quelques dizaines de secondes. Il semble donc que la composition en récepteurs des

densités synaptiques soit susceptible de se modifier rapidement par déplacement latéral de ceux-ci.

Rôle d'Homer dans le transport des mGluR

Les protéines Homer ont probablement un rôle important dans le transport des récepteurs mGluR vers la membrane plasmique, mais leur mécanisme d'action et les rôles relatifs des différents variants sont encore indéterminés.

Il semble en effet qu'une interaction entre mGluR1a et une protéine Homer soit nécessaire au transport du récepteur vers la surface cellulaire dans des cellules hétérologues [11]. De même, dans les neurones granulaires du cervelet, le transport du récepteur mGluR5 vers les extensions neuritiques requiert son interaction avec une protéine Homer [12]. Dans les cellules Hela, la surexpression de Homer 1b et de mGluR5 conduit à une rétention du récepteur dans le réticulum, probablement en rapport avec une interaction directe entre les deux protéines [13]. En revanche, la surexpression de Homer-1a dans les cellules HEK-293 induit une augmentation de l'expression à la membrane de mGluR1a qui serait alors lié à une forme longue de Homer [14].

Conclusions

Les protéines Homer font partie intégrante de réseaux structuraux et fonctionnels de la cellule. Les formes longues de Homer participent à l'organisation des récepteurs dans la synapse et à leur rétention dans le réticulum endoplasmique. Elles contrôlent également le couplage des récepteurs aux effecteurs cytoplasmiques. La protéine Homer-1a aurait un rôle double : elle permettrait le transport des récepteurs d'un compartiment cellulaire à un autre, en particulier vers la membrane cellulaire, mais serait impliquée aussi dans la désorganisation des récepteurs en interrompant les réseaux d'interactions protéiques, se comportant dans ce cas comme un dominant négatif de l'organisation de la synapse et de sa fonction. L'expres-

sion de Homer-1a est induite rapidement en réponse à des stimulations neuronales intenses lors des processus de potentialisation à long terme, et aussi lors des processus de pharmacodépendance (par exemple, l'administration de cocaïne). Il reste à déterminer laquelle des deux fonctions de Homer-1a, *a priori* opposées, est impliquée dans ces différentes situations.

D'une manière plus générale, on ne connaît pas encore le rôle précis des nombreuses protéines identifiées dans la PSD. Des résultats récents montrent un lien étroit entre l'activité de la protéine kinase dépendante du calcium et de la calmoduline (CaMK-II) et la localisation synaptique des récepteurs du glutamate [15]. La localisation synaptique de DLG (*disk large*, une protéine de structure de la drosophile contenant des domaines PDZ) dépend également de sa phosphorylation par la CaMK-II [16]. Les variations de la concentration intracellulaire de calcium et de l'activité de la CaMK-II jouent un rôle essentiel dans les processus de mémorisation et dans la maturation des synapses au cours du développement. On peut donc envisager l'existence d'une relation entre l'activité synaptique et le contrôle de la structure de la synapse, la phosphorylation des protéines de structure pouvant modifier leur capacité d'organisation des récepteurs dans la synapse ■

RÉFÉRENCES

1. Hsueh YP, Sheng M. Anchoring of glutamate receptors at the synapse. *Prog Brain Res* 1998; 116: 123-31.
2. O'Brien RJ, Lau LF, Huganir RL. Molecular mechanisms of glutamate receptor clustering at excitatory synapses. *Curr Opin Neurobiol* 1998; 8: 364-9.
3. Kato A, Ozawa F, Saitoh Y, *et al.* *vesl*, a gene encoding VASP/Ena family related protein, is upregulated during seizure, long-term potentiation and synaptogenesis. *FEBS Lett* 1997; 412: 183-9.
4. Brakeman PR, Lanahan AA, O'Brien R, *et al.* Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. *Nature* 1997; 386: 284-8.
5. Kato A, Ozawa F, Saitoh Y, *et al.* Novel members of the *vesl*/Homer family of PDZ proteins that bind metabotropic glutamate receptors. *J Biol Chem* 1998; 273: 23969-75.
6. Xiao B, Tu JC, Petralia RS, *et al.* Homer regulates the association of group I metabotropic glutamate receptors with multivalent complexes of homer-related, synaptic proteins. *Neuron* 1998; 21: 707-16.
7. Tu JC, Xiao B, Yuan JP, *et al.* Homer binds a novel proline-rich motif and links group I metabotropic glutamate receptors with IP₃ receptors. *Neuron* 1998; 21: 717-26.
8. Tu JC, Xiao B, Naisbitt S, *et al.* Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins. *Neuron* 1999; 23: 583-92.
9. Shiraishi Y, Mizutani A, Bito H, *et al.* Cupidin, an isoform of Homer/Vesl, interacts with the actin cytoskeleton and activated rho family small GTPases and is expressed in developing mouse cerebellar granule cells. *J Neurosci* 1999; 19: 8389-400.
10. Naisbitt S, Kim E, Tu JC, *et al.* Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. *Neuron* 1999; 23: 569-82.
11. Ciruela F, Soloviev MM, McIlhinney RA. Cell surface expression of the metabotropic glutamate receptor type Ialpha is regulated by the C-terminal tail. *FEBS Lett* 1999; 448: 91-4.
12. Ango F, Pin JP, Tu JC, *et al.* Targetting of mGluR5 by Homer1 in neurons. *Abstracts of the American Society of Neuroscience, Miami, 1999.*
13. Roche KW, Tu JC, Petralia RS, *et al.* Homer 1b regulates the trafficking of group I metabotropic glutamate receptors. *J Biol Chem* 1999; 274: 25953-7.
14. Ciruela F, Soloviev MM, McIlhinney RA. Co-expression of metabotropic glutamate receptor type Ialpha with homer-1a/Vesl-1S increases the cell surface expression of the receptor. *Biochem J* 1999; 341: 795-803.
15. Rongo C, Kaplan JM. CaMKII regulates the density of central glutamatergic synapses *in vivo*. *Nature* 1999; 402: 195-9.
16. Koh YH, Popova E, Thomas U, *et al.* Regulation of DLG localization at synapses by CaMKII-dependent phosphorylation. *Cell* 1999; 98: 353-63.

Daniel Choquet
Agnès Hémar

Physiologie Cellulaire de la synapse, Cnrs UMR 5091, Institut François-Magendie, rue Camille-Saint-Saëns, 33077 Bordeaux Cedex, France.