



HAL
open science

Dynamic control of the inhibitory synaptic transmission

Sabine Lévi

► **To cite this version:**

Sabine Lévi. Dynamic control of the inhibitory synaptic transmission: REGULATION DYNAMIQUE DE LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE INHIBITRICE. Neurobiologie. Sorbone Université, 2012. tel-03974297

HAL Id: tel-03974297

<https://hal.sorbonne-universite.fr/tel-03974297>

Submitted on 5 Feb 2023

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

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

**UNIVERSITE PIERRE ET MARIE
CURE PARIS VI**

**MEMOIRE D'HABILITATION
A DIRIGER DES RECHERCHES**

**REGULATION DYNAMIQUE DE LA TRANSMISSION
SYNAPTIQUE INHIBITRICE**

présenté par Sabine Lévi

Le 14 juin 2012 devant le jury composé de :

Alain Trembleau	Président
Laurent Groc	Rapporteur
Josef Kittler	Rapporteur
Pierre Jean Corringer	Rapporteur
Antoine Triller	Examineur
Bruno Gasnier	Examineur

Je tiens à remercier tous les collègues avec lesquels j'ai eu le grand plaisir de travailler depuis le début de ma carrière.

Je remercie en particulier Antoine Triller pour avoir cru en moi, m'avoir formé et m'avoir donné les moyens de réaliser de grands projets scientifiques qui ont imprégnés de manière déterminante ma vision de la recherche.

Je suis reconnaissante envers mes anciens collègues de l'ENS (Andréa Dumoulin, Catherine Béchade, Philippe Rostaing, Serge Marty, Marianne Renner, Valérie Robert, Jean Louis Bessereau) pour leur soutien et leurs encouragements depuis toutes ces années. A l'ENS, je remercie également Maxime Dahan pour m'avoir fait découvrir et partager la joie des expériences de suivi de particules uniques.

Je remercie chaleureusement Ann Marie Craig et Josh Sanes avec qui j'ai eu l'honneur de travailler en stage post-doctoral à Washington University (Saint Louis). J'ai particulièrement apprécié leur enthousiasme, leur clairvoyance et leur détermination scientifique.

Je tiens également à remercier l'ensemble de mes collègues de l'IFM pour leur aide et leur soutien. Je remercie en particulier Jean Christophe Poncer pour m'avoir associé à son aventure scientifique et sans qui le travail de ces 5 dernières années n'aurait pas été si agréable, enthousiasmant et riche.

Un grand merci aux jeunes scientifiques qui m'ont fait confiance pour leur initiation à la science, et tout particulièrement Walid Bouthour, Félix Leroy et Ingrid Chamma.

Enfin, je remercie Alain Trembleau, Laurent Groc, Josef Kittler, Pierre Jean Corringer, Antoine Triller et Bruno Gasnier pour avoir accepté de participer à mon jury d'HDR et pour l'intérêt porté à mon travail.

SOMMAIRE

Curriculum Vitae	1
Liste des publications	4
Liste des travaux de deuxième et troisième cycles encadrés	9
Liste des travaux publiés issus des encadrements ou co-encadrements	10
Vue générale du parcours scientifique	11
1. Formation et stabilisation des différenciations postsynaptiques inhibitrices	14
1.1. Introduction	14
1.2. Rôle de l'afférence présynaptique	16
1.3. Rôle de l'activité neuronale	17
1.4. Rôle de l'agrine et du complexe constitué de la dystrophine et des glycoprotéines associées	18
1.5. Rôle de la géphyrine	19
1.6. Connaissances actuelles	20
2. Dynamique membranaire des récepteurs inhibiteurs	22
2.1. Trafic intracellulaire et membranaire des récepteurs	22
2.2. Méthodes d'étude de la dynamique membranaire des récepteurs	23
2.2.1. Mesures d'ensemble	23
2.2.2. Mesures individuelles	24
2.2.3. Paramètres de diffusion quantifiés par l'approche du suivi de particules individuelles	25
2.3. Utilisation des quantum dots pour le suivi de récepteurs individuels	28
2.4. Régulation de la dynamique et de l'agrégation des récepteurs inhibiteurs	32
2.4.1. Implication des barrières de diffusion et des molécules d'ancrage au cytosquelette	32

2.4.2. Rôle de l'activité neuronale	37
2.4.2.1. Régulation homéostatique du RGly dans la moelle épinière	37
2.4.2.2. Dynamique membranaire du RGABAA et dépression à long terme des synapses inhibitrices de l'hippocampe	39
2.4.2.3. Une mutation de la sous-unité $\gamma 2$ du RGABAA liée à une forme d'épilepsie généralisée avec crises fébriles (GEFS+) altère la dynamique membranaire du RGABAA	42
2.5. Régulation dynamique du transporteur au chlore KCC2	47
2.5.1 KCC2 est agrégé près des synapses excitatrices et inhibitrices	48
2.5.2 Dynamique membranaire de KCC2	49
2.5.3. Régulation de la dynamique membranaire et de l'agrégation de KCC2 par l'excitation	56
2.5.4. Rôle de KCC2 dans les épines dendritiques	60
3. Développements futurs	64
3.1. Régulation locale de KCC2 par l'activité neuronale excitatrice	64
3.2. Régulation de KCC2 par la signalisation inhibitrice	65
3.3. Identification de nouveaux partenaires de KCC2	65
3.4. Modulation par l'adénosine de la transmission GABAergique	65
4. Bibliographie	67

CURRICULUM VITAE

Date de Naissance: 1^{er} Juin 1970

Lieu de naissance: Vitry/Seine, 94 France

Nationalité: Française

Situation familiale : Mariée, 2 enfants

Adresse professionnelle: Lab. Plasticité des réseaux corticaux et épilepsie
INSERM UMRS-839 - Institut du Fer à Moulin
17 rue du Fer à Moulin, 75005 Paris, France

Tel portable +33 6 88 03 35 09

Tel laboratoire: +33 1 45 87 61 19

Fax +33 1 45 87 61 10

email: Sabine.Levi@inserm.fr

ETUDES ET ACTIVITES DE RECHERCHE

Nov 2008-présent CR1 CNRS, laboratoire d'accueil : INSERM UMR-839, IFM, Paris (lab. JC Poncer)

2003-2008 CR1 CNRS Dpt SDV, section 26, laboratoire d'accueil : INSERM U789, ENS, Paris (directeur A Triller)

2002-2003 CR2 CNRS, INSERM U789, ENS, Paris (lab. A Triller)

1999-2002 Stage postdoctoral, laboratoire d'Ann Marie Craig, Dpt Anatomy & Neurobiology, Washington University, Saint Louis, MO, USA.

1995-1999 Thèse en Neurosciences - Université Paris VI
Directeur thèse : A. Triller, INSERM U497, ENS, Paris
Titre thèse : « Contrôle présynaptique de la distribution du récepteur de la glycine dans les neurones spinaux »

1994 DEA de Neurosciences - Université Paris VI

1993 Maîtrise de Biologie Cellulaire - Université Paris XII

BOURSES

- Feb 1999 - June 1999 Fondation pour la Recherche Medicale, France
- Sept 1998 - Jan 1999 Institut Lilly, France
- 1995 – 1998 M.R.T (Ministere de la Recherche et de la Technologie), France

FINANCEMENTS

ACI 2003 : Biologie du développement et physiologie intégrative, co-écrite avec S. Dieudonné (CNRS-ENS UMR8544). Titre projet : Le développement et la maturation des fonctions de la glycine dans le système nerveux central des vertébrés.

FRC 2004 : co-écrite avec S. Marty du laboratoire. Titre projet : Effets d'activités épileptiformes sur le développement des synapses hippocampiques

FRM 2008 : co-écrite avec Jean Christophe Poncer. Titre : Homéostasie du chlore dans les neurones hippocampiques matures et émergence d'un réseau épileptique (38 k€)

FRC 2009 : Titre projet: Membrane dynamics and function of the chloride/potassium KCC2 transporter at excitatory synapses (30 k€)

HONNEURS SCIENTIFIQUES

Prix de Physiologie Intégrative Janine Courier 2009 de l'Académie des Sciences

ENSEIGNEMENT

- 2011-2012 M2- UE NB004 "neurotransmission et signalisation normales et pathologiques" / "neurotransmission and signaling in physiology and disease" dans le Master BIP - parcours Neurosciences. Titre du cours: Structure and Dynamics of excitatory and inhibitory synapses in the central nervous system. (3h)
- 2006-2011 M2- Master Neurosciences Paris VI. Titre du cours : Structure et dynamique des synapses inhibitrices (2h)
- 2005 M2- Master Neurosciences Paris VI. Titre du cours : Organisation des échafaudages postsynaptiques (2h)
- M2- Génétique Paris VI. Titre du cours : Echafaudages postsynaptiques (2h)
- 2004 ENS-M2 : Du Neurone au système. Titre du cours : Biologie cellulaire des récepteurs (2h)
- 2001 Assistante au cours d'été de Cold Spring Harbor Laboratory: « Imaging structure and function in the nervous system », 23 Juil-12 Août, Cold Spring Harbor, NY. (1 mois)

1996 Encadrement de T.P. de Biologie Cellulaire pour la maîtrise de biologie cellulaire et physiologie, Université Paris XII (16h)

EXPERTISE

Ad hoc reviewer pour Journal of Neuroscience, Neuron, Journal Experimental Medicine, Neuroscience, Science signaling, PlosOne et the National Institute of Mental Health.

Examineur d'une thèse (2011) et de deux comités de mi-thèse (2012)

Comité d'évaluation des étudiants de l'ENP Paris (IFM 2012)

Comité d'évaluation MCU (Marseille 2012)

Organisation d'une journée "When mathematics meets biology" (IFM 2010)

Membre du comité du réseau d'imagerie cellulaire de l'UPMC (depuis 2010)

Membre du comité d'organisation du 22^{ème} congrès des canaux ioniques (2011, Giens, France)

Co-présidente du 23^{ème} congrès des canaux ioniques (2012, Giens, France)

Organisation du Journal Club de l'IFM (2011)

Organisation des séminaires de l'IFM (depuis 2011)

CONFERENCES SUR INVITATION

1. **S. Lévi.** "The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 mediates a crosstalk between excitatory and inhibitory transmission." Synapse mini-symposium, Bordeaux Neuroscience Institute, Bordeaux, 23 mars 2012.
2. **S. Lévi.** "The K/Cl cotransporter KCC2 influences postsynaptic AMPA receptor content and lateral diffusion in dendritic spines" GIN, Grenoble, 8 juin 2011.
3. **S. Lévi, A. Triller.** Formation of inhibitory synapses: a single particle study. IFM, Paris, Nov 2007.
4. **S. Lévi, A. Triller.** "Excitatory inputs control inhibitory receptor movements". New Insights on Developmental Neurobiology. Symposium in honour of Rosa Magda Alvarado-Mallart. April 14-18, 2004 Cadiz, Spain
5. **S. Lévi, A. Triller.** Glycine receptors dynamics studied with Quantum dots. Inserm U498, IFR100, Dijon. Nov 27 2003
6. **S. Lévi, A. Triller.** Single quantum dot imaging reveals multiple diffusive states of glycine receptors. Atelier sur imagerie par champ évanescent. ESPCI, Paris. Nov 21 2003

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

20 articles à comité de lecture (dont 1 publication dans Science notée comme 1 des 10 publications les plus importantes de l'année 2003 par le journal) ; 3 revues, 7 meeting reports et 8 chapitres de livres, 1457 total citations, H factor: 14, Nombre moyen de citations/article: 81

PUBLICATIONS

REVUES A COMITE DE LECTURE

1. C. Schweizer, M. Renner, H. Bannai, A. Triller and **S. Lévi**. Diffusion barriers constrain receptors at synapses. **PlosOne** (soumis).
2. I. Chamma, Q. Chevy, J C Poncer and **S. Lévi**. Role of the neuronal K-Cl co-transporter KCC2 in inhibitory and excitatory neurotransmission. (2012) **Front Cell Neurosci**. 6:5. Epub 2012 Feb 21.
3. G. Gauvain, I. Chamma*, Q. Chevy*, C. Cabezas, T. Irinopoulou, N. Bodrug, M. Carnaud, **S. Lévi** and JC Poncer. The neuronal K-Cl cotransporter KCC2 influences postsynaptic AMPA receptor content and lateral diffusion in dendritic spines. (2011) **Proc Natl Acad Sci U S A**. 108:15474-15479.
4. W. Bouthour*, F. Leroy*, C. Emmanuelli, M. Carnaud, M. Dahan, JC. Poncer and **S. Lévi**. A Human Mutation in Gabrg2 Associated with Generalized Epilepsy Alters the Membrane Dynamics of GABAA Receptors. (2011) **Cereb Cortex**. Epub 2011 Sep 9.
5. H. Bannai, **S. Lévi**, C. Schweizer, T. Inoue, T. Launey, V. Racine, J-B Sibarita, K. Mikoshiba and A. Triller. Activity-dependent tuning of inhibitory neurotransmission based on GABAAR diffusion dynamics. (2009) **Neuron** 62:670-682.
6. **S. Lévi**, C. Schweizer, H. Bannai, O. Pascual, C. Charrier, A. Triller. Homeostatic regulation of synaptic GlyR numbers driven by lateral diffusion. (2008) **Neuron** 59:261-273.
7. H. Bannai, **S. Lévi**, C. Schweizer, M. Dahan, A. Triller. Imaging the lateral diffusion of membrane molecules with quantum dots. (2006) **Nature protocols** 1:2628-33.
8. C. Charrier, M.V. Ehrensperger, M. Dahan, **S. Lévi**, A. Triller. Cytoskeleton regulation of glycine receptor number at synapses and diffusion in the plasma membrane. (2006) **J Neurosci**. 26:8502-11.
9. **S. Lévi***, SM Logan*, KR Tovar, AM Craig. Gephyrin is critical for glycine receptor clustering but not for the formation of functional GABAergic synapses in hippocampal neurons. (2004). **J Neurosci**. 24:207-217.
10. M. Dahan*, **S. Lévi***, C. Luccardini, P. Rostaing, B. Riveau, A. Triller. Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking. (2003) **Science** 302:442-445.
11. X Wang, J. A. Weiner, **S Lévi**, A. M. Craig, A Bradley, J.R. Sanes. Gamma protocadherins are required for survival of spinal interneurons. (2002) **Neuron** 36:843-854.
12. **S Lévi**, R. M. Grady, M. D. Henry, K. P. Campbell, J. R. Sanes, A M Craig. Dystroglycan is selectively associated with inhibitory GABAergic synapses but is dispensable for their differentiation. (2002) **J. Neuroscience**. 22:4274-4285.
13. D. Chesnoy-Marchais, **S. Lévi**, F. Acher. Glycinergic potentiation by some 5-HT(3) receptor antagonists: insight into selectivity. (2000) **Eur J Pharmacol**. 402:205-213.

14. Rao, **S. Lévi**. Birth of a synapse: not such long labor. (2000) **Neuron**.27:3-5.
15. A Dumoulin*, **S. Lévi***, B. Riveau, B. Gasnier, A. Triller. Formation of mixed glycine and GABAergic synapses in cultured spinal cord neurons, (2000) **Eur J Neurosci**. 12:3883-3892.
16. **S. Lévi**, D. Chesnoy-Marchais, W. Sieghart, A. Triller. Synaptic control of glycine-, GABA_A-receptors and gephyrin expression in cultured motoneurons, (1999) **J. Neuroscience** 19:7434-7349.
17. Dumoulin, P. Rostaing, C. Bedet, **S. Lévi**, MF. Isambert, JP. Henry, A. Triller, B. Gasnier. Presence of the vesicular inhibitory amino acid transporter in GABAergic and glycinergic synaptic terminal boutons, (1999) **J. Cell. Science** 112:811-823.
18. Dramsi, **S. Lévi**, A. Triller, P. Cossart. Entry of *Listeria monocytogenes* into neurons occurs by cell-to-cell spread: an *in vitro* study, (1998). **Infection and Immunity** 66: 4461-4468.
19. **Lévi**, C. Vannier, A. Triller. Strychnine-sensitive stabilization of postsynaptic glycine receptor clusters,(1998). **J. Cell. Science** 111: 335-345.
20. G. Escher, C. Béchade, **S. Lévi**, A. Triller. Axonal targeting of agrin in cultured rat dorsal horn neurons, (1996). **J. Cell. Science**. 109: 2959-2966.

*, *contribution égale*

CHAPITRES D'OUVRAGES EDITES

1. **S. Lévi**, M. Dahan, A. Triller. Imaging Single Receptors with Quantum Dots. **Imaging in Neuroscience and Development: A laboratory manual**. Edited by Rafael Yuste et Arthur Konnerth 2010, CSHL press. Nouvelle Version.
2. C. Bouzigues, **S. Lévi**, A. Triller, M. Dahan. Single Quantum Dot Tracking of Membrane Receptors. « **Quantum Dots: Applications in Biology** » edited by Charles Holtz and Marcel Bruchez, Methods in Molecular Biology, Humana Press (2006).
3. **S. Lévi**, A. Triller. Dynamic synapse in the light of receptor dynamics. « **The dynamic synapse : Molecular methods in ionotropic receptor biology** » edited by J. Kittler and S. Moss, CRC press, 2005.
4. C. Bouzigues, **S. Lévi**, A. Triller, M. Dahan. « Single quantum dot tracking applied to the study of GABA_A receptors in axonal growth cones» edited by **Humana Press**, 2005.
5. **S. Lévi**, M. Dahan, A. Triller. Single Quantum dot tracking of neuronal receptors. **Vision letter, Quantum Dot corporation**, January 2004.
6. **S. Lévi**, M. Dahan, A. Triller. Imaging Single Receptors with Quantum Dots. **Imaging in Neuroscience and Development: A laboratory manual**. Edited by Rafael Yuste et Arthur Konnerth 2004, CSHL press.
7. M. Dahan, **S. Lévi**, A. Triller. "Nanotechnologies : des nanocristaux pour explorer la dynamique des cellules nerveuses" **Universalia** 2003.

MEETING REPORTS

1. C. Bouzigues, **S. Lévi**, A. Triller, M. Dahan. Membrane dynamics of GABA receptors in the axonal growth cone studied by single quantum dots tracking. (2005) **Biophysical Journal** 88: 196A

2. C. Bouzigues, **S. Lévi**, A. Triller, M. Dahan. Tracking of single GABA receptors in nerve growth cones using organic dyes and quantum dots. (2004) **Biophysical Journal** 86: 602A.
3. Dahan M, **Lévi S**, Luccardini C, Rostaing P, Ehrensperger MV, Riveau B, Triller A. Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single quantum dot tracking. (2004) **Biophysical Journal** 86: 363A.
4. Dahan M, Humbert, M, Hanus, C, **Lévi S**, Vannier, C, Triller, A. Dynamics of Glycine and GABA receptors in spinal cord neurons studied by single molecule fluorescence imaging. (2003) **Biophysical Journal** 84: 123A.
5. Dumoulin A; Rostaing P; Bedet C, **Levi S**, Isambert MF, Henry JP, Triller A, Gasnier B. Presence of the vesicular inhibitory amino acid transporter in gabaergic and glycinergic synaptic terminal boutons. (1999) **Journal of Neurochemistry** 73: S6.
6. **Levi S**, Meier J, Vannier C, Triller A. Presynaptic innervation and accumulation of glycine receptors at central synapses. (1999) **Journal of Neurochemistry** 73: S106.
7. Bannai H, **Levi S**, Schweizer C, Launey, T, Mikoshiba K, Triller A. Activity-dependent regulation of GABA(A)R lateral diffusion. (2008) **Neuroscience Research** 61: S147.

COMMUNICATIONS A DES CONGRES

COMMUNICATIONS AFFICHEES

1. Chamma, C. Emmanuelli, M. Carnaud, J.C. Poncer, **S. Lévi**. Activity-dependent regulation of the neuronal chloride/potassium transporter kcc2 membrane dynamics. Annual meeting Society for Neuroscience, San Diego, CA, USA, 13-17 nov 2010.
2. **S. Lévi**, N. Le Roux, W. Bouthour, M. Carnaud & JC Poncer. Allosteric-state dependent modulation of gabaa receptor membrane dynamics and synaptic aggregation. 21ème Colloque Canaux Ioniques, Giens, 12-15 Septembre 2010.
3. Chamma, C. Emmanuelli, M. Carnaud, J.C. Poncer, **S. Lévi**. Membrane dynamics of the neuronal chloride/potassium transporter KCC2. FENS, July 2010.
4. W. Bouthour, F. Leroy, C. Emmanuelli, M. Carnaud, J.C. Poncer, **S. Lévi**. A mutation of GABRG2 linked to generalized epilepsy with febrile seizures alters the membrane dynamics of GABAA receptors. ENP meeting 2009
5. **S. Lévi**, F. Leroy, W. Bouthour, C. Emmanuelli, M. Carnaud, J.C. Poncer. Hyperthermia reveals alterations of synaptic aggregation and lateral mobility of GABAA receptor gamma2 subunit bearing a mutation associated with generalized epilepsy with febrile seizures. Annual meeting Society for Neuroscience, Chicago, Ill., Oct. 17-21 2009
6. **S. Lévi**, G. Gauvin, M. Carnaud, J.C. Poncer. Role of the neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2 in the maturation of spines and excitatory synapses in hippocampal cultured pyramidal neurons. Annual meeting Society for Neuroscience, Washington, DC, USA. Nov. 15-19 2008
7. H. Bannai, **S. Lévi**, C. Schweizer, T. Launey, K. Mikoshiba, A. Triller. Activity-dependent regulation of GABAAR lateral diffusion. Neuroscience meeting in Japan (July 2008).
8. C. Schweizer, H. Bannai, A. Triller, **S. Lévi**. GABAA receptor subtype-specific lateral diffusion in relation with their subcellular distribution. 5th Forum of European Neuroscience. Vienna, Austria, July 8-12 2006.
9. H. Bannai, C. Schweizer, A. Triller, **S. Lévi**. Synaptic activity dependent-regulation of the

- lateral diffusion of GABA_A receptors. 5th Forum of European Neuroscience. Vienna, Austria, July 8-12 2006.
10. **S. Lévi**, H. Bannai, C. Charrier, MV. Ehrensperger, B. Riveau, M. Dahan, A. Triller. Regulation of glycine receptor membrane diffusion by excitatory synaptic activity. 5th Forum of European Neuroscience. Vienna, Austria, July 8-12 2006.
 11. **S. Lévi**, C. Charrier, MV. Ehrensperger, B. Riveau, M. Dahan, A. Triller. Regulation of glycine receptor membrane diffusion. 4th Forum of European Neuroscience. Lisboa, Portugal, July 10-14 2004.
 12. **S. Lévi**, C. Charrier, M. V. Ehrensperger, C. Schweizer, B. Riveau, M. Dahan, and A. Triller. Control of inhibitory receptor lateral diffusion by excitatory input. 34th annual meeting Society for Neuroscience, San Diego, CA, USA. Oct 23-27 2004.
 13. **S. Lévi**, P. Rostaing, C. Luccardini, C. Hanus, B. Riveau, A. Triller and M. Dahan. Single molecule imaging reveals multiple diffusive states of glycine receptors. 6th IBRO world congress of Neuroscience. Prague, Czech Republic, July 10-15 2003.
 14. **S. Lévi**, S. M. Logan, K. R. Tovar, J. R. Sanes and A. M. Craig. Functional GABAergic synapses in mouse hippocampal neurons lacking gephyrin. 32nd annual meeting society for Neuroscience. Orlando, USA, 2002.
 15. **S. Lévi**, R. M. Grady, J-M. Fritschy, J. R. Sanes and A. M. Craig. Developmental analysis of the accumulation of α - and β - Dystroglycan at inhibitory synapses in the hippocampus and spinal cord. 30th annual meeting society for Neuroscience. New orleans, USA, Nov 4-9 2000.
 16. **S. Lévi**, H. Rasmussen, C. Vannier and A. Triller. Strychnine selectively destabilizes GlyR from postsynaptic GlyR- GABA_AR mosaics. 29th annual meeting society for Neuroscience. Miami, USA, Oct. 23-28 1999.
 17. Dumoulin, **S. Lévi**, B. Gasnier and A. Triller. Sequential expression of gephyrin, VIAAT, GlyR and GABA_AR in primary neuronal cultures. 4th annual meeting french society for Neuroscience. Marseille, France, May 25-28 1999.
 18. **S. Lévi**, J. Meier, C. Vannier and A. Triller. Presynaptic innervation and accumulation of glycine receptors at central synapses. 17th meeting of the ISN and ESN, Berlin, Germany, Aug 8-14 1999.
 19. Dumoulin, P. Rostaing, C. Bedet, **S. Lévi**, MF. Isambert, JP. Henry, A. Triller and B. Gasnier. Presence of the vesicular inhibitory amino acid transporter in GABAergic and glycinergic synaptic terminal boutons. 17th meeting of the ISN and ESN, Berlin, Germany, Aug 8-14 1999.
 20. Dumoulin, P. Rostaing, C. Bedet, **S. Lévi**, MF. Isambert, JP. Henry, A. Triller and B. Gasnier. Characterization of a vesicular inhibitory amino acid transporter. Cromaffin Cell Biology, Bergen, Germany, Aug. 22-27 1999.
 21. **S. Lévi** and A. Triller. Role of presynaptic innervation in the postsynaptic glycinergic and GABAergic differentiation in motoneurons. Club du motoneurone et de la locomotion. Saint-Pierre d'Oléron, France, Oct, 8-11 1998.
 22. D. Chesnoy-Marchais and **S. Lévi**. Fonction and pharmacological properties of GlyR on purified spinal motoneurons. Club du motoneurone et de la locomotion. Saint-Pierre d'Oléron, Oct 8-11 1998.
 23. **S. Lévi**, C. Vannier, D. Chesnoy-Marchais and A. Triller. Internalization of glycine receptor following chronic exposure to strychnine in cultured neurons. 27th annual meeting society

for Neuroscience. New Orleans, USA, Oct 25-30. 1997.

24. **S. Lévi**, C. Béchade and A. Triller. Glycine receptor is expressed at the surface of spinal cord astrocytes *in vitro*. 25th annual meeting society for Neuroscience. San Diego, USA, Nov 11-16. 1995.
25. Triller, **S. Lévi** and G. Escher. Presynaptic determinants of glycine receptor clustering. Symp. on Molecular Aspects of Synapse Formation. 1st Congress of the German Neuroscience Association. Berlin, Germany, Nov 24-27. 1995.
26. **S. Lévi**, C. Béchade and A. Triller. Role of presynaptic innervation on the expression of GlyR in spinal motoneurons. Club du motoneurone et de la locomotion. Les Embiez, France, Nov 27-30. 1994.

COMMUNICATIONS ORALES

1. Chamma, C. Emmanuelli, M. Carnaud, J.C. Poncer, **S. Lévi**. Activity-dependent regulation of the membrane dynamics of the neuronal chloride/potassium cotransporter KCC2. 21ème Colloque Canaux Ioniques, Giens, 12-15 Septembre 2010.
2. **S. Lévi**, W. Bouthour, F. Leroy, C. Emmanuelli, M. Carnaud, J.C. Poncer. A mutation of GABRG2 linked to generalized epilepsy with febrile seizures alters the membrane dynamics of GABA receptors. Abcam Satellite symposium of the Society for Neuroscience. Chicago, Ill., Oct. 16 2009
3. **S. Lévi**, C. Schweizer, H. Bannai, O. Pascual, C. Charrier, A. Triller. Homeostatic regulation of GlyR synaptic amount and lateral diffusion. Club du développement des réseaux neuronaux. IFM, Paris, June 13 2008.
4. **S. Lévi**, A. Triller. Implication de la neurotransmission excitatrice dans la dynamique membranaire du récepteur de la glycine. Club Exo-endocytose, Institut Curie, Paris. May 24 2004.
5. **S. Lévi**, C. Charrier, M. V. Ehrensperger, B. Riveau, M. Dahan, A. Triller. Control of inhibitory receptor lateral diffusion by the cytoskeleton. Satellite symposium of the Society for Neuroscience: the cytoskeleton and synaptic function. San Diego, CA, USA. Oct 20-22 2004.

LISTE DES TRAVAUX DE DEUXIEME ET TROISIEME CYCLES ENCADRES

Pour la plupart des encadrements ci-dessous, j'ai conceptualisé les projets, réalisé les expériences pilotes, formé les étudiants aux techniques d'imagerie cellulaire et moléculaire et j'ai encadré leur travail au jour le jour.

- 2011-2012 Erasmus/M1: Lucia del Valle (3 mois) "Implication du récepteur A2A dans la régulation de la transmission GABAergique".
- 2011 ENP: Andrew Sideris (2 mois) "Role du cytosquelette dans l'agrégation du transporteur K+/Cl- KCC2.
- 2010 L3 / UPMC: Rémi Lebigre (2 mois) "Regulation of KCC2 membrane dynamics and function".
- 2009-2012 Thèse: Ingrid Chamma (depuis octobre 2009) "Regulation of KCC2 membrane dynamics and function". (PNAS 2011, Frontiers Neuroscience 2012, manuscrit soumis prochainement à EMBO Journal)
- 2009 M1: Felix Leroy (4 mois) et Ecole de l'INSERM : Walid Bouthour (6 mois) "Effects of hyperthermia on synaptic aggregation and lateral mobility of GABAA receptors containing the GABARG2 mutation K289M associated with generalized epilepsy with febrile seizures" (Cerebral Cortex 2011).
- ENP: Kathy Matho (1 mois) "Effects of hyperthermia on synaptic aggregation and lateral mobility of GABAA receptors containing the GABARG2 mutation K289M associated with generalized epilepsy with febrile seizures". (Cerebral Cortex 2011).
- 2008 DUT / IUT d'Amiens: Natalia Bodrug (3 mois) "Subcellular distribution of KCC2 transporter in hippocampal cultured neurons ». (PNAS 2011)
- 2004-2008 Post-doctorant: Claude Schweizer (4 ans) "Synapse specificity and ionotropic receptor dynamics" (Nature Protocols ; Neuron 2009 ; manuscrit soumis à PlosOne,).
- 2005-2008 Post-doctorant: Hiroko Bannaï (3 ans) "Activity-dependent tuning of inhibitory neurotransmission based on GABAAR diffusion dynamics" (Nature Protocols 2006, Neuron 2008 ; 2009 ; manuscrit soumis à PlosOne).
- 2005 M2 – ENS: Cécile Charrier (3 mois) "Cytoskeleton regulation of glycine receptor number at synapses and diffusion in the plasma membrane" (J. Neuroscience 2006 ; Neuron 2008).
- 2004 M1 – ENS: Cécile Charrier (3 mois) "Cytoskeleton regulation of glycine receptor number at synapses and diffusion in the plasma membrane"
- 2003 L3 – Magistère de Biologie Biochimie - ENS: Cécile Charrier et Maud Poitrasson-Rivière (2 semaines) "Cytoskeleton regulation of glycine receptor number at synapses and diffusion in the plasma membrane".

LISTES DES TRAVAUX PUBLIES ISSUS DES ENCADREMENTS ET CO-ENCADREMENTS

1. C. Schweizer, M. Renner, H. Bannai, A. Triller and **S. Lévi**. Diffusion barriers constrain receptors at synapses. **PlosOne** (soumis).
2. I. Chamma, Q. Chevy, J C Poncer and **S. Lévi**. Role of the neuronal K-Cl co-transporter KCC2 in inhibitory and excitatory neurotransmission. (2012) **Frontiers in cellular Neuroscience**. [*Epub ahead of print*].
3. G. Gauvain, I. Chamma*, Q. Chevy*, C. Cabezas, T. Irinopoulou, N. Bodrug, M. Carnaud, **S. Lévi** and JC Poncer. The neuronal K-Cl cotransporter KCC2 influences postsynaptic AMPA receptor content and lateral diffusion in dendritic spines. (2011) **Proc Natl Acad Sci U S A**. 108:15474-15479.
4. W. Bouthour*, F. Leroy*, C. Emmanuelli, M. Carnaud, M. Dahan, JC. Poncer and **S. Lévi**. A Human Mutation in Gabrg2 Associated with Generalized Epilepsy Alters the Membrane Dynamics of GABAA Receptors. (2011) **Cereb Cortex** [*Epub ahead of print*].
5. H. Bannai, **S. Lévi**, C. Schweizer, T. Inoue, T. Launey, V. Racine, J-B Sibarita, K. Mikoshiba and A. Triller. Activity-dependent tuning of inhibitory neurotransmission based on GABAAR diffusion dynamics. (2009) **Neuron** 62:670-682.
6. **S. Lévi**, C. Schweizer, H. Bannai, O. Pascual, C. Charrier, A. Triller. Homeostatic regulation of synaptic GlyR numbers driven by lateral diffusion. (2008) **Neuron** 59:261-273.
7. H. Bannai, **S. Lévi**, C. Schweizer, M. Dahan, A. Triller. Imaging the lateral diffusion of membrane molecules with quantum dots. (2006) **Nature protocols** 1:2628-33.
8. C. Charrier, M.V. Ehrensperger, M. Dahan, **S. Lévi**, A. Triller. Cytoskeleton regulation of glycine receptor number at synapses and diffusion in the plasma membrane. (2006) **J Neurosci**. 26:8502-11.

VUE GENERALE DU PARCOURS SCIENTIFIQUE

Au cours de ma thèse et de mon stage post-doctoral, je me suis intéressée aux bases cellulaires et moléculaires de la formation des microdomaines postsynaptiques de récepteurs ionotropiques dans le système nerveux central. Mes modèles d'étude étaient la synapse inhibitrice mixte glycine/GABA de la moelle épinière et celle GABAergique de l'hippocampe. Mon travail a révélé l'importance de facteurs pré- et postsynaptiques dans ce processus. En utilisant des techniques d'imagerie et de culture cellulaire, j'ai montré au cours de ma thèse le rôle clef joué par l'afférence présynaptique et plus spécifiquement par l'activité synaptique dans la formation des agrégats postsynaptiques de récepteurs inhibiteurs. Puis, en stage post-doctoral, j'ai observé pour la première fois l'existence d'un complexe moléculaire transmembranaire, le complexe composé de la dystrophine et des glycoprotéines associées, aux synapses inhibitrices de l'hippocampe. Ce complexe est impliqué dans le maintien postsynaptique et/ou la régulation de la fonction de certains récepteurs du GABA de type A (RGABAA) à une sous-population de synapses GABAergiques plutôt que dans la formation des agrégats de récepteurs. J'ai ensuite montré que la géphyrine, protéine d'ancrage des récepteurs inhibiteurs au cytosquelette sous-synaptique, était dispensable pour la formation et le maintien de certains types de RGABAA.

A la suite de mon recrutement au CNRS en 2002, je me suis intéressée à la dynamique membranaire en temps réel des récepteurs inhibiteurs. J'ai participé à l'optimisation de la technique de suivi de particules uniques en utilisant les quantum dots comme sondes fluorescentes. Cela m'a permis de caractériser les processus diffusifs des récepteurs de la glycine (RGly) et du RGABAA dans les neurones spinaux et hippocampiques en culture. Ces travaux ont permis de généraliser aux récepteurs inhibiteurs l'importance du mécanisme de « diffusion-capture » dans la formation des microdomaines postsynaptiques de récepteurs. Puis, j'ai montré l'implication du cytosquelette et de l'activité excitatrice glutamatergique dans la régulation rapide de la dynamique membranaire des récepteurs inhibiteurs, corélée à des changements de l'agrégation postsynaptique des récepteurs. La régulation par l'activité de la dynamique membranaire des récepteurs inhibiteurs diffère en fonction du type cellulaire (moelle vs. hippocampe) et du récepteur concerné (RGly vs. RGABAA). Ces régulations avaient pour conséquences fonctionnelles de réguler de manière homéostatique la transmission glycinergique dans la moelle épinière et de faciliter la dépression à long terme des synapses

GABAergiques de l'hippocampe. Ces données montraient également qu'une régulation de la diffusion latérale des récepteurs est à l'origine de la plasticité synaptique.

J'ai rejoint l'Institut du Fer à Moulin en novembre 2007 où j'ai adressé la question des processus dynamiques de la transmission GABAergique dans un contexte d'épilepsie. Je me suis intéressée à la mutation ponctuelle K289M de la sous-unité $\gamma 2$ du RGABAA associée au syndrome GEFS+ (*Generalized Epilepsy with Febrile Seizures plus*). Ce syndrome à transmission autosomale dominante se caractérise par des crises fébriles chez l'enfant pouvant conduire à des crises afebriles chez l'adulte. Cette mutation augmente la désactivation du courant synaptique porté par le RGABAA. J'ai montré qu'une activité élevée des synapses excitatrices lors d'une hyperthermie facilite l'échappement du RGABAA muté des synapses inhibitrices, et par conséquent diminue le nombre de récepteurs postsynaptiques et l'efficacité de la transmission synaptique inhibitrice. La localisation de la mutation K289M dans la boucle extracellulaire entre les segments M2 et M3 de la sous-unité $\gamma 2$ du RGABAA suggèrait qu'un changement de la conformation du récepteur influe sur sa dynamique membranaire et son accumulation synaptique, en modifiant probablement son ancrage au cytosquelette. J'ai confirmé cette hypothèse en utilisant des modulateurs allostériques du RGABAA. Ce travail a révélé un mode d'action inattendu des benzodiazépines.

Ma récente activité de recherche porte sur le co-transporteur ionique neuronal K^+/Cl^- KCC2. Les RGABAA étant perméables aux ions Cl^- , l'homéostasie neuronale du Cl^- a un impact direct sur l'efficacité et la polarité de la transmission GABAergique. Dans les neurones en développement, une augmentation de l'activité de KCC2 conduit à une extrusion du Cl^- qui hyperpolarise progressivement le potentiel de réversion des courants médiés par le RGABAA (E_{GABA}). Dans les neurones matures, l'expression de KCC2 est rapidement et fortement diminuée dans des conditions pathologiques telles que l'épilepsie. Nous avons détecté les agrégats de KCC2 à la périphérie des synapses excitatrices et inhibitrices. Puis, nous avons démontré que l'agrégation de KCC2 fait appel à un mécanisme de « diffusion-capture ». Nos résultats ont également indiqué une relation privilégiée de KCC2 avec les synapses excitatrices formées sur les épines dendritiques. KCC2 seait ancré au cytosquelette d'actine à la périphérie des synapses excitatrices, via son domaine cytoplasmique carboxy-terminal, en interagissant avec la protéine 4.1N. Une activité élevée des synapses glutamatergiques diminuait rapidement le confinement, l'agrégation et l'activité de KCC2. Ainsi, une hyperactivité des synapses glutamatergiques affaiblit la signalisation GABAergique en diminuant la « diffusion-capture » de KCC2 et celle du RGABAA (voir ci-dessus).

Le confinement et l'agrégation de KCC2 dans les épines dendritiques près des synapses excitatrices suggère une interaction avec la signalisation glutamatergique. Nous avons examiné l'impact fonctionnel d'une suppression chronique de KCC2 dans les neurones d'hippocampes. Nos résultats ont révélé que KCC2, probablement au travers d'interactions avec le cytosquelette d'actine, contribue au confinement du récepteur AMPA (RAMPA) dans les épines dendritiques et par là-même influence l'efficacité des synapses excitatrices glutamatergiques. Nos résultats prédisent également que la suppression de KCC2 dans les neurones matures agit de manière homéostatique pour simultanément réduire l'efficacité de l'excitation et de l'inhibition synaptique.

1. Formation et stabilisation des différenciations postsynaptiques inhibitrices

1.1. Introduction

La plupart des récepteurs aux neurotransmetteurs sont concentrés dans la membrane postsynaptique en face du site de libération du neurotransmetteur. La première observation d'une telle localisation a concerné le récepteur de la glycine dans la moelle épinière [1]. Les récepteurs sont stabilisés dans la membrane postsynaptique grâce à des interactions avec des partenaires qui les relient au cytosquelette sous-membranaire. L'efficacité de la transmission synaptique repose sur le nombre de récepteurs présents dans la membrane postsynaptique. Il est donc crucial d'élucider les mécanismes de formation et de maintien des différenciations synaptiques.

Lors de mon travail de thèse, j'ai abordé la question des mécanismes impliqués dans l'établissement et le maintien de la complémentarité entre les éléments pré- et postsynaptiques. Mon modèle d'étude était la synapse inhibitrice de la moelle épinière. L'inhibition dans la moelle épinière dépend essentiellement de l'activité de deux récepteurs canaux, le récepteur de la glycine (RGly) et le récepteur de l'acide γ aminobutyrique de type A (RGABAA). Le RGly est un pentamère avec une stœchiométrie $3\alpha:2\beta$ ou $2\alpha:3\beta$ en fonction des publications [2,3]. Les RGly $\alpha\beta$ sont concentrés en face des terminaisons présynaptiques glycinergiques de la moelle [1]. Les RGABAA sont également des pentamères avec une stœchiométrie $2\alpha:2\beta:1\gamma$. Dans la moelle épinière, les sous-unités $\beta2/3$ et $\gamma2$ sont exprimées en combinaison avec les sous-unités $\alpha1$, $\alpha2$, $\alpha3$ ou $\alpha5$ [4]. Certains neurones expriment deux sous-unités α ($\alpha1$ et $\alpha5$ ou $\alpha2$ et $\alpha5$). Les sous-unités $\beta2/3$ et $\gamma2$ sont présentes dans les régions présynaptiques, postsynaptiques et extrasynaptiques. Les agrégats des sous-unités $\alpha1$ et $\beta3$ sont restreints aux synapses [5,6].

Le GABA et la glycine sont co-localisés dans de nombreuses terminaisons présynaptiques où ils sont chargés au sein des mêmes vésicules synaptiques par un transporteur unique nommé VIAAT (Vesicular Inhibitory Amino Acid Transporter) ou VGAT (Vesicular GABA Transporter) [7,8]. La co-libération de la glycine et du GABA a été démontrée aux synapses inhibitrices formées entre les interneurons et les motoneurons de la moelle épinière [9]. Dans ce cas, le RGly et le RGABAA colocalisent aux synapses inhibitrices [5,6,10,11,12]. J'ai estimé à ~70% la proportion d'agrégats de RGly synaptiques (sous-unités α/β) co-localisés avec les agrégats de

RGABAA (sous-unités $\beta 3$ et $\gamma 2$) dans les neurones de moelle épinière en culture [12,13], indiquant qu'en effet dans ce système la plupart des synapses sont mixtes glycine-GABA.

La géphyrine est la principale protéine de l'échafaudage synaptique inhibiteur aux synapses glycinergiques et GABAergiques. Elle interagit directement avec la sous-unité β du RGly [14] et avec les sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ du RGABAA [15,16,17,18]. Elle est requise pour former les agrégats postsynaptiques de RGly [19,20,21] et de certains RGABAA composés des sous-unités $\gamma 2$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ [21,22,23,24,25,26]. La géphyrine relie les récepteurs inhibiteurs au cytosquelette sous-membranaire en liant les microtubules [27] et plusieurs régulateurs de la dynamique des filaments d'actine tels que la profiline I et II [28] et certains membres de la famille Mena/VASP (*Mammalian enabled/Vasodilator-stimulated phosphoprotein*) [29]. L'oligomérisation de la géphyrine conduit à la formation d'un réseau hexagonal bidimensionnel qui serait à la base de l'organisation des domaines postsynaptiques inhibiteurs (**figure 1**).

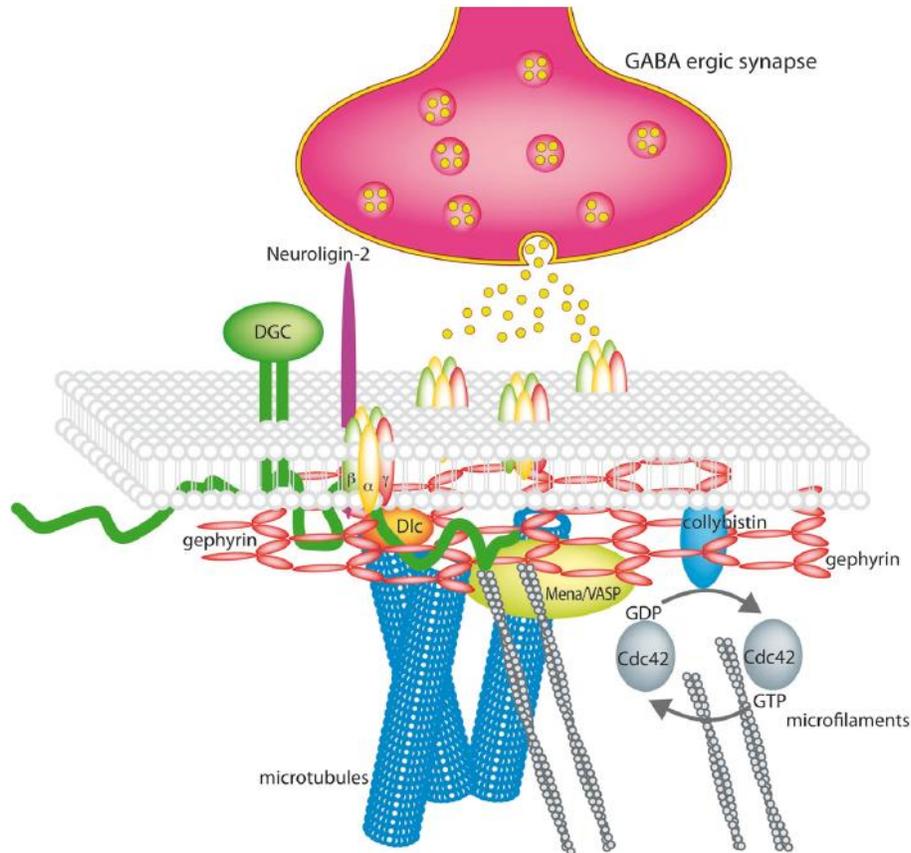


Figure 1. La synapse inhibitrice. Les RGly (non montré sur ce schéma) et les RGABAA sont stabilisés dans la membrane postsynaptique en interagissant avec la géphyrine sous-membranaire. La géphyrine interagit directement avec les microtubules et indirectement avec le cytosquelette d'actine par l'intermédiaire de la profiline I et IIa et Mena/VASP. La neurologine établit un lien trans-synaptique en interagissant avec la β -neurexine présynaptique. La NLG2 serait spécifique des synapses GABAergiques tandis que la NLG3 ou 4 serait impliquée aux synapses glycinergiques. La collybistine est associée à la membrane et interagit directement avec la géphyrine, la NLG2 et le RGABAA (sous-unité $\alpha 2$). Il n'y a pas un mais probablement plusieurs mécanismes moléculaires d'ancrage postsynaptique des différents sous-types de RGABAA qui feraient appel soit au complexe NLG2/collybistine/géphyrine, soit au complexe RGABAA/collybistine/géphyrine ou encore au complexe NLG2/DGC. L'agrégation du RGly est indépendante de la collybistine et requiert la NLG3 ou 4, et la géphyrine. D'après [30].

1.2. Rôle de l'afférence présynaptique

En analysant le déroulement temporel de la mise en place des différents constituants synaptiques dans les cultures de neurones spinaux qui différencient des synapses inhibitrices mixtes glycine/GABA, j'ai observé que l'accumulation postsynaptique de la géphyrine précédait celle de VIAAT dans les boutons synaptiques, qui elle-même devançait celle du RGly et du RGABAA dans la membrane postsynaptique. La formation des agrégats de RGly était contemporaine de l'établissement des synapses inhibitrices alors que celle de la géphyrine la devançait. Puis, j'ai

étudié l'influence du phénotype sécrétoire des terminaisons présynaptiques dans l'accumulation postsynaptique de la géphyrine, du RGly (sous-unités α/β) et du RGABAA (sous-unités $\beta 2/3$) sur des motoneurons spinaux purifiés en les cultivant en absence ou en présence d'une innervation GABAergique ou mixte glycine-GABA. Les innervations inhibitrices étaient apportées respectivement par des neurones des ganglions rachidiens ou des interneurons spinaux. J'ai observé que la distribution postsynaptique des agrégats de RGly et de RGABAA requiert la présence des afférences correspondantes. En revanche, l'accumulation postsynaptique de la géphyrine était indépendante de la nature du neurotransmetteur contenu dans l'élément présynaptique (i.e. Acétylcholine, glycine et/ou GABA). Nos résultats suggéraient que des mécanismes distincts contrôlent l'accumulation postsynaptique de la géphyrine et des récepteurs inhibiteurs. Un rôle de l'adhésion cellulaire dans la formation des agrégats de géphyrine était proposé à partir des observations que i) l'agrégation de la géphyrine devançait la différenciation de contacts synaptiques fonctionnels, ii) l'accumulation synaptique de la géphyrine était indépendante de la nature du neurotransmetteur contenu dans l'élément présynaptique, et iii) l'observation d'une accumulation de la géphyrine aux sites de contacts avec le support de culture [31]. En revanche, le fait que i) l'agrégation du RGly était contemporaine de la différenciation des synapses inhibitrices, et ii) que l'accumulation synaptique des récepteurs inhibiteurs dépendait de la nature du neurotransmetteur contenu dans l'élément présynaptique pointait vers une influence de la neurotransmission dans la formation et/ou la stabilisation des agrégats postsynaptiques des récepteurs inhibiteurs. Ces travaux ont donné lieu à 2 publications, dont 1 dans dans Journal of Neuroscience en 1999 [32] et 1 autre dans European Journal of Neuroscience en 2000 [13].

1.3. Rôle de l'activité neuronale

Je me suis alors intéressée aux mécanismes pouvant rendre compte de l'accumulation postsynaptique des récepteurs inhibiteurs et de la géphyrine. J'ai d'abord testé le rôle de l'activation des récepteurs dans leur stabilisation postsynaptique et dans celle de la géphyrine. J'ai effectué des expériences de blocage chronique de l'activité du RGly en exposant des cultures de neurones spinaux à un antagoniste sélectif du RGly, la strychnine. A la suite d'un traitement à la strychnine, le RGly n'était plus détecté sous forme d'agrégats à la membrane plasmique et était localisé dans des vésicules intracellulaires dans le corps cellulaire des neurones spinaux. La même observation était faite la même année par J. Kirsh et H. Betz [33]. Nous avons alors proposé que l'activation du RGly le stabilise dans la membrane

postsynaptique. Le blocage chronique par la tétrodotoxine (TTX) de la transmission synaptique dépendante du potentiel d'action n'altérerait pas la distribution subcellulaire du RGly. Ces données suggéraient que la libération vésiculaire spontanée de glycine suffit à activer le RGly et à le stabiliser dans la membrane postsynaptique. En revanche, la distribution subcellulaire de la géphyrine n'était pas modifiée par ces traitements. En absence de RGly, la géphyrine restait colocalisée au niveau postsynaptique avec le RGABAA (sous-unités $\beta 2/3$). Ces données suggéraient que la transmission synaptique glycinergique régle l'accumulation postsynaptique du RGly. Une autre explication à la redistribution du RGly à la suite d'une exposition à la strychnine serait que la liaison de l'antagoniste induit un changement conformationnel du RGly qui le déstabiliserait de la membrane plasmique et le conduirait à son internalisation. *Ce travail a été publié dans Journal of Cellular Science en 1998 [34].*

1.4. Rôle de l'agrine et du complexe constitué de la dystrophine et des glycoprotéines associées

A la fin de ma thèse, j'ai exploré un des mécanismes moléculaires pouvant rendre compte de la différenciation des synapses inhibitrices. Au moment où j'entreprenais cette recherche, les données de la littérature suggéraient un rôle de l'agrine dans la formation des synapses centrales. Ceci était basé sur les travaux effectués à la jonction neuro-musculaire qui montraient que l'agrine, libérée par le neurone, est requise pour former des agrégats de récepteur de l'Acétylcholine (RAch) dans le muscle en face des terminaisons nerveuses (références dans [35]). Au cours de ma thèse, j'ai montré que l'agrine est ciblée dans les boutons synaptiques des neurones des cornes dorsales de la moelle épinière déplétés en motoneurones et qu'elle est apposée aux agrégats de géphyrine. *Ce travail a été publié dans Journal of Cellular Science en 1996 [36].*

Au cours de mon stage postdoctoral, j'ai étudié l'implication des partenaires de l'agrine dans la différenciation des synapses inhibitrices de l'hippocampe. Dans le cerveau, les RGABAA les plus abondants sont composés des sous-unités $\alpha 1$, $\beta 2$ et $\gamma 2$ (références dans [37]). Les sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 2/3$ et $\gamma 2$ du RGABAA sont enrichies aux synapses tandis que les sous-unités $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ et δ sont principalement détectées dans la membrane extrasynaptique. Je me suis intéressée au complexe composé de la dystrophine et des glycoprotéines associées (DGC) dans la formation et le maintien des agrégats de RGABAA. Le DGC est un complexe multimoléculaire qui relie la matrice extracellulaire au cytosquelette [38,39]. Il est nécessaire

pour stabiliser les agrégats postsynaptiques de RACHs et pour la maturation morphologique de la jonction neuromusculaire (références dans [40]). Le DGC est constitué d'une sous-unité extracellulaire et d'une sous-unité transmembranaire, les α et β dystroglycans qui lient, au niveau intracellulaire l'utrophine et la dystrophine, une protéine du cytosquelette de la famille des α -actinines/ β -spectrines. Le DGC est relié à la matrice extracellulaire via l'agrine, la laminine et le perlecan et à l'élément présynaptique par sa liaison avec la neurexine transmembranaire. Des patients souffrant de dystrophies musculaires de type Duchenne ou Becker montrent des signes d'altération cognitive et des défauts d'apprentissage suggérant une fonction du complexe DGC dans le SNC [41].

J'ai montré que le complexe DGC est sélectivement associé à un sous-type de synapses inhibitrices GABAergiques et est exclu des synapses excitatrices glutamatergiques. Ceci correspondait à la première démonstration de l'existence d'un complexe transmembranaire aux synapses inhibitrices. Les dystroglycans forment des agrégats aux synapses inhibitrices après l'accumulation des vésicules synaptiques, de l'enzyme de synthèse du GABA (la GAD) et des RGABAA. En utilisant une approche d'inactivation génique, j'ai montré que la géphyrine, l'agrine, et la dystrophine n'étaient pas requises pour agréger les dystroglycans. Les dystroglycans n'étaient pas non plus nécessaires pour l'agrégation synaptique de la GAD, de la géphyrine et du RGABAA. Nous avons alors conclu que le DGC n'est pas essentiel à la synaptogénèse GABAergique et fonctionne plus probablement pour stabiliser ou moduler l'activité de certaines synapses inhibitrices. *Ce travail a été publié dans Journal of Neuroscience en 2002 [42].*

1.5. Rôle de la géphyrine

J'ai analysé les effets d'une perte de la géphyrine sur l'agrégation postsynaptique du RGABAA (sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\gamma 2$) et son impact fonctionnel sur la transmission GABAergique dans des neurones d'hippocampe cultivés à partir des souris déficientes pour la géphyrine. Au moment où j'entreprenais cette étude, il avait été montré que la suppression de l'expression de la géphyrine, par une approche utilisant des oligonucléotides anti-sens ou après inactivation génique, induisait une perte quasi-totale des agrégats de RGABAA contenant les sous-unités $\alpha 2$ et $\gamma 2$ [22,23]. Ceci suggérait que la géphyrine est indispensable à la formation des agrégats postsynaptiques de RGABAA. A la différence de ce que l'on pouvait prédire des données de la littérature, j'ai montré une diminution faible (de 23%) de l'amplitude des courants miniatures postsynaptiques inhibiteurs (mIPSCs) portés par le RGABAA sans changement de la fréquence de ces

événements synaptiques inhibiteurs dans les neurones d'hippocampe déficients pour le gène de la géphyrine. Ceci s'accompagnait d'une perte partielle (40%) de l'agrégation postsynaptique des sous-unités $\alpha 2$ et $\gamma 2$ du RGABAA. L'agrégation synaptique de la sous-unité $\alpha 1$ du RGABAA n'était en rien altérée en absence de la géphyrine. Ceci nous a permis de conclure que la géphyrine est partiellement requise pour l'accumulation postsynaptique de certains types de RGABAAs alors qu'elle est dispensable pour d'autres sous-types de récepteurs et plus particulièrement ceux contenant la sous-unité $\alpha 1$.

J'ai également montré que l'agrégation artificielle des RGABAA dans la membrane extrasynaptique, par un complexe anticorps primaire/anticorps secondaire, provoquait la redistribution de la géphyrine des synapses vers la région extrasynaptique qui colonisait progressivement les agrégats artificiels de RGABAA extrasynaptiques. Ces résultats montraient que le RGABAA est capable de recruter localement la géphyrine. Ainsi, le RGABAA et la géphyrine sont interdépendants pour leur agrégation.

J'ai également fait la première démonstration d'une agrégation du RGly à certaines synapses inhibitrices de l'hippocampe. A la différence du RGABAA, la géphyrine était indispensable à l'agrégation postsynaptique du RGly.

Le fait que seuls quelques sous-types de RGly (constitués des sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2$ ou $\alpha 3$ et β) sont possibles appelle à un mécanisme d'agrégation des RGly aux synapses glycinergiques, qui ferait intervenir la géphyrine. En revanche, l'existence de multiples isotopes de RGABAA (au moins une douzaine), qui diffèrent dans leur composition en sous-unités et dans leur localisation cellulaire (e.g. soma vs dendrite) et subcellulaire (synaptique vs extrasynaptique), sous-tend des mécanismes moléculaires hétérogènes de ciblage et d'agrégation des RGABAA aux synapses GABAergiques. *L'ensemble de ce travail est apparu dans Journal of Neuroscience en 2004 [21].*

1.6. Connaissances actuelles

Depuis ces travaux, des études ont révélées la contribution majeure d'un complexe moléculaire trans-synaptique constitué des molécules d'adhésion trans-membranaires, les neuroligines (NLG) postsynaptiques et les β -neurexines présynaptiques dans l'alignement des éléments pré- et post- synaptiques et dans la différenciation morphologique et fonctionnelle des synapses inhibitrices (références dans [43]) (**figure 1**). Les mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation des synapses glycinergiques et des différents sous-types de synapses

GABAergiques sont encore mal compris. Il a été proposé que la NLG3 ou la NLG4 soient préférentiellement impliquées dans la formation des synapses glycinergiques alors que la NLG2 participerait plus spécifiquement à la synaptogénèse GABAergique [44,45]. La NLG2 interagit avec la géphyrine et la protéine neuronale collybistine, un membre de la famille des GEFs (*Guanine nucleotide Exchange Factors*) qui active les RhoGTPases de type Cdc42 [46,47]. L'activation de la collybistine par la NLG2 faciliterait la translocation de la géphyrine à la membrane plasmique [46]. Le RGABAA constitué spécifiquement de la sous-unité $\alpha 2$ serait capable de se substituer à la NLG2 pour activer la fonction d'agrégation de la collybistine [16]. Cependant, le complexe NLG2/collybistine/géphyrine n'est pas impliqué dans l'agrégation postsynaptique de tous les sous-types de RGABAA. En effet, la collybistine est nécessaire, partiellement requise ou dispensable aux synapses GABAergiques formées respectivement, sur les cellules de la région CA1 de l'hippocampe, les cellules de Purkinje du cervelet ou les interneurons à parvalbumine de la région CA1 de l'hippocampe [48,49]. De plus, la collybistine n'est pas requise pour former les agrégats de géphyrine et de RGly aux synapses glycinergiques de la moelle épinière et du tronc cérébral [48]. Cela signifie donc que soit une ou d'autres GEFs compensent l'absence de la collybistine soit la collybistine ne contribue pas à l'agrégation de la géphyrine à certaines synapses inhibitrices. Le complexe DGC en interagissant d'une part avec la neurexine et d'autre part avec la NLG2 via la protéine S-SCAM (*synaptic scaffolding molecule*) [50] stabiliserait certaines différenciations postsynaptiques inhibitrices en absence de la géphyrine [51]. L'activité synaptique participerait à la synaptogénèse inhibitrice en régulant la formation et le maintien du complexe neurexine-neurologine aux synapses en développement ou aux synapses déjà formées [52,53].

2. Dynamique membranaire des récepteurs inhibiteurs

Les molécules qui constituent la synapse sont en perpétuels mouvements [54]. Je me suis intéressée au rôle de la diffusion latérale des récepteurs dans leur accumulation aux synapses dans un contexte physiologique et pathologique. J'ai également abordé les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation rapide de la dynamique et de la densité des récepteurs synaptiques au cours des phénomènes de plasticité synaptique.

2.1. Trafic intracellulaire et membranaire des récepteurs

Le trafic cellulaire des récepteurs implique le mouvement des récepteurs de leur site de synthèse intracellulaire à la membrane plasmique, vers les synapses puis vers les sites de recyclage puis de dégradation (**figure 2**). Les récepteurs sont insérés dans la membrane plasmique par exocytose et internalisés par endocytose clathrine-dépendante. Des travaux utilisant des récepteurs étiquetés avec des sites clivables (thrombine) ou avec la pHluorine (une GFP qui fluoresce uniquement à pH neutre c'est-à-dire quand la protéine est tournée vers la face extracellulaire de la membrane) ont montré que les récepteurs néosynthétisés (e.g. RAMPA, RGly et RGABAA) sont insérés dans la membrane extrasynaptique [55,56,57]. Les récepteurs extrasynaptiques ont d'abord été détectés en électrophysiologie [58]. Puis le développement de la *freeze-fracture* en microscopie électronique a permis de visualiser et de quantifier l'abondance des récepteurs extrasynaptique et synaptique (e.g. RAMPA extrasynaptique, $19 \pm 2 /\mu\text{m}^2$; synaptique, $910 \pm 36 /\mu\text{m}^2$ dans les cellules de Purkinje du cervelet) [59]. La densité en récepteurs synaptique est de 10 à 50 fois supérieure (en fonction du type de récepteur concerné) à celle des récepteurs extrasynaptiques. Malgré cette différence de densité et parce que la membrane extrasynaptique occupe 98% de la surface totale de la membrane [60], les récepteurs extrasynaptiques constituent le réservoir principal en récepteurs membranaires.

Les ARNm de certaines sous-unités de récepteurs et la machinerie de synthèse protéique ont été localisés à proximité des synapses [56,61,62]. Néanmoins, l'insertion directe des récepteurs dans la différenciation postsynaptique n'a jamais été observée et est peu probable car elle nécessiterait une réorganisation structurale de la densité postsynaptique. Les récepteurs synthétisés sous les synapses sont donc insérés dans la membrane péri-synaptique et/ou extrasynaptique. Après insertion dans la membrane extrasynaptique ou péri-synaptique, les

récepteurs rejoignent les synapses par diffusion latérale pour être capturés par l'échafaudage sous-membranaire. Puis, les récepteurs sont internalisés pour être soit recyclés vers la membrane plasmique soit dirigés vers les lysosomes pour être dégradés [63]. L'internalisation n'a jamais lieu au sein de la densité postsynaptique mais plutôt en périphérie ou à distance de la densité postsynaptique [64,65,66]. Les récepteurs sortent donc de la densité postsynaptique par diffusion latérale avant d'être internalisés.

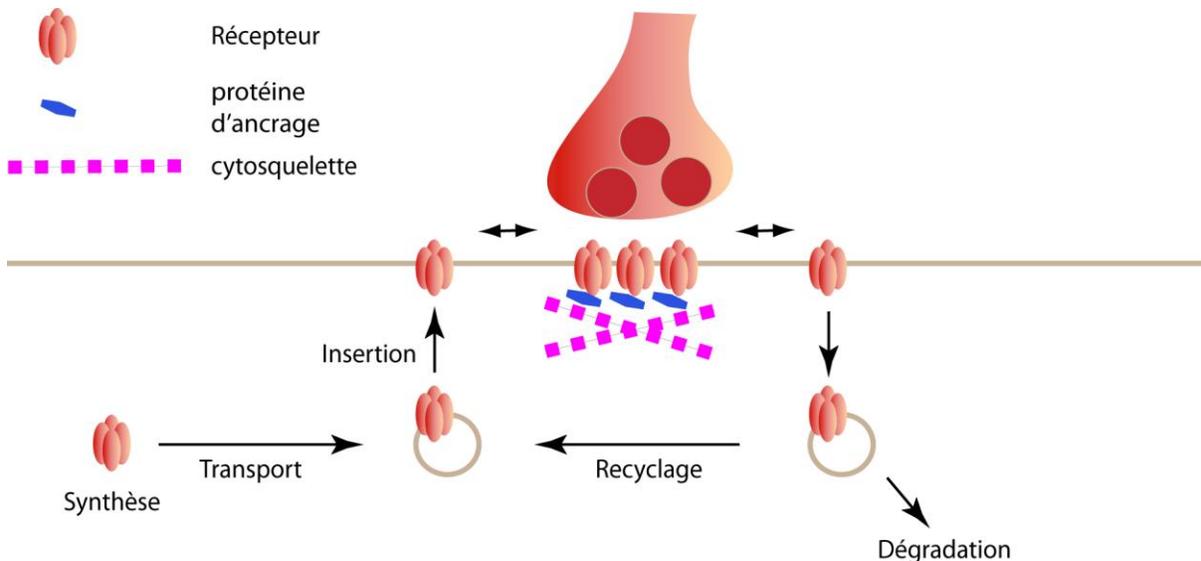


Figure 2. Trafic intracellulaire et membranaire des récepteurs. Les récepteurs néosynthétisés sont insérés dans la membrane extrasynaptique et/ou péri-synaptique. Puis, les récepteurs pénètrent la densité postsynaptique par diffusion latérale où ils sont capturés et stabilisés par l'échafaudage moléculaire sous-synaptique. Les interactions avec l'échafaudage sous-synaptique sont transitoires. Les récepteurs synaptiques sont alors libres de s'échapper de la synapse par diffusion latérale pour être ensuite internalisés, recyclés vers la membrane plasmique ou dégradés dans les lysosomes.

2.2. Méthodes d'étude de la dynamique membranaire des récepteurs

IL y a deux méthodes pour estimer la diffusion des protéines transmembranaires. La première est basée sur une mesure d'ensemble (électrophysiologie, FCS et FRAP) et la seconde sur une mesure individuelle (SPT, photothermie, sptPALM, uPAINT).

2.2.1. Mesures d'ensemble

Les récepteurs peuvent être identifiés à la surface du neurone par des méthodes d'étiquetage électrophysiologique. Dans ce cas, une sous-population de récepteurs de surface est localement et irréversiblement bloquée par un antagoniste (e.g. MK801 pour les récepteurs

NMDA et sodium (2-sulfonatoethyl) methanethiosulfonate (MTSES) pour le RGABAA portant une mutation V257C sur sa sous-unité $\alpha 1$ [58,67]). La diffusion des récepteurs est alors estimée par la récupération fonctionnelle au cours du temps.

Le FRAP ou *fluorescence recovery after photobleaching* est basé sur des techniques de marquage fluorescent couplées à de la microscopie sur cellule vivante. Les molécules d'intérêt sont identifiées avec un fluorophore couplé à un ligand ou à un anticorps spécifique, ou fusionné génétiquement à la protéine d'intérêt. Une excitation lumineuse intense avec un laser permet de photoblanchir les fluorophores sur une petite région de la cellule et le retour de fluorescence est déterminé au cours du temps. Le retour de fluorescence dépend de la diffusion de la protéine fluorescente à partir de la zone entourant la région photoblanchie. Le retour de fluorescence donne une estimation moyenne de la mobilité d'un ensemble de protéines. La proportion de retour de fluorescence donne accès à la population de molécules mobiles vs stables mais ne donne pas accès à la diversité des comportements individuels [68]. Néanmoins, cette technique a permis la première démonstration en 1976 de l'existence d'une population mobile et immobile de récepteurs membranaires Ceci a été obtenue en suivant le retour de fluorescence des récepteurs nicotiques de l'ACh (RACh) à la surface des fibres musculaires [69]. Puis, Young et Poo ont proposé ~10 ans plus tard le modèle de « diffusion capture » dans lequel les récepteurs sont piégés au niveau des contacts synaptiques [70].

Le FCS ou *fluorescence correlation spectroscopy* analyse des fluctuations de la concentration de particules fluorescentes (molécules) en solution. Plus la molécule diffuse vite plus son temps de résidence dans le volume excité est faible. Cette technique utilise des fluorophores organiques et la résolution temporelle est limitée par la photodestruction du fluorochrome. Tout comme le FRAP, le FCS donne accès à des mesures d'ensemble.

2.2.2. Mesures individuelles

Le SPT ou *single particle tracking* est basé sur des techniques de marquage fluorescent couplées à de la microscopie sur cellule vivante. Cette technique permet l'enregistrement en temps réel des mouvements de molécules individuelles ou d'un petit nombre de molécules. Dans cette approche, une sonde submicrométrique fluorescente (bille de latex couplée à des fluorochromes organiques, un fluorochrome organique comme une cyanine, un quantum dot) est attachée à un domaine extracellulaire de la protéine d'intérêt par l'intermédiaire d'un ligand spécifique (**figure 3A**). Le ligand peut être un anticorps dirigé contre un épitope de la protéine

d'intérêt endogène (e.g. RGly, [12,71]; RGABAA, [12,72]) ou contre une étiquette ajoutée génétiquement à la protéine d'intérêt (e.g. myc, [73,74]; GFP, [75]). D'autres ligands sont également utilisés tels que la biotine, la bungarotoxine, le tris-NTA (*Tris-Nitrilotriacetic Acid*) ou le TMR (*Tetramethylrhodamine*). Dans ce cas, le ligand reconnaît respectivement les étiquettes AP (*acceptor peptide* de 15 acides aminés, site de reconnaissance de la biotine ligase), BBS (*bungarotoxin binding site* de 13 acides aminés, site de liaison de la bungarotoxine), des histidines ou des cystéines [76,77,78,79,80,81].

La photothermie fait appel à la détection photothermique de particules d'or de petites tailles (1-5 nm) qui peuvent être utilisées pendant des temps très longs (20 minutes) [82]. Cette méthode nécessite néanmoins une instrumentation beaucoup plus complexe que l'imagerie à fluorescence classique.

La méthode du sptPALM ou *single particle tracking photoactivated localization microscopy* est basée sur la détection de molécules photoactivables comme la PA-GFP ou EosFP fusionnées à des protéines d'intérêt (références dans [83]). La méthode d'uPAINT utilise un marquage stochastique en continu d'une protéine d'intérêt endogène reconnue par un ligand couplé à un fluorochrome [84]. Le sptPALM et uPAINT permettent d'obtenir un grand nombre de trajectoires ($50/\mu\text{m}^2$) avec une précision nanométrique, ce qui permet de cartographier la dynamique d'une protéine dans la membrane. L'inconvénient de ces méthodes est néanmoins que les trajectoires sont de courtes durées (3s) et ne permettent donc pas d'accéder à certains paramètres de diffusion comme le temps de résidence d'un récepteur dans une synapse.

2.2.3. Paramètres de diffusion quantifiés par l'approche du suivi de particules individuelles

Les trajectoires sont reconstruites à partir des enregistrements en temps réel en utilisant des programmes d'analyse d'image écrits sous MatLab [85]. Sur chaque image du film, le centre de gravité du marqueur fluorescent (cyanine, GFP ou QD) est déterminé en ajustant la PSF (*Point Spread Function*) à un modèle gaussien (**figure 3A**). Les trajectoires synaptiques sont séparées des extrasynaptiques après superposition des trajectoires avec les marqueurs synaptiques (**figure 3B**). Les synapses sont identifiées avec des marqueurs présynaptiques (e.g. FM-4-64, mitotracker, Rhodamine 1-2-3) ou postsynaptiques (GFP ou DsRed géphyrine, PSD-95, Homer-1c).

La diffusion des molécules transmembranaires est gouvernée par la diffusion Brownienne. Les forces de viscosité dominant le mouvement. Dans ce cas, la masse et l'inertie de la molécule peuvent être négligées. On peut alors prédire la probabilité d'une molécule membranaire de se trouver à une position donnée et à un moment donné. Le mouvement des molécules membranaires se conforme alors à la loi spatiale et temporelle de Fick. Au cours du temps, chaque molécule individuelle aura tendance à se déplacer de plus en plus loin de son point de départ. Ceci s'exprime par le déplacement quadratique moyen (MSD) (**figure 3C**). La MSD est calculée selon l'équation suivante :

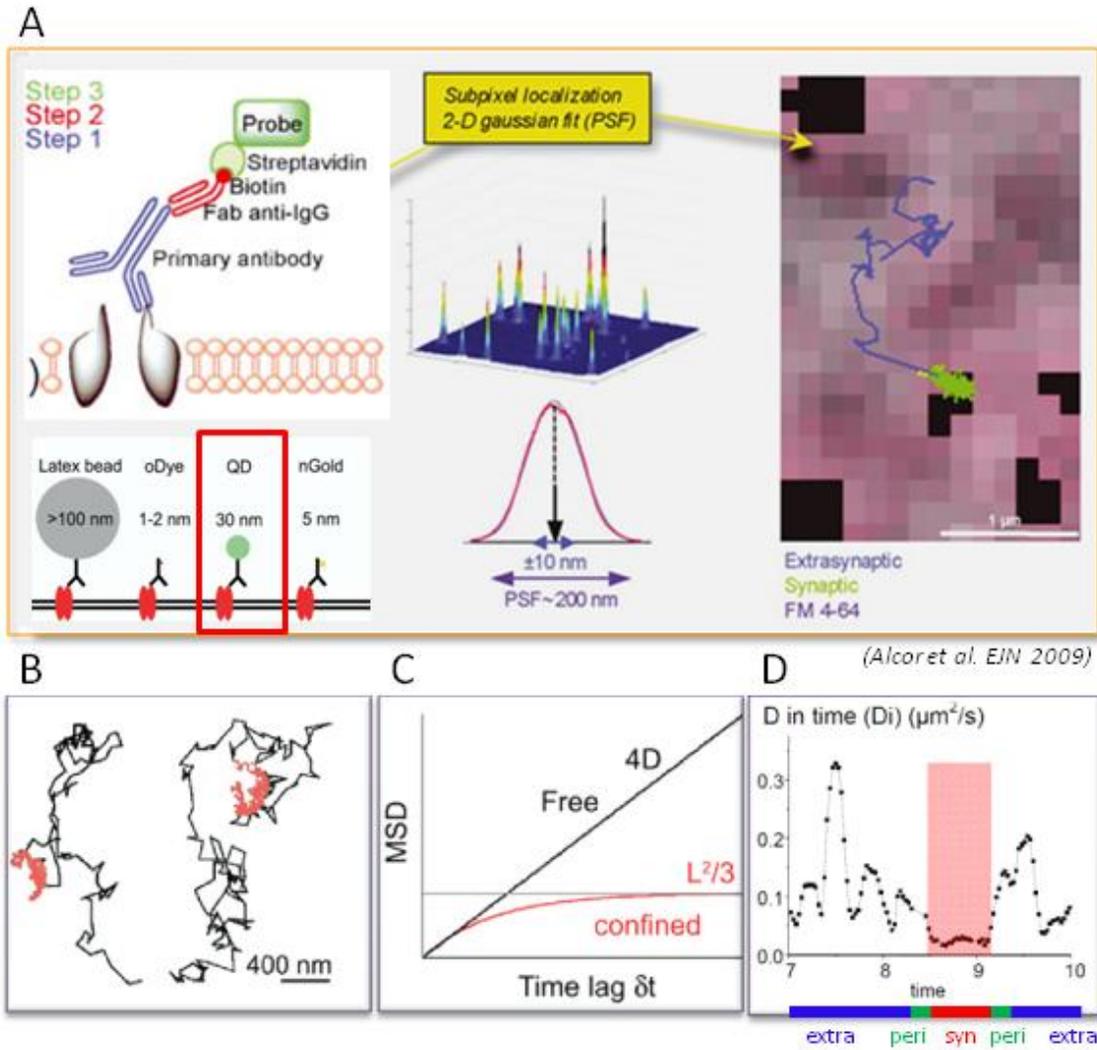
$$MSD(ndt) = \frac{1}{N-n} \sum_{i=1}^{N-n} ((x_{i+n} - x_i)^2 + (y_{i+n} - y_i)^2) dt$$

Dans cette équation, x_i et y_i sont les coordonnées d'un objet sur l'image i , N le nombre total d'images qui composent la trajectoire, dt est le temps d'acquisition de chaque image et ndt est l'intervalle de temps sur lequel le déplacement est calculé [86]. Pour une diffusion Brownienne simple et bidimensionnelle, la MSD est proportionnelle au temps. Si la relation tend vers un plateau, la diffusion est confinée et la taille du domaine de confinement est L . Plus la valeur de L est petite, plus la molécule est confinée. Si la MSD en fonction du temps augmente plus rapidement que dans une diffusion simple, alors la diffusion est dirigée [86].

La taille du domaine de confinement est estimée d'après l'équation suivante :

$$MSD(ndt) = \frac{L^2}{3} \left(1 - \exp\left(-\frac{12Dndt}{L^2}\right) \right) + 4D_{mac}ndt$$

Dans cette équation, L^2 est la surface dans laquelle la diffusion est confinée et D_{mac} est le coefficient de diffusion calculé sur une longue durée [87]. La taille du domaine de confinement est définie comme le côté d'un carré dans lequel la diffusion est confinée [87]. Pour les détails, voir [74]. La pente de la MSD permet de calculer le coefficient de diffusion D (bonne approximation à partir des 4 premiers points de la courbe) [74]. Le temps de résidence synaptique est défini comme la durée de détection d'une molécule aux synapses pendant un enregistrement divisé par le nombre de sorties [71,74] (**figure 3D**).



(Alcoret et al. EJN 2009)

Figure 3. Etude de la diffusion latérale des protéines membranaires en SPT. **A**, En haut, la protéine d'intérêt est reconnue grâce à un complexe moléculaire constitué d'un anticorps primaire, un anticorps secondaire (fragment Fab) biotinylé liant avec une forte affinité une streptavidine couplée à une sonde fluorescente. En bas, exemples de complexes ligand-sonde pour le SPT avec de gauche à droite, le complexe anticorps-bille de latex, le complexe anticorps-fluorochrome organique (tel que la cyanine, bungarotoxine-cyanine, protéine fluorescente GFP), le complexe anticorps-QD et le complexe anticorps-particule d'or. Au milieu, Le signal de chaque molécule unique (PSF) est ajusté à une courbe gaussienne. L'excellent rapport signal sur bruit du QD permet de déterminer la localisation d'une molécule avec une précision de 10 nm. A droite, exemple de trajectoire reconnectée de RGABAA suivi avec un complexe anticorps-QD. Le récepteur explore une surface plus restreinte de la membrane synaptique (trajectoire verte) que de la membrane extrasynaptique (trajectoire bleue). **B**, Chaque trajectoire reconnectée est superposée à un marqueur synaptique afin de séparer les parties synaptiques (rouge) et extrasynaptiques (noir) de la trajectoire. **C**, Le déplacement quadratique moyen (MSD) en fonction du temps est calculé pour les parties synaptiques (rouge) et extrasynaptiques (noire) de chaque trajectoire. La relation est linéaire (noir) pour un QD extrasynaptique caractérisé par un mouvement Brownien ou atteint un plateau pour un QD confiné dans une synapse (rouge). **D**, Coefficient de diffusion instantané au cours du temps pour un QD qui diffuse dans la membrane synaptique (rouge) et extrasynaptique (noir). Dans cet exemple, le QD entre et sort de la synapse pendant l'enregistrement. Le temps passé à la synapse correspond au temps de résidence d'un QD à une synapse. D'après [88].

2.3. Utilisation des quantum dots pour le suivi de récepteurs individuels

L'étude de la mobilité des récepteurs uniques a longtemps été limitée par le manque de traceurs appropriés. Les premières études en SPT ont été effectuées avec des billes recouvertes d'anticorps dont la taille (500 nm) interdisait l'accès à la fente synaptique (~30 nm). Ces études ont montré que les récepteurs alternent entre des périodes de diffusion libre et des périodes de confinement [73,89]. Puis, des fluorophores organiques, de taille plus petite (5 nm) ont été utilisés mais leur photo-destruction rapide (~5 s) limitait leur utilisation pour le SPT. Afin d'optimiser cette approche, j'ai développé l'utilisation des Quantum Dots (QDs) pour le suivi des RGly individuels en SPT (collaboration avec Maxime Dahan, Laboratoire Kastler-Bossel CNRS-ENS UMR 8552). Nous avons utilisé les QDs commerciaux. Ce sont des cristaux semi-conducteurs constitués d'un cœur de CdSe, recouvert d'une enveloppe de ZnS qui augmente les propriétés optiques du QD. Les QDs sont « passivés » par des polymères d'acide polyacrilique qui le rendent hydrophile, assurent la spécificité du marquage et évitent leur auto-agrégation qui dégrade le rendement quantique. Enfin, ils sont fonctionnalisés par conjugaison à des biomolécules (e.g. 4-10 streptavidine ou fragments Fab, protéine A, biotine, etc). Après « passivation » et « fonctionnalisation », les QDs atteignent une taille de 15-25 nm. Grâce à leur brillance et leur exceptionnelle photostabilité, ces cristaux semi-conducteurs permettent de suivre en épifluorescence standard les molécules uniques pendant des temps longs (heure).

Dans un premier temps, j'ai utilisé les QDs comme sonde pour le SPT afin d'étudier la diffusion latérale du RGly dans les neurones spinaux en culture. Cela m'a permis d'observer i) des récepteurs diffuser librement et rapidement dans la membrane extrasynaptique alors qu'ils étaient ralentis et confinés aux synapses, ii) des récepteurs entrer et sortir des synapses, iii) des récepteurs détectés à une même synapse pendant des temps très longs (i.e. toute la durée de l'enregistrement, 30 min dans nos conditions expérimentales), et iv) des récepteurs échanger de synapses. L'ensemble de ces résultats a permis la première observation de la diffusion des récepteurs au sein des synapses et a permis d'établir de manière non équivoque l'importance du mécanisme de « diffusion-capture » dans la formation des microdomaines postsynaptiques de récepteurs.

J'ai ensuite étudié la mobilité du RGABAA aux synapses mixtes des neurones spinaux en culture. Cela m'a permis de caractériser pour la première fois les propriétés diffusives du RGABAA en SPT et ainsi de montrer que la « diffusion-capture » est un mécanisme général impliqué dans l'accumulation postsynaptique des récepteurs inhibiteurs. J'ai également observé

que les propriétés diffusives du RGly et du RGABAA sont similaires dans les régions extrasynaptiques mais que le RGly est plus confiné que le RGABAA aux synapses mixtes.

L'utilisation des QDs plutôt que des fluorochromes organiques pour le SPT présentait de nombreux avantages. Ils permettaient l'utilisation d'une même sonde en microscopie optique à épifluorescence et en microscopie électronique. Ainsi, l'entrée dans la fente synaptique du complexe RGly-QD a été confirmée en microscopie électronique. Deuxièmement, la brillance des QDs supérieure à celle des fluorochromes organiques (cy3, cy5 etc) facilitait l'acquisition des images en utilisant une simple lampe à fluorescence plutôt qu'un laser pour exciter la sonde et augmentait la précision de la mesure des coefficients de diffusion. En effet, la grande brillance des QDs comparée à celle des fluorochromes organiques (e.g. cy3, gfp etc) permet d'augmenter le rapport signal sur bruit et de ce fait la précision de pointage (15 vs 40 nm) [68,90]. Enfin, le temps de vie considérable des QDs comparé à celui des fluorochromes organiques implique que les comportements des QDs individuels sont moyennés sur des temps beaucoup plus longs. Ceci influence la distribution des coefficients de diffusion. *Ce travail a fait l'objet d'une publication dans Science en 2003 [90]. Ce travail m'a également permis de participer à la rédaction de plusieurs chapitres de livre et à un article de méthode paru dans Nature Protocols [91].*

Conclusions

Cette approche est maintenant utilisée en routine dans de nombreux laboratoires et a permis l'étude de la dynamique membranaire d'un grand nombre de protéines membranaires dont plusieurs récepteurs tels que le récepteur CB1 [92], les récepteurs $\beta(1)$ - and $\beta(2)$ -adrénergiques [93], le récepteur cholinergique neuronal (sous-unité $\alpha 3$ [94] et sous-unité $\alpha 7$ [94,95]), le récepteur cholinergique musculaire [96], le récepteur purinergique P2X(2) [97], le récepteur AMPA [79,98,99,100,101,102,103], le récepteur NMDA [99,104,105,106], le RGly [12,71,90,107,108,109], le RGABAA [12,17,72,97,110,111,112], et le récepteur métabotrope du glutamate (mGluR5) [113]. D'une manière générale, ces études ont montré que :

- les récepteurs diffusent plus librement et rapidement dans la membrane extrasynaptique alors qu'ils sont plus lents et confinés aux synapses.
- la surface occupée par la membrane extrasynaptique est supérieure à celle occupée par les synapses. Ainsi, le temps que les récepteurs passent dans la membrane extrasynaptique est plus grand que le temps passé dans les synapses [73,89].

- pour les récepteurs extrasynaptiques, les coefficients de diffusion fluctuent sur plusieurs ordres de grandeur ($10^{-4} <D> 10^1 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$). Ces valeurs sont inférieures à celles obtenues dans les membranes artificielles. Cela reflète l'hétérogénéité de la membrane due aux interactions transitoires avec les molécules d'échafaudage, à l'association aux radeaux lipidiques, aux obstacles rencontrés (intracellulaires et membranaires), à l'organisation des récepteurs en agrégats de petite taille [74,108].
- Les récepteurs inhibiteurs (RGly et RGABAA) sont plus lents et plus confinés que les récepteurs excitateurs (RNMDA et RAMPA) dans les membranes extrasynaptiques et synaptiques [114,115]. Pour une même famille de récepteurs (inhibiteurs ou excitateurs), les RGly et les RNMDA sont respectivement plus lents et plus confinés que les RGABAA et les RAMPA [114,115]. Ceci reflète une grande hétérogénéité des propriétés d'interaction des récepteurs avec l'échafaudage moléculaire.
- L'utilisation des QDs pour le SPT est limitée par l'encombrement stérique. Le complexe (Ac-Fab-QD) formé par l'anticorps primaire (~12 nm), l'anticorps secondaire (fragment Fab, ~5 nm) et un QD fonctionnalisé (~15-20 nm) atteint 30-35 nm. La taille de ce complexe est supérieure à celle de l'épaisseur de la fente synaptique (20-25 nm en microscopie électronique). Le complexe Ac-Fab-QD pourrait donc gêner la diffusion des molécules membranaires dans l'espace confiné de la fente synaptique. Nous avons montré que le complexe Ac-Fab-QD est détecté au cœur des synapses en microscopie électronique et que l'utilisation d'une sonde plus petite (~3 nm) et monovalente (fragment Fab de l'anticorps primaire couplé directement au cy3) ne modifie pas significativement le coefficient de diffusion moyen du RGly synaptique [90]. De même, la proportion de récepteurs immobiles et le coefficient de diffusion médian (D_{median}) du RAMPA aux synapses ne sont pas altérés par la taille et la valence de la sonde [79]. L'utilisation de complexes de grande taille n'est cependant pas sans conséquence sur la diffusion synaptique des récepteurs. En effet, l'entrée dans la fente synaptique est limitée pour les complexes de grande taille [79,116] et l'utilisation d'un plus petit complexe favorise la visualisation d'une sous-population de récepteurs à diffusion rapide [79].
- L'utilisation des QDs pour le SPT est également limitée par la stoechiométrie du couplage. Avec les méthodes de couplage utilisées couramment, le complexe sonde-ligand peut se lier à plusieurs protéines cibles. En effet, un QD commercial est conjugué à ~4-10 streptavidines (ou Fab) et par conséquent a la possibilité de se lier à plusieurs anticorps primaires. D'autre part, l'anticorps primaire est divalent et peut, dans certains cas, lier deux protéines cibles. Une agrégation artificielle des protéines d'intérêt pourrait activer les voies

de signalisation intracellulaires et réduire significativement la mobilité des molécules membranaires [86].

Perspectives

Des améliorations des QDs (réduction de la taille et obtention d'une stœchiométrie 1 sonde : 1 molécule) sont nécessaires pour l'optimisation de l'étude des processus diffusifs des récepteurs dans des systèmes de monocouches cellulaires (culture cellulaire) mais également dans des systèmes intégrés (tranches ou *in vivo*). A l'origine, un QD a un diamètre de 4-9 nm. C'est l'étape de « passivation » du QD correspondant à l'ajout de la couche amphiphile qui augmente considérablement (x4) sa taille [117,118]. La couche amphiphile des QDs commerciaux consiste en une coquille de polymères de peptides et de PEG (Polyethylene glycol) directement couplée à la streptavidine tétramérique (4-10 streptavidines par QD). Le diamètre final du QD atteint après fonctionnalisation ~15–20 nm. Le défi est donc de diminuer l'épaisseur de la couche amphiphile sans augmenter les interactions non spécifiques des QDs avec les cellules et l'auto-agrégation des QDs qui dégrade le rendement quantique. Des QDs plus performants ont été générés dans le laboratoire de MG Bawendi et utilisés par AY Ting. Le couplage du QD à des polymères d'acide dihydrolipoïque (pour chélater l'enveloppe ZnCdS) et à 8 groupements PEG (pour réduire le marquage non spécifique) et à une streptavidine monovalente (pour le couplage à une biomolécule) permet de réduire d'un facteur ~2 le diamètre hydrodynamique du QD (~11 nm) et par là même de rendre le QD monovalent [116]. L'utilisation des ces QDs augmente la pénétration de la sonde dans la fente synaptique et prévient l'agrégation artificielle des protéines membranaires.

2.4. Régulation de la dynamique et de l'agrégation des récepteurs inhibiteurs

2.4.1. Implication des barrières de diffusion et des molécules d'ancrage au cytosquelette

Le ralentissement et le confinement transitoire des récepteurs aux synapses est du au moins en partie aux interactions réversibles avec les molécules d'ancrage au cytosquelette. Cela a initialement été démontré pour le RGly et la géphyrine [73], puis pour mGluR et homer [89] ainsi que pour RAMPA et le complexe stargazin/PSD-95 [98]. La diffusion des récepteurs aux synapses dépend également de la présence d'obstacles et de barrières. Les barrières sous-membranaires ou « corrals » sont constituées d'une forte densité de molécules cytoplasmiques du cytosquelette ancrées à la membrane. Les protéines transmembranaires ne peuvent s'échapper des « corrals » que lors d'une dissociation transitoire des barrières [119]. Cependant, ce modèle ne rend pas compte de toutes les contraintes à la diffusion car les protéines ou les phospholipides à ancrage glycosylphosphatidylinositol (GPI), sans domaine intracellulaire, sont également compartimentalisés [75,120]. Une seconde source de barrière de diffusion est générée par la présence d'obstacles immobilisés dans la membrane en interagissant avec le cytosquelette. Dans ce cas, la diffusion des protéines est gênée par encombrement stérique. La diffusion des protéines est également limitée par une association transitoire avec des microdomaines lipidiques spécialisés ou « radeaux lipidiques » enrichis en certains lipides, récepteurs et molécules de signalisation [121,122]. Enfin, des complexes moléculaires volumineux [123] et l'asymétrie des molécules [124] contribuent également à l'hétérogénéité de la membrane plasmique et à limiter la diffusion des protéines transmembranaires.

Au cours de l'encadrement des stages de L3-M1-M2 de Cécile Charrier, je me suis intéressée au rôle du cytosquelette dans la diffusion membranaire du RGly. Le RGly interagit par l'intermédiaire de la géphyrine avec les microtubules [27] et avec l'actine via la profiline I et II [28] et certains membres de la famille Mena/Vasp [29]. Nous avons observé que la dépolymérisation du cytosquelette d'actine par la latrunculine A (3 μ M) ou des microtubules par le nocodazole (10 μ M) diminuaient l'immunoréactivité du RGly et de la géphyrine aux synapses inhibitrices de la moelle épinière. Ces traitements avaient des effets très différents sur les propriétés diffusives du RGly. Bien que le temps de résidence du RGly aux synapses fût fortement réduit après la dépolymérisation de l'actine filamenteuse et des microtubules, la

diffusion du RGly était préférentiellement régulée par les microtubules dans la membrane extrasynaptique et par l'actine dans la membrane postsynaptique. Ainsi, les échanges en récepteurs entre les compartiments extrasynaptiques et synaptiques sont rapidement régulés en changeant les propriétés de diffusion dans l'un ou l'autre de ces compartiments. Par conséquent, les échanges de récepteurs entre les compartiments extrasynaptiques et synaptiques dépendent de la viscosité apparente de la membrane et de la stabilisation des récepteurs aux synapses.

Nos résultats montraient également que la perte des RGly synaptiques précédait celle de la géphyrine. Ceci suggèrait que les RGly quittent la synapse avant la désorganisation de l'échafaudage moléculaire sous-synaptique. Bien que l'accumulation des récepteurs inhibiteurs aux synapses requiert la géphyrine [19,20,21,22,23,25], les récepteurs aident réciproquement à stabiliser la géphyrine sous la membrane synaptique. Il y a donc réciprocity de stabilisation des récepteurs et des molécules d'échafaudage.

L'augmentation de diffusion du RGly dans la membrane extrasynaptique à la suite d'une dépolymérisation des microtubules suggèrait une association transitoire du récepteur extrasynaptique avec le cytosquelette. En accord avec ce résultat, 40% des RGly extrasynaptiques qui diffusent sont associés à la géphyrine [74]. En fait, le RGly est associé à la géphyrine dans les vésicules golgiennes peu après sa synthèse [125], puis il est transporté le long des microtubules et inséré dans la membrane extrasynaptique lié à la géphyrine.

L'ensemble de ce travail a fait l'objet d'une publication dans Journal of Neuroscience en 2006 [71].

Au cours de l'encadrement du stage post-doctoral de Claude Schweizer, j'ai abordé la question du rôle des barrières de diffusion dans le tri et l'accumulation synaptique des récepteurs. Cette question a été adressée pour la sous-unité $\gamma 2$ du RGABAA et la sous-unité GluA2 du RAMPA aux synapses inhibitrices et excitatrices dans des cultures primaires de neurones d'hippocampe. En comparaison avec la diffusion dans la membrane extrasynaptique, la sous-unité $\gamma 2$ du RGABAA était significativement ralentie (**figure 4A**) et confinée (**figure 4B**) aux deux types de synapses. Des résultats comparables étaient obtenus avec la sous-unité GluA2 du RAMPA (non montré). Nous avons vérifié que les contraintes à la diffusion du RGABAA aux synapses

excitatrices ne dépendaient pas de la méthode de détection des QDs. Des expériences de FRAP de la sous-unité $\gamma 2$ recombinante couplée à la pFluorine (SEP-GABA_AR $\gamma 2$) ont montré que la population stable des récepteurs membranaires (qui ne s'échangeaient pas pendant la durée de l'enregistrement) était deux fois plus importante aux synapses excitatrices (~30%) que dans la membrane extrasynaptique (~15%) (**figure 4D-E**). Ces résultats suggéraient que les barrières de diffusion réduisent significativement la diffusion des récepteurs aux synapses. Des résultats comparables ont été obtenus pour les lipides associés (cholera toxine et glycoposphatidylinositol-anchored green fluorescent protein) ou non (Phosphatidylethanolamine) aux radeaux lipidiques [75,120]. Bien que non enrichis aux synapses, la diffusion latérale de ces lipides était diminuée aux synapses comparée aux régions extrasynaptiques.

Nos résultats ont révélé que le coefficient de diffusion ne permet pas de ségréger les récepteurs aux synapses appropriées. En effet, les coefficients de diffusion de la sous-unité $\gamma 2$ du RGABAA n'étaient pas significativement différents aux synapses excitatrices et inhibitrices (**figure 4A**). De même, le coefficient de diffusion de GluA2 était similaire aux synapses excitatrices et inhibitrices. En revanche, la sous-unité $\gamma 2$ du RGABAA était moins confinée (**figure 4B**) et s'échappait plus rapidement (**figure 4C**) des synapses excitatrices que des synapses inhibitrices. Réciproquement, la sous-unité GluA2 du RAMP2 était plus confinée et résidait plus longtemps aux synapses excitatrices qu'aux synapses inhibitrices. Ces résultats montraient que le confinement et le temps de résidence mais pas le coefficient de diffusion sont associés au tri synaptique des récepteurs.

Pourquoi un récepteur n'est-il pas significativement plus ralenti dans la différenciation postsynaptique lui correspondant? Comparé au RGly, le RGABAA se lie avec une faible affinité à la géphyrine [17,18]. Le récepteur s'associe et se dissocie donc très rapidement de l'échafaudage moléculaire sous-synaptique. Ainsi, le ralentissement du RGABAA induit par son interaction avec la géphyrine aux synapses inhibitrices ne serait pas très différent de celui occasionné par les barrières de diffusion ou les obstacles rencontrés aux synapses excitatrices. Le passage du RGABAA d'un site de liaison à l'autre augmenterait néanmoins le confinement et le temps de résidence du RGABAA dans la différenciation postsynaptique inhibitrice.

Conclusions

- Nos résultats et ceux obtenus sur les lipides [75,120] indiquent qu'une diminution de la diffusion dans les synapses ne conduit pas nécessairement à une accumulation synaptique. C'est la capture par l'échafaudage sous-synaptique qui assure le tri et l'accumulation des récepteurs aux synapses spécifiques. A l'état stationnaire, les récepteurs sont constamment échangés entre les compartiments extrasynaptiques et synaptiques. Le nombre de récepteurs aux synapses dépend de l'abondance et de l'affinité des molécules d'échafaudage. En absence d'une interaction avec l'échafaudage sous-synaptique, le flux net des molécules à la synapse est nul [68].
- Les barrières de diffusion permettraient néanmoins dans certains cas une accumulation des protéines. Par exemple, les sous-unités $\alpha 6$, $\gamma 2$, et $\beta 2/3$ du RGABAA sont concentrées aux synapses inhibitrices mais également à certaines synapses excitatrices du cervelet [126,127]. Dans ce cas, le RGABAA colocalise avec le RAMP A. Une accumulation des RGABAA aux synapses excitatrices permettrait à certaines synapses d'utiliser simultanément la signalisation GABAergique et glutamatergique sans co-libération des deux transmetteurs. Le RGABAA aux synapses excitatrices serait activé par « spillover » c'est-à-dire par diffusion de GABA libéré par les terminaisons présynaptiques aux synapses inhibitrices voisines [126,128]. Ainsi, les barrières de diffusion pourraient avoir une implication fonctionnelle dans la transmission synaptique.
- Le RGABAA et le RAMP A résident respectivement 2.4 et 2.5 s aux synapses excitatrices et inhibitrices, un temps 3-5 fois plus long que les lipides associés ou non aux radeaux lipidiques (0.5-0.8 s, [75]). Les récepteurs sont donc plus contraints par les barrières de diffusion que les lipides. Ceci est probablement dû au fait que les récepteurs mais pas les lipides ont un domaine intracellulaire qui, en interagissant avec le cytosquelette sous-membranaire, gêne la diffusion des récepteurs. Les récepteurs sont donc freinés par les corrals et les piquets alors que la diffusion des lipides est plus spécifiquement limitée par les piquets.

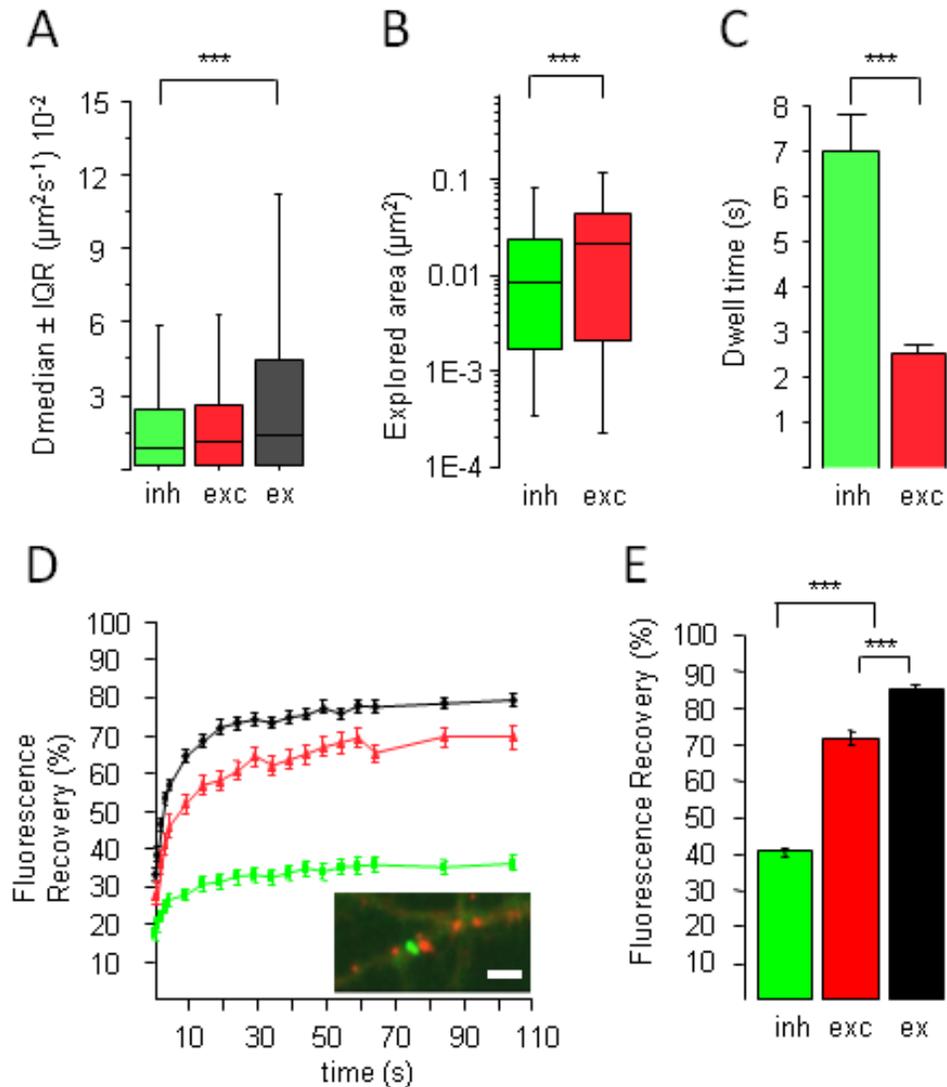


Figure 4. Comparaison des propriétés de diffusion de la sous-unité $\gamma 2$ du RGABAA aux synapses inhibitrices et excitatrices. **A**, Réduction significative du coefficient de diffusion (mediane +/- IQR 25-75%) de la sous-unité $\gamma 2$ du RGABAA aux synapses inhibitrices (vert) et aux synapses excitatrices (rouge), comparée à la diffusion du récepteur dans la membrane extrasynaptique (noir). **B-C**, En revanche, le RGABAA est plus confiné (**B**, la surface explorée est plus petite, mediane +/- IQR 25-75%) et réside plus longtemps (**C**, moyenne +/- SEM) aux synapses inhibitrices (vert) qu'aux synapses excitatrices (rouge). **D-E**, FRAP de SEP-GABAAR $\gamma 2$ aux synapses inhibitrices (vert), aux synapses excitatrices (rouge), et dans la membrane extrasynaptique (noir). Les résultats sont exprimés sous forme de courbes normalisées de retour de fluorescence en fonction du temps (**D**) et de pourcentage de retour de fluorescence (**E**, moyenne +/- SEM). Insert en **D**, portion de dendrite d'un neurone exprimant les protéines recombinantes SEP-GABAAR $\gamma 2$ (vert) et homer1c-DsRed (rouge). Barre de calibration, 1 μ m. A-B, Kolmogorov-Smirnov test *** $p < 0.001$. C-E, Mann-Whitney rank sum test *** $p < 0.001$.

2.4.2. Rôle de l'activité neuronale

La plasticité synaptique désigne les changements rapides et durables de l'efficacité de la transmission synaptique en réponse à des modifications de l'activité. Plusieurs paramètres peuvent être modifiés : i) la densité et l'activité des terminaisons présynaptiques, ii) le nombre et l'efficacité des récepteurs postsynaptiques, et iii) l'excitabilité du neurone [129]. Il existe la plasticité « hebbienne » dont la potentialisation à long terme (LTP) et la dépression à long terme (LTD) font partie et la plasticité homéostatique. La LTP et la LTD correspondent respectivement à un renforcement ou un affaiblissement de la transmission synaptique. La plasticité synaptique est considérée comme la base cellulaire des processus d'apprentissage (références dans [130]). La plasticité homéostatique tend à maintenir la balance entre excitation et inhibition et donc la stabilité des réseaux [131,132]. La mise en place de la plasticité « hebbienne » est plus rapide que la plasticité homéostatique (minutes-heures vs plusieurs heures-jours). Les phénomènes de plasticité synaptique sont connus depuis longtemps aux synapses excitatrices [133] mais n'ont été que plus récemment étudiés aux synapses inhibitrices [134,135,136]. Les phénomènes de plasticité des synapses GABAergiques ont été décrits dans l'hippocampe, le cortex, le cervelet, l'olive latérale supérieure, l'amygdale et le pont (références dans [135]).

2.4.2.1. Régulation homéostatique du RGly dans la moelle épinière

J'ai voulu savoir si la diffusion latérale des récepteurs inhibiteurs aux synapses inhibitrices mixtes de la moelle épinière était régulée par l'activité neuronale. J'ai montré une régulation homéostatique de la diffusion latérale et du nombre de RGly mais pas de RGABAA aux synapses mixtes glycine/GABA. Plus précisément, le blocage de l'activité neuronale par la TTX augmentait rapidement ($t < 10$ min) la diffusion des RGly synaptiques et extrasynaptiques et diminuait le confinement synaptique du RGly ainsi que le nombre de RGly aux synapses. L'effet de la TTX était reproduit par le blocage de la neurotransmission excitatrice dépendante du RNMDA par le D-AP5. Inversement, l'activation du RNMDA ralentissait le RGly et augmentait son confinement aux synapses tout en augmentant le nombre de molécules de RGly postsynaptiques. Le nombre de molécules de RGly aux synapses mixtes était augmenté sans changement de la densité synaptique en RGABAA. Des enregistrements en électrophysiologie ont révélé une augmentation significative de l'amplitude des courants synaptiques inhibiteurs glycinergiques mais pas des courants synaptiques GABAergiques après 30 min d'exposition au NMDA. Une augmentation de la transmission excitatrice glutamatergique provoque donc une

augmentation de l'activité inhibitrice glycinergique. Cette régulation s'apparente à une régulation homéostatique de la transmission glycinergique qui tendrait à maintenir la balance entre l'excitation et l'inhibition et donc la stabilité des réseaux neuronaux [131,132]. Les données de la littérature montrent un délai long (plusieurs heures-jours) pour la mise en place de la plasticité homéostatique. Nos résultats révélaient qu'une telle régulation peut néanmoins se mettre en place dans un délai beaucoup plus court et suggéraient que la dynamique membranaire constitue la base moléculaire de la régulation homéostatique. Favoriser une régulation rapide du RGly et pas du RGABAA aux synapses mixtes a une importance fonctionnelle dans la moelle épinière où ce récepteur prédomine comme modulateur des réseaux moteurs et de réponse à la douleur.

Quels mécanismes sous-tendent la régulation homéostatique du RGly aux synapses inhibitrices ?

J'ai observé que l'augmentation du nombre de RGly aux synapses induite par le NMDA se produisait sans changement de la densité synaptique en géphyrine. Dans des conditions de plasticité synaptique, de nouveaux récepteurs peuvent donc être recrutés aux synapses sans changement du nombre de sites de liaisons à l'échafaudage sous-synaptique. Ceci suggère qu'en condition basale, un certain nombre de sites de liaison sont vacants.

J'ai ensuite montré que l'effet du NMDA implique un influx de calcium extracellulaire et la mobilisation du calcium des réserves. Une libération synaptique de glutamate active par « spillover » les RNMDA extrasynaptiques (abondants dans les neurones de moelle épinière) situés à proximité d'une synapse inhibitrice. Il en résulte un influx de calcium qui en régulant l'état de phosphorylation du RGly et/ou de la géphyrine augmenterait leur interaction réciproque (figure 5). Par exemple, la phosphorylation de résidus Proline de la géphyrine [137] ou de résidus Serine de la géphyrine [107] favoriserait l'interaction avec le RGly et augmenterait la stabilité et le nombre de RGly synaptiques. Par ailleurs, la déphosphorylation du RGly par une phosphatase suite à une augmentation de l'activité (e.g. résidu Ser403 de la sous-unité β [109]) augmenterait la liaison RGly-géphyrine [109]. *Ce travail a fait l'objet d'une publication dans Neuron en 2008 [12].*

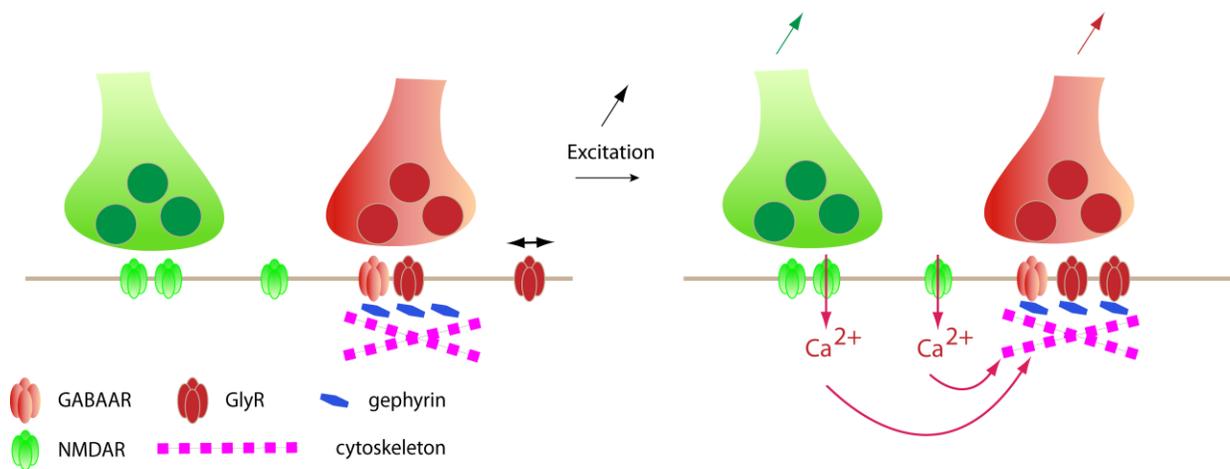


Figure 5. Régulation homéostatique de la dynamique membranaire du RGly par la transmission glutamatergique. Une libération synaptique de glutamate active par « spillover » les RNMDA extrasynaptiques situés à proximité d'une synapse inhibitrice. Il en résulte un influx de calcium qui en régulant l'état de phosphorylation du RGly et/ou de la géphyrine augmenterait leur interaction et le nombre de RGly aux synapses inhibitrices. Une élévation de la transmission excitatrice n'a en revanche pas d'effet sur l'agrégation du RGABAA synaptique.

2.4.2.2. Dynamique membranaire du RGABAA et dépression à long terme des synapses inhibitrices de l'hippocampe

Dans l'hippocampe de rat, la plupart des protocoles de stimulation induisent une LTD aux synapses GABAergiques [72,138,139,140,141,142,143]. Au moment où nous avons entrepris cette étude, les mécanismes moléculaires de la LTD GABAergique n'étaient pas bien connus. Je me suis alors intéressée, au cours de l'encadrement du stage post-doctoral d'Hiroko Bannaï, au rôle de la dynamique membranaire du RGABAA dans l'établissement de la LTD GABAergique dans les cultures primaires de neurones d'hippocampe. Une augmentation pharmacologique de l'activité neuronale excitatrice par la 4-Aminopyridine (4-AP) ou par un cocktail d'antagonistes du RGly et du RGABAA (i.e. la strychnine et la gabazine) augmentait rapidement (dès les 5 premières minutes) et de manière réversible la diffusion du RGABAA et s'accompagnait d'une diminution du confinement et du temps de résidence des récepteurs aux synapses. Ces effets étaient corrélés en immunocytochimie avec une diminution de l'accumulation synaptique des RGABAA. Inversement, le blocage de l'activité neuronale par la TTX diminuait le coefficient de diffusion des RGABAA synaptiques et extrasynaptiques,

augmentait le confinement et le temps de résidence des RGABAAs aux synapses inhibitrices. Les effets de la TTX sur la diffusion latérale du RGABAA étaient reproduits par le blocage de la neurotransmission excitatrice dépendante du RNMDA et du RAMPA par le D-AP5 et le CNQX. Ces données indiquaient que la dynamique membranaire et l'agrégation synaptique du RGABAA sont rapidement et réversiblement régulées par la transmission excitatrice glutamatergique. Un protocole de LTP chimique (30 μ M glutamate and 1 μ M glycine pendant 4 min) cause également une augmentation rapide de la mobilité des RGABAAs recombinants couplés à la Phluorine (α 2SEP-GABAAR) et une dispersion rapide et réversible des récepteurs synaptiques [110]. Nous avons montré l'implication du calcium et de la phosphatase calcium/calmoduline dépendante, la calcineurine, dans le contrôle de la dynamique membranaire du RGABAA. Le fait que le calcium et la calcineurine sont essentiels à l'induction de la LTD aux synapses inhibitrices de l'hippocampe [135,140,144,145] est en faveur d'une implication de la régulation de la diffusion du RGABAA dans la mise en place d'une LTD aux synapses GABAergiques de l'hippocampe. Muir et collaborateurs ont ensuite montré que l'activation de la calcineurine à la suite d'une LTP chimique déphosphoryle la Ser327 dans la boucle intracellulaire de la sous-unité γ 2 du RGABAA et diminue probablement ainsi la capture des RGABAA aux synapses [110] (**figure 6**). Nous avons également montré qu'une activité élevée des synapses glutamatergiques diminue l'accumulation synaptique de la géphyrine. Les interactions géphyrine-géphyrine étaient donc également régulées dans ce phénomène de plasticité (voir **figure 6** pour un récapitulatif des la régulation). *Ce travail a fait l'objet d'une publication dans Neuron en 2009 [72].*

Conclusions

- La diffusion-capture permet de rapidement réguler le nombre de récepteurs aux synapses lors de phénomènes de plasticité synaptique. Nous l'avons montré pour le RGly dans la moelle épinière et pour le RGABAA dans l'hippocampe. Aux synapses excitatrices, la diffusion du RAMPA est aussi modulée par l'activité [55,103,146,147,148,149]. Brièvement, une LTD chimique augmente la mobilité du RAMPA (sous-unité GluA2) aux synapses excitatrices [147,148] puis induit l'endocytose des récepteurs dans la membrane extrasynaptique [55]. A l'inverse, une LTP chimique ou le décageage local de calcium stabilisent les RAMPA aux synapses excitatrices [102,146,150]. Ces résultats sont corrélés à une augmentation et une diminution du nombre de RAMPA synaptique lors de la LTP et la LTD aux synapses excitatrices.

- La régulation de la dynamique membranaire des récepteurs par l'activité est « récepteur spécifique » (RGly vs RGABAA [12,72], RAMPA vs RNMDA [148]) et « cellule spécifique » (RGABAA, moelle épinière vs hippocampe [12,72]).

Perspectives

- Le RGABAA interagit directement avec la géphyrine par l'intermédiaire des sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ [15,16,17,18]. La géphyrine est requise pour accumuler le RGABAA aux synapses [21,22,23,24,25,26]. Réciproquement, le RGABAA (sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 3$ et $\gamma 2$) stabilise la géphyrine aux synapses inhibitrices [22,151,152,153,154,155,156]. Nous avons montré qu'une augmentation de l'activité excitatrice diminue l'accumulation du RGABAA et de la géphyrine aux synapses GABAergiques de l'hippocampe. La question est de savoir s'il existe une régulation interdépendante du récepteur et de sa protéine d'ancrage pour leur accumulation synaptique. Une diminution de l'agrégation de la géphyrine diminuerait le nombre de sites de liaison et réciproquement, une diminution du nombre de RGABAA synaptique diminuerait le nombre de molécules de géphyrine. Le décours temporel des effets d'une LTP chimique sur l'accumulation synaptique de la géphyrine ou du RGABAA permettrait de savoir qui de la géphyrine ou du RGABAA est initialement déstabilisé des synapses.
- Il serait intéressant de déterminer si le déficit en géphyrine aux synapses inhibitrices observé suite à une élévation de l'excitation résulte d'une altération des propriétés d'oligomérisation de la molécule d'ancrage par un mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation.

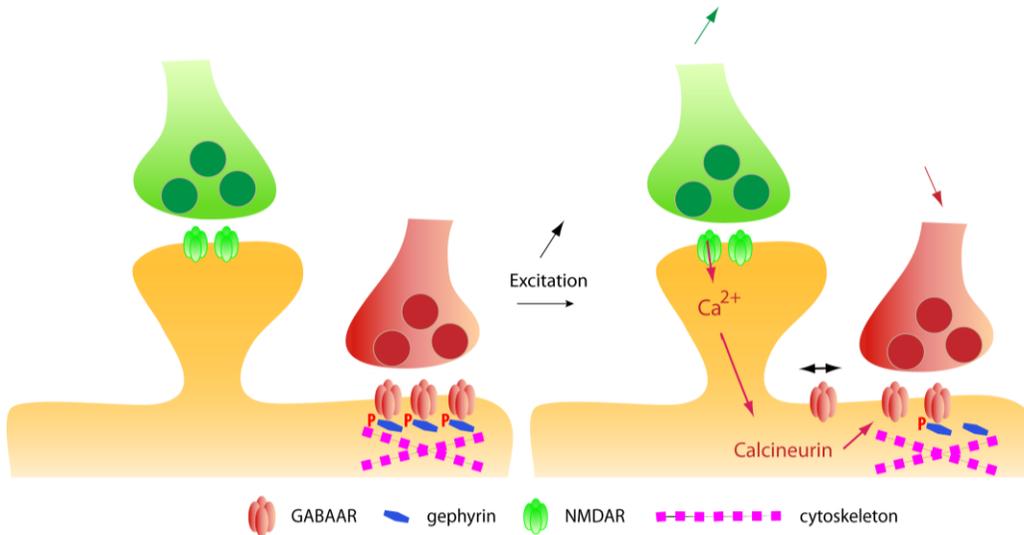


Figure 6. Régulation de la dynamique membranaire du RGABAA par l'excitation dans les neurones d'hippocampe. Dans les épines dendritiques, un influx de calcium au travers du RNMDA aux synapses glutamatergiques active la calcineurine qui déphosphoryle la Ser327 du RGABAA. Le récepteur, incapable de lier la géphyrine, quitterait alors la synapse. Un effet de la signalisation glutamatergique sur le maintien de la géphyrine aux synapses inhibitrices contribuerait également à diminuer les sites de liaison des récepteurs et l'efficacité de la transmission inhibitrice.

2.4.2.3. Une mutation de la sous-unité $\gamma 2$ du RGABAA liée à une forme d'épilepsie généralisée avec crises fébriles (GEFS+) altère la dynamique membranaire du RGABAA

J'ai rejoint l'équipe de Jean Christophe Poncer en novembre 2007. Le laboratoire a examiné les conséquences fonctionnelles de mutations récemment associées au syndrome GEFS+ dans les neurones d'hippocampe en culture [157]. Ce syndrome à transmission autosomale dominante se caractérise par des crises fébriles chez l'enfant pouvant conduire à des crises afebriles chez l'adulte. La mutation K289M affecte notamment le gène codant pour la sous-unité $\gamma 2$ du récepteur GABAA (GABRG2). A des températures physiologiques, l'expression de la mutation K289M cause une altération fonctionnelle de la transmission GABAergique en accélérant la désactivation du courant GABA sans changement du courant tonique porté par les récepteurs extra-synaptiques. Ces résultats suggéraient que l'épilepsie des patients portant la mutation K289M était due à une diminution de l'efficacité de la transmission GABAergique. Au cours de l'encadrement du travail de 2 stagiaires M1, Félix Leroy et Walid Bouthour, j'ai examiné l'impact de l'hyperthermie sur l'agrégation postsynaptique des RGABAA portant la mutation K289M. A

37°C, la mutation n'altérait pas l'agrégation postsynaptique des RGABAA : la densité d'agrégats de RGABAA était inchangée dans les neurones hippocampiques en culture exprimant une protéine recombinante, sauvage ou mutée, fusionnée au marqueur fluorescent GFP. En revanche, une élévation de la température de 37 à 41°C diminuait sélectivement le nombre d'agrégats postsynaptiques et l'intensité de fluorescence des agrégats de RGABAA portant la mutation K289M. Ceci s'accompagnait d'une rapide (<5 min) augmentation de la diffusion latérale des RGABAA-K289M individuels. Ainsi, les RGABAA mutés s'échappaient plus vite des synapses inhibitrices que les récepteurs sauvages à la suite d'une hyperthermie. Des enregistrements en patch-clamp ont montré une augmentation significative de l'activité synaptique après élévation de la température de 37 à 41°C. L'augmentation de la mobilité du RGABAA muté induite par l'hyperthermie était bloquée par des antagonistes des RNMDA et RANPA (AP5 et NBQX). A l'inverse, une augmentation de l'activité neuronale par la 4-AP à des températures basses reproduisait les effets d'une élévation de la température sur la mobilité du mutant. Ces données nous ont permis de proposer que la mutation K289M, non seulement diminue le seuil épiléptogénique en altérant les cinétiques des courants GABA, mais diminue aussi le nombre de RGABAA postsynaptiques dans des conditions d'activité synaptique élevée comme l'hyperthermie. *Ce travail a fait l'objet d'un article publié dans Cerebral Cortex en 2011 [111].*

La localisation de la mutation K289M dans la boucle extracellulaire entre les segments M2 et M3 de la sous-unité $\gamma 2$ du RGABAA suggérait qu'un changement de la conformation du récepteur influe sur sa dynamique membranaire, son interaction avec la géphyrine et par conséquent sur son accumulation synaptique. J'ai ensuite analysé les effets d'un modulateur allostérique sur la dynamique membranaire et l'accumulation synaptique du RGABAA endogène. De manière similaire à la mutation K289M, une exposition aigue des neurones d'hippocampe à un agoniste inverse des benzodiazépines, le methyl-6,7-dimethoxy-4-ethyl-beta-carboline-3-carboxylate (DMCM, 1 μ M) accélérail la désactivation du courant synaptique porté par les RGABAAs (**figure 7A**). Le DMCM augmentait rapidement (<5 minutes) la diffusion de la sous-unité $\gamma 2$ du RGABAA endogène (**figure 7B**) et diminuait son temps de résidence aux synapses inhibitrices (**figure 7C**). Une exposition d'1h des neurones au DMCM dispersait la sous-unité $\gamma 2$ du RGABAA des synapses inhibitrices (**figure 8A-B**). Cet effet était corrélé avec une diminution significative de la taille quantique des courants synaptiques inhibiteurs portés par les RGABAAs (**figure 8C-D**). Réciproquement, une exposition aigue des neurones à un agoniste des benzodiazépines, le diazépame (1 μ M) diminuait la désactivation du courant synaptique GABAergique. Cet effet

s'accompagnait d'une réduction du coefficient de diffusion (**figure 9A**), et d'une augmentation du confinement (**figure 9B**) et du temps de résidence (**figure 9C**) du RGABAA en condition d'hyperactivité (100 μ M 4-AP). L'augmentation des contraintes à la diffusion du RGABAA s'accompagnait d'une augmentation de l'accumulation des récepteurs aux synapses inhibitrices (**figure 9D**). Nous avons conclu que l'état allostérique du RGABAA influence sa dynamique membranaire et son accumulation synaptique, probablement en modifiant ses propriétés d'interaction avec l'échafaudage moléculaire sous-membranaire. Ce travail révèle un effet inattendu du mode d'action des benzodiazépines.

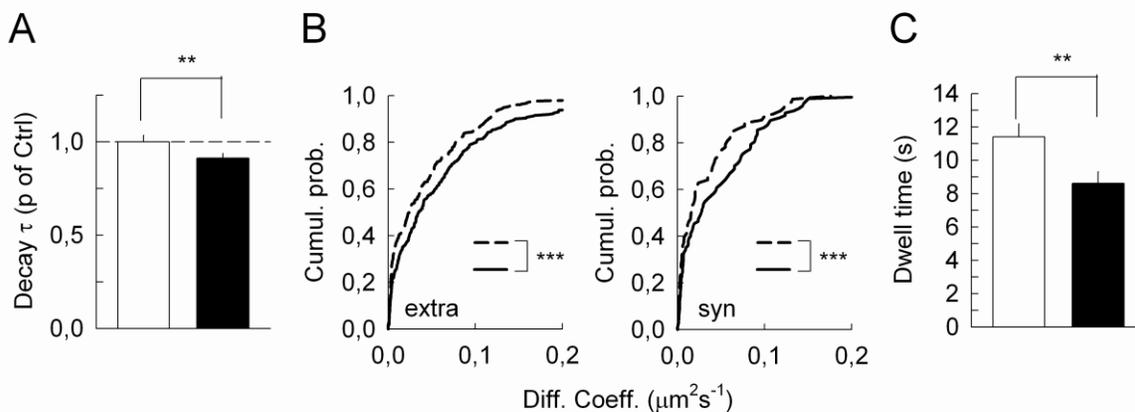


Figure 7. L'agoniste inverse des benzodiazépines, le DMCM, augmente la diffusion de la sous-unité $\gamma 2$ du RGABAA. **A**, constante de désactivation des courants miniatures inhibiteurs portés par les RGABAA (GABA mIPSCs) mesurée dans des neurones maintenus en conditions contrôles (blanc) ou à la suite d'une exposition aiguë (1h) au DMCM (1 μ M). Ctrl, 38 cellules ; DMCM, 42 cellules ; 3 expériences. Noter la désactivation rapide des courants synaptiques dans les neurones exposés au DMCM (noir). Mann-Whitney rank sum test ** $p < 0.01$. **B**, Probabilités cumulées des coefficients de diffusion des sous-unités $\gamma 2$ du RGABAA en conditions contrôles (lignes pointillées) ou en présence (lignes pleines) de DMCM (1 μ M). n QDs, extrasynaptique, Ctrl, 334, DMCM, 271 ; synaptique, Ctrl, 78, DMCM, 97 ; 3 expériences différentes. Kolmogorov-Smirnov test *** $p < 0.001$. **C**, Temps de résidence (moyenne \pm SEM) de $\gamma 2$ aux synapses inhibitrices en absence (blanc) ou en présence (noir) de DMCM. n QDs, Ctrl, 163, DMCM, 157 ; 3 expériences différentes. Mann-Whitney rank sum test ** $p < 0.01$. Le DMCM augmente la diffusion de la sous-unité $\gamma 2$ du RGABAA à la surface de la membrane extrasynaptique et synaptique et induit un échappement plus rapide du récepteur des synapses.

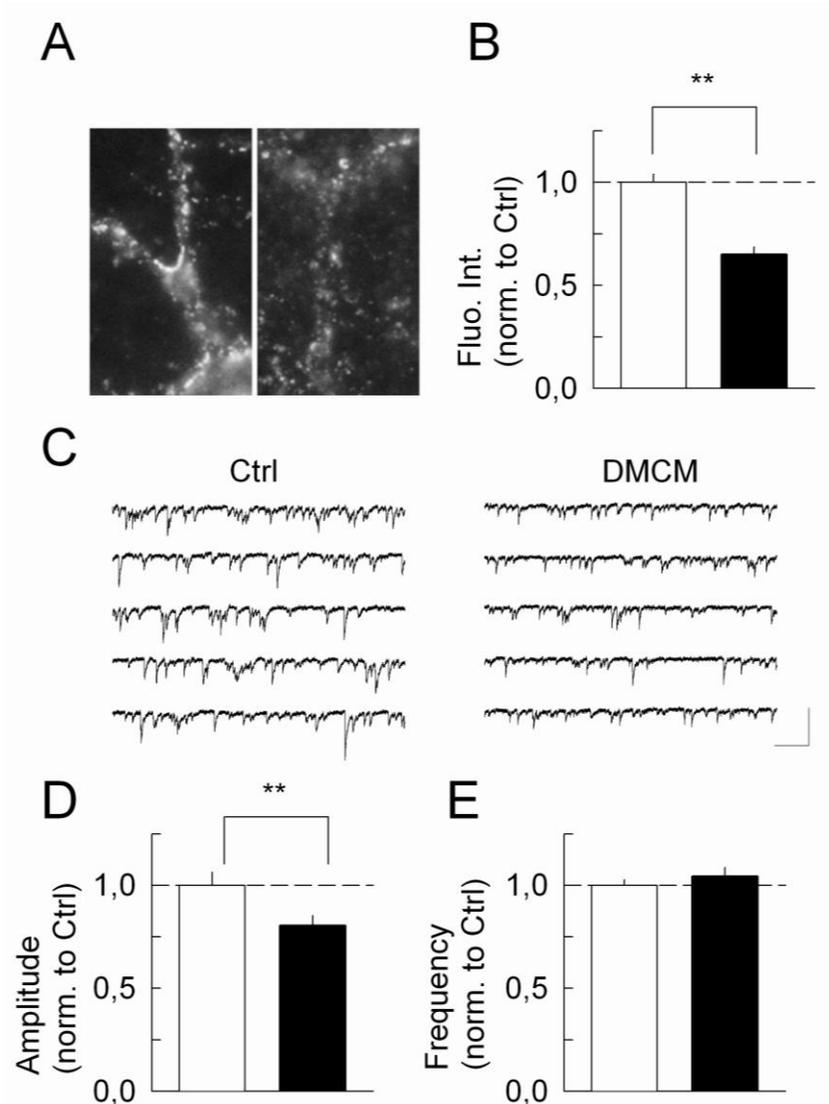


Figure 8. Le DMCM disperse les agrégats synaptiques de RGABAA et diminue la réponse synaptique GABAergique. **A**, Immunomarquage de surface (sur cellules vivantes à 4°C) de la sous-unité $\gamma 2$ du RGABAA dans des neurones d'hippocampe à 21 DIV maintenus en conditions contrôles (gauche) ou après 1h d'exposition au DMCM (1 μ M, droite). **B**, Quantification de l'intensité de fluorescence des agrégats de la sous-unité $\gamma 2$ du RGABAA en absence (blanc) ou en présence (noir) de DMCM. n cellules Ctrl et DMCM, 60 à partir de 3 expériences distinctes. Mann-Whitney rank sum test $**p < 0.01$. Noter la diminution significative de l'agrégation du RGABAA après traitement au DMCM. **C-E**, Effets du DMCM sur les courants synaptiques GABAergiques. **C**, Enregistrements en continu des courants miniatures IPSCS à partir de neurones non traités (gauche) ou traités 1h au DMCM (droite). Calibration: 100 pA, 250 ms. **D-E**, Amplitude (**D**) et fréquence (**E**) (moyenne \pm SEM) des mIPSCs GABAergiques en absence (blanc) ou en présence (noir) de DMCM. Ctrl, 38 cellules ; DMCM, 42 cellules ; 3 expériences. Mann-Whitney rank sum test $**p < 0.01$. Le DMCM diminue l'amplitude mais pas la fréquence des courants synaptiques GABAergiques.

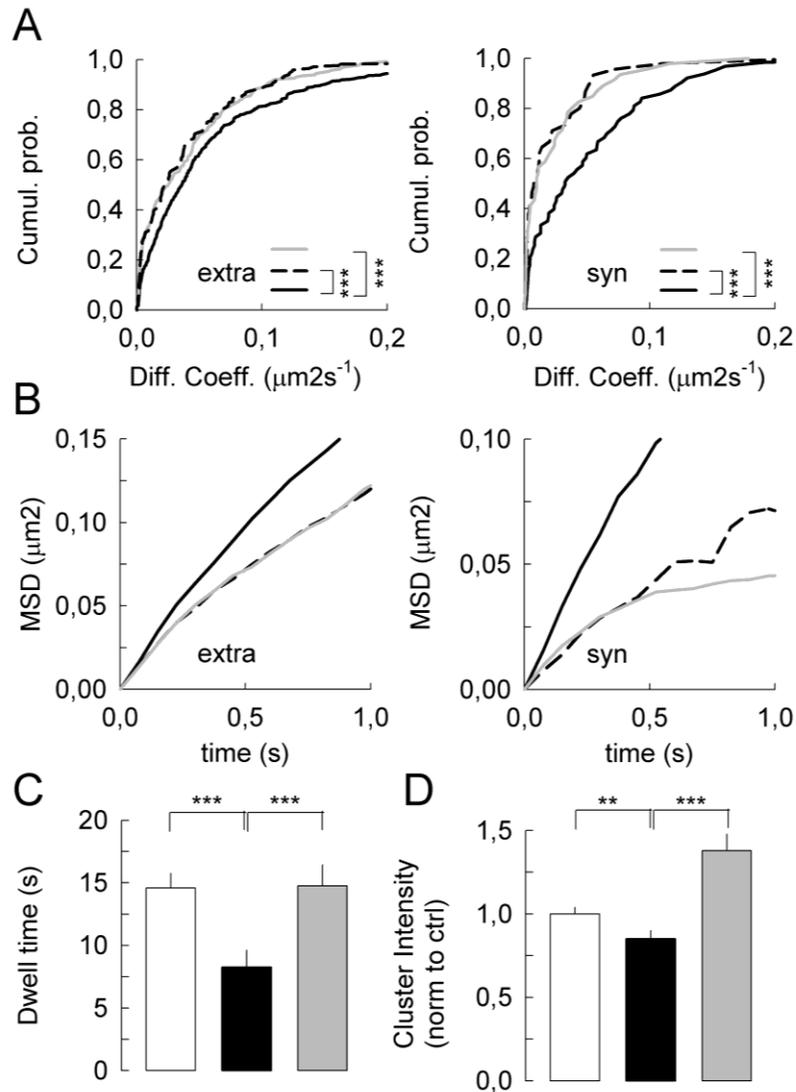


Figure 9. Le diazépame diminue la diffusion et augmente l'agrégation du RGABAA en condition d'hyperactivité. **A-C**, Distributions cumulées des coefficients de diffusion (**A**), déplacement quadratique moyen en fonction du temps (**B**), et temps de résidence synaptique (**C**, moyenne \pm SEM) de la sous-unité $\gamma 2$ du RGABAA en conditions contrôles (lignes pointillées), en conditions d'hyperexcitabilité induite par la 4-AP ($100 \mu\text{M}$) en absence (lignes pleines noires) ou en présence (lignes pleines grises) de diazépame ($1 \mu\text{M}$). n QDs, extrasynaptique, Ctrl, 169, 4-AP, 358, 4-AP+diazépame, 216 ; synaptique, Ctrl, 46, 4-AP, 64, 4-AP+diazépame, 47 ; 3 expériences différentes. **A**, Kolmogorov-Smirnov test $***p < 0.001$. **C**, Mann-Whitney rank sum test $***p < 0.001$. Noter que le diazépame ralentit la diffusion du RGABAA et augmente son temps de résidence en condition d'hyperexcitabilité. **D**, Intensité de fluorescence (moyenne \pm SEM) des agrégats de la sous-unité $\gamma 2$ du RGABAA après immunomarquage de surface sur neurones vivants à 4°C en conditions contrôles (blanc), ou après 1h d'exposition au 4-AP seul (noir) ou en présence de diazépame (gris). n cellules, Ctrl, 108 ; 4-AP, 89 ; 4-AP+diazépame, 112 ; 3 expériences. Mann-Whitney rank sum test $**p < 0.01$; $***p < 0.001$.

2.5. Régulation dynamique du transporteur au chlore KCC2

L'homéostasie du chlore détermine de façon critique la polarité et l'efficacité de la transmission synaptique dépendante des RGly et RGABAA. Alors que les courants portés par les RGABAA conduisent à des réponses dépolarisantes dans les neurones immatures et contribuent ainsi à la maturation des réseaux corticaux, ces réponses deviennent rapidement hyperpolarisantes lors de la maturation neuronale. Cette hyperpolarisation progressive traduit une régulation opposée de l'expression d'au moins deux transporteurs principaux des ions chlorure, NKCC1 et KCC2. Alors que NKCC1 entraîne une internalisation du chlore et est fortement exprimé au cours de la vie postnatale précoce, KCC2 participe au contraire à l'extrusion du chlore et s'exprime seulement après plusieurs jours de vie postnatale pour atteindre un niveau stationnaire chez l'adulte [158,159,160]. Chaque mouvement d'ions au travers de la membrane plasmique s'accompagne d'un mouvement de molécules d'eau dans la même direction. Ainsi, l'activité de NKCC1 est associée à une augmentation du volume cellulaire alors que celle de KCC2 cause une diminution du volume cellulaire [161] (**figure 10**).

Dans un réseau mature dans lequel la transmission GABAergique est inhibitrice, plusieurs formes de traumatismes cérébraux conduisent à une action paradoxalement dépolarisante du GABA [162,163,164,165,166,167,168]. Cette dépolarisation semble être à l'origine des activités pathologiques enregistrées dans le tissu hippocampique prélevé chez des patients atteints d'épilepsie du lobe temporal [169,170,171]. Dans certains cas, une réduction de l'expression du transporteur KCC2 a été corrélée à ces modifications [171]. Une action dépolarisante du GABA a néanmoins été mise en évidence dans des neurones qui expriment KCC2 [171] suggérant que la fonction du transporteur peut être altérée indépendamment de son niveau d'expression. Il est donc crucial d'élucider les mécanismes qui contrôlent la stabilité membranaire et l'activité de KCC2 dans le but de comprendre les conséquences fonctionnelles d'un traumatisme cérébral ou d'une activité épileptique dans le cerveau adulte.

KCC2 n'est pas distribué de manière homogène à la surface des neurones mais forme des agrégats [172,173] (**figure 11A1, B1**). Une telle agrégation reflète des contraintes moléculaires. J'ai proposé, au cours de l'encadrement de la thèse d'Ingrid Chamma, que l'agrégation de KCC2 à proximité des synapses dépendrait d'un mécanisme de « diffusion-capture » similaire à celui décrit pour les récepteurs aux neurotransmetteurs et que la régulation du confinement et de l'agrégation de KCC2 participerait à réguler l'homéostasie du chlore neuronal.

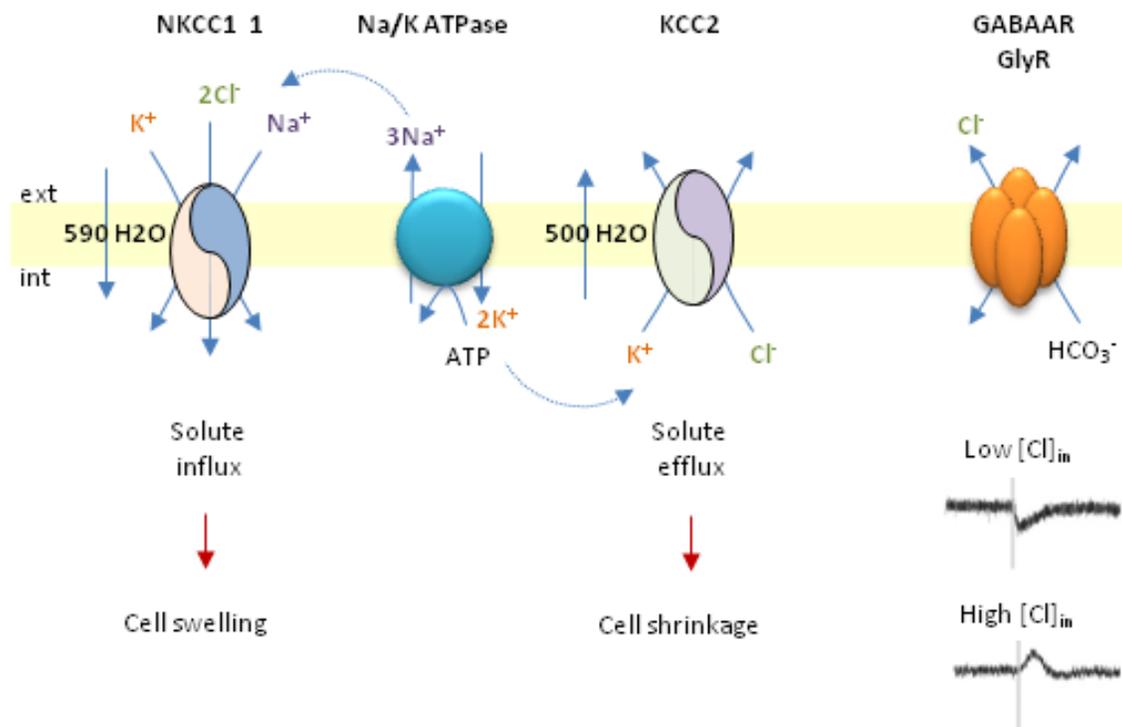


Figure 10. Propriétés de transport d'ions et d'eau des co-transporteurs NKCC1 et KCC2. Les transporteurs secondaires NKCC1 et KCC2 utilisent l'énergie du gradient électrochimique des ions Na^+ and K^+ générés par la pompe Na-K ATPase pour déclencher respectivement un influx net de $1 K^+$, $1 Na^+$, $2 Cl^-$ et un efflux net de $1 K^+$, $1 Cl^-$ ions. L'activité de chaque transporteur est associée à un influx (NKCC1) ou à un efflux (KCC2) d'eau. NKCC1 et KCC2 sont réciproquement régulés au cours du développement. NKCC1 prédomine au stade précoce du développement alors que KCC2 est le principal transporteur responsable de l'extrusion du Cl^- dans les neurones matures. Ce profil d'expression a un impact à la fois sur la régulation du volume de la cellule et sur l'efficacité et la polarité de la transmission synaptique médiée par le RGly et le RGABAA. D'après [174].

2.5.1 KCC2 est agrégé près des synapses excitatrices et inhibitrices

Dans un premier temps, nous avons étudié l'agrégation de KCC2 en relation avec les synapses inhibitrices et excitatrices dans les neurones d'hippocampe en culture. Nous avons observé, en microscopie confocale, que les agrégats de KCC2 décoraient le corps cellulaire, les bras dendritiques, le cou et la tête des épines dendritiques. Les agrégats de KCC2 étaient retrouvés autour des différenciations postsynaptiques inhibitrices formées sur les bras dendritiques (**figure 11A1-3, C**). Ils étaient également détectés à la périphérie des synapses excitatrices formées sur les épines dendritiques mais ne colocalisaient pas avec la densité postsynaptique (**figure 11 B1-3, C**). Nos résultats ainsi que l'analyse en microscopie électronique de la distribution ultrastructurale de KCC2 dans les épines dendritiques (**figure 11D**) indiquaient une localisation

périsynaptique du transporteur [175,176,177,178]. Ces données ont été publiées dans *Frontiers in Cellular Neuroscience* en 2011 [174].

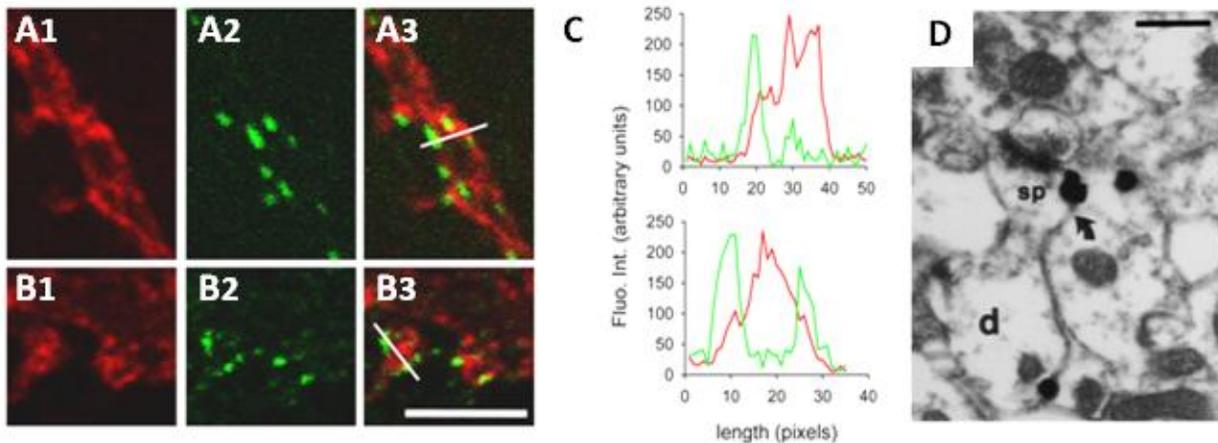


Figure 11. Localisation péri-synaptique de KCC2 dans les neurones d'hippocampe maintenus 29 jours en culture. A1-B3, Double-marquage du transporteur endogène (rouge en C1, C3, D1, D3) et de la géphyrine (vert en C2, C3) ou de la PSD-95 (vert en D2, D3). Barres de calibration, 5 μ m. C, Intensités de fluorescence en unités arbitraires par pixel le long des lignes tracées en C3 et D3, montrant la juxtaposition mais pas la colocalisation de KCC2 (rouge) avec la géphyrine (vert, en haut) ou la PSD-95 (vert, en bas). D, Immunodétection de KCC2 avec des particules d'or intensifiées à l'argent montrant le transporteur à la périphérie de la densité postsynaptique (flèche) dans une épine dendritique d'un neurone d'hippocampe. Barre de calibration, 0,6 μ m. D'après [175].

2.5.2 Dynamique membranaire de KCC2

Puisque la diffusion latérale régule l'agrégation des protéines membranaires, nous avons étudié les propriétés diffusives de KCC2. La technique de SPT requiert l'utilisation d'un anticorps dirigé contre un épitope extracellulaire de la protéine d'intérêt couplé à une sonde fluorescente (**figure 3A**). En l'absence d'un anticorps spécifique reconnaissant un épitope extracellulaire de KCC2, nous avons construit une protéine recombinante étiquetée avec 3 Flags dans la seconde boucle extracellulaire du transporteur entre les domaines trans-membranaires 3 et 4 (**figure 12A**). La protéine recombinante a été obtenue à partir de la construction KCC2-IRES-GFP. L'immunomarquage de la protéine recombinante KCC2-Flag-IRES-GFP dans les neurones perméabilisés a révélé un marquage spécifique de l'étiquette Flag dans les épines dendritiques et le bras dendritique. De plus, la distribution subcellulaire de l'étiquette Flag n'était pas distinguable de celle de la construction native KCC2-IRES-GFP. Un marquage de surface sur cellule vivante à 4°C indiquait une localisation membranaire des agrégats du transporteur dans les épines dendritiques (**figure 12B**). Nous avons conclu que l'addition de l'étiquette Flag n'interférerait pas

avec le trafic cellulaire et l'agrégation membranaire du transporteur. A l'aide de l'imagerie du chlore avec une sonde ratiométrique CFP-YFP [179] (**figure 12C**), nous avons déterminé si l'addition de l'étiquette Flag interférait sur l'activité du transporteur recombinant. Des cellules Hek qui n'expriment pas KCC2 étaient transfectées avec le transporteur neuronal natif ou étiqueté Flag en présence de la sonde au chlore (**figure 12D-E**). L'imagerie du chlore a révélé une capacité identique d'extrusion du chlore des deux protéines recombinantes (**figure 12E**). Ces résultats indiquaient que le transporteur recombinant KCC2-Flag est fonctionnel. Ceci est en accord avec le fait que la propriété d'extrusion du chlore dépend de l'intégrité du domaine cytoplasmique amino-terminal [180] qui n'est pas modifié dans notre construction.

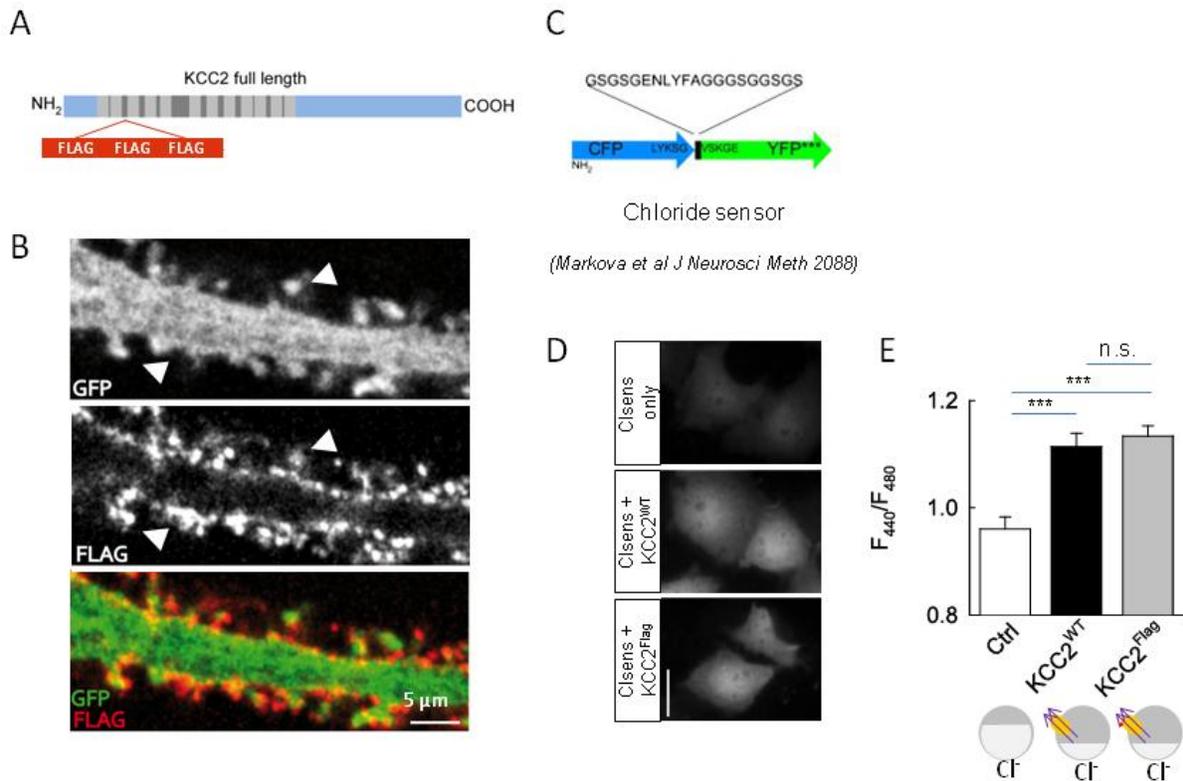


Figure 12. Le transporteur KCC2-Flag est ciblé à la membrane plasmique et conserve sa capacité d'extrusion des ions Cl⁻. **A**, schéma montrant le site d'insertion des 3 étiquettes Flag dans la seconde boucle extracellulaire entre les domaines transmembranaires 3 et 4. **B**, immunodétection de l'étiquette Flag à la surface de neurones d'hippocampe qui révèle la présence d'agrégats de KCC2-Flag sur le corps du dendrite et dans les épines dendritiques (pointes de flèches). Le marquage intracellulaire n'est pas détecté dans cette condition expérimentale. **C-E**, Le transporteur KCC2-Flag est fonctionnel. **C**, L'activité du transporteur KCC2 était mesurée en imagerie ratiométrique à l'aide d'une sonde au chlore CFP-YFP. **D**, Des cellules HEK étaient transfectées avec la sonde au chlore CFP-YFP seule (Cl sens) ou en combinaison avec le transporteur KCC2 recombinant non modifié (KCC2-wt) ou étiqueté Flag (KCC2-Flag). La fluorescence de la CFP était collectée à 440 nm (CFP) puis celle de l'YFP était récupérée à 480 nm (YFP). Les rapports des valeurs d'intensité de fluorescence CFP/YFP étaient normalisés par rapport au contrôle (**E**). La fluorescence de l'YFP est éteinte par une élévation intracellulaire en ions Cl⁻ alors que celle de la CFP n'est pas modifiée par un tel traitement. Une augmentation du rapport de fluorescence CFP/YFP est donc inversement corrélée à une diminution de la concentration cytoplasmique en Cl⁻. *n* cellules, Cl sens, 51, KCC2-wt, 53, KCC2-Flag, 53, 4 expériences. Mann-Whitney rank sum test ****p*<0.001.

Les propriétés diffusives de KCC2-Flag ont ensuite été étudiées dans les neurones d'hippocampe en SPT en utilisant un anticorps primaire anti-Flag, un anticorps secondaire biotinylé (fragment Fab) et les QDs commerciaux couplés à la streptavidine. Les synapses excitatrices et inhibitrices étaient identifiées par l'expression de homer1c-GFP et de géphyrine-mRFP. Du fait de l'accumulation préférentielle de KCC2 à la périphérie des synapses (**figure 11**

et [175,176,177,178]), les trajectoires qui se superposaient aux agrégats synaptiques dilatés de 2 pixels (440 nm) étaient considérées comme péri-synaptiques. Nous avons observé que le transporteur alterne entre des mouvements rapides Browniens et des phases de ralentissement et de confinement. Comparé à sa diffusion dans la membrane extrasynaptique, KCC2 était ralenti et confiné à proximité des synapses excitatrices et inhibitrices (**figure 13A-C**). Le comportement diffusif du transporteur est comparable à celui des récepteurs [68] et suggère la présence de contraintes à la diffusion dans la zone périssynaptique. Par ailleurs, le transporteur résidait 1.5 fois plus longtemps à proximité des synapses excitatrices que des synapses inhibitrices (**figure 13D**), ce qui suggère un ancrage plus important de KCC2 près des synapses excitatrices. Ceci indique également une relation particulière de KCC2 avec les synapses glutamatergiques et pose la question de son rôle aux synapses excitatrices (voir ci-dessous).

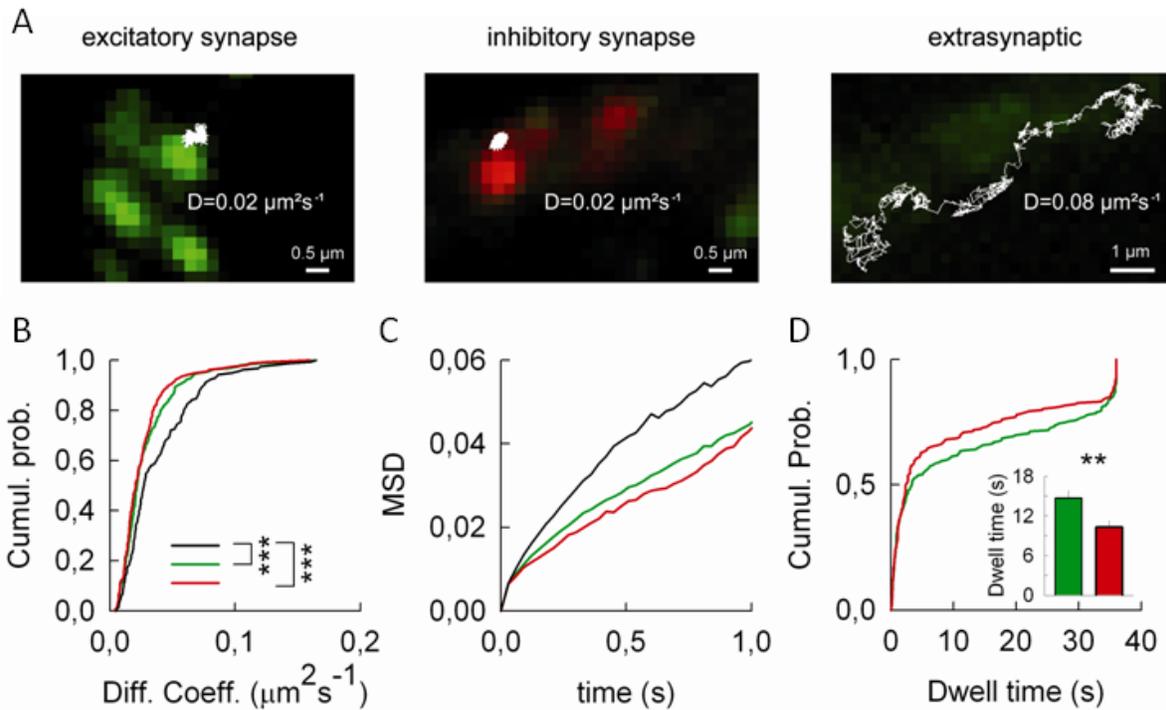


Figure 13. Dynamique membranaire du transporteur KCC2-Flag étudiée en SPT. **A**, exemples de trajectoires de KCC2-Flag reconnectées à partir d'enregistrements de 35s ($\Delta t=0.03s$). Les trajectoires des QDs étaient superposées aux images fluorescentes de homer1c-GFP (vert) et de gephyrin-mRFP (rouge) afin d'identifier les synapses excitatrices et inhibitrices. Noter que la trajectoire extrasynaptique explore une surface plus importante de la membrane plasmique. **B-D**, Distribution cumulée des coefficients de diffusion (**B**) et MSD en fonction du temps (**C**) des QDs extrasynaptiques (noir), à proximité des synapses excitatrices (vert) ou inhibitrices (rouge). Le transporteur KCC2-Flag est plus lent et plus confiné près des synapses. n QDs, extrasynaptique, 157 ; près des synapses excitatrices, 193, ou inhibitrices, 157 ; 4 expériences différentes. Kolmogorov-Smirnov test $***p<0.001$. **D**, distribution cumulée du temps de résidence des QDs à proximité des synapses excitatrices (vert) ou inhibitrices (rouge). Insert, Temps de résidence (moyenne \pm SEM) près des synapses excitatrices (vert) ou inhibitrices (rouge). n QDs, près des synapses excitatrices, 251, ou inhibitrices, 206 ; 4 expériences différentes. Mann-Whitney rank sum test $***p<0.001$.

Il s'agissait ensuite de déterminer la nature des contraintes à la diffusion de KCC2 à proximité des synapses et leur implication dans l'agrégation du transporteur. Celles-ci impliqueraient l'ancrage à un échafaudage moléculaire spécifique relié au cytosquelette sous-membranaire, des barrières de diffusion de type « corrals » ou « piquets », et/ou les radeaux lipidiques. Les radeaux lipidiques régulent au moins en partie l'agrégation de KCC2 [172]. D'autre part, des expériences d'immunoprécipitation ont révélées que KCC2 interagit directement via son domaine C-terminal intracellulaire (KCC2 CTD) avec 4.1N, un variant neuronal de la famille des protéines 4.1 [181]. 4.1N, comme les autres membres de la famille 4.1, possède un domaine 4.1 Ezrin Radixin Moesin (FERM) d'interaction à la spectrine qui lie l'actine [182]. KCC2 interagirait

donc avec le cytosquelette d'actine sous-membranaire via 4.1N. Ceci posait la question du rôle de l'interaction KCC2-4.1N-actine dans le confinement et l'agrégation de KCC2 près des synapses.

Dans un premier temps, nous avons montré que l'actine polymérisée contraignait la diffusion de KCC2 à la périphérie des synapses. Une dépolymérisation rapide (10 minutes) de l'actine filamenteuse avec la latrunculine A (5 μ M) augmentait significativement la diffusion du transporteur (**figure 14A**). Puis, nous avons surexprimé le domaine CTD de KCC2 afin de bloquer l'interaction de KCC2 avec 4.1N (et possiblement avec d'autres partenaires protéiques non encore identifiés) [181] et d'en étudier l'impact sur la dynamique membranaire et l'agrégation du transporteur recombinant KCC2-Flag. La surexpression du CTD causait une augmentation de la diffusion (**figure 14C**) et une dispersion des agrégats de KCC2-Flag (**figure 14E**). La délétion de 4.1N par une approche shRNA mimait les effets du CTD et de la latrunculine sur l'accélération de KCC2-Flag (non montré). Nous avons alors proposé que le CTD de KCC2, probablement en se liant au cytosquelette d'actine via 4.1N, est requis pour le confinement et l'agrégation du transporteur. Cependant, l'agrégation et le confinement de KCC2 ne sont probablement pas impliqués dans la régulation de l'activité du transporteur. En effet, la perte des agrégats de KCC2 à la suite d'une surexpression du CTD n'altérait pas l'activité du transporteur (**figure 14F-H**).

Après la dépolymérisation de l'actine (**figure 14B**), la surexpression du CTD de KCC2 (**figure 14D**) ou la délétion de 4.1N (non montré), le temps de résidence de KCC2-Flag était diminué dans la région pérисynaptique entourant les synapses excitatrices mais pas les synapses inhibitrices. Cette différence s'expliquerait par un enrichissement de l'actine filamenteuse dans les épines dendritiques. Ceci suggère également que l'agrégation de KCC2 près des synapses inhibitrices ferait intervenir un mécanisme indépendant de l'actine et de 4.1N, qui impliquerait par exemple les microtubules ou les radeaux lipidiques.

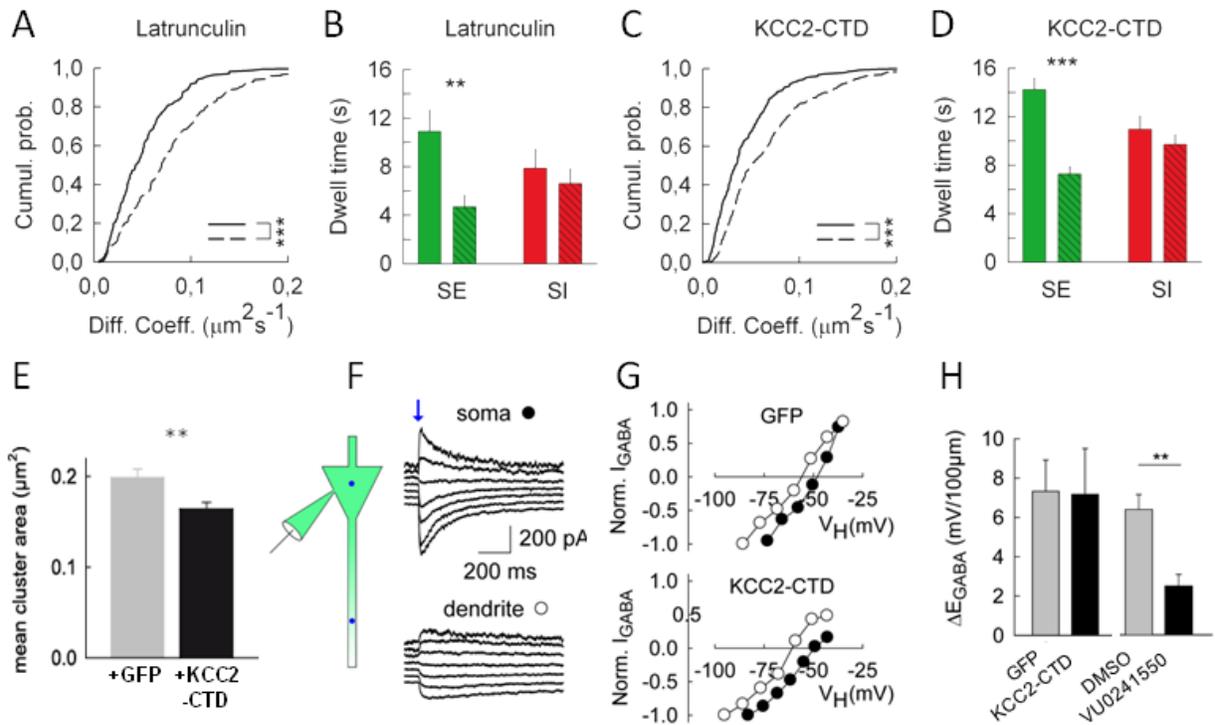


Figure 14. L'agrégation de KCC2 requiert la liaison de son domaine CTD à l'actine. A-D, La dépolymérisation de l'actine avec la latrunculine A (**A-B**) ou la surexpression du domaine CTD de KCC2 (**C-D**) augmentent la diffusion de KCC2-Flag (**A, C**) et diminuent le temps de résidence de KCC2-Flag (**B, D**) près des synapses excitatrices (SE, vert) sans changer le temps de résidence près des synapses inhibitrices (SI, rouge). **A, C,** Distributions cumulées des coefficients de diffusion calculées pour les QDs indépendamment de leur localisation synaptique ou extrasynaptique. *n* QDs, A, Contrôle, 174 ; Latrunculine, 215 ; C, Contrôle, 313 ; CTD, 370 ; 3 expériences indépendantes. Kolmogorov-Smirnov test *** $p < 0.001$. **B, D,** Temps de résidence moyen (+/- SEM) près des SE (vert) et des SI (rouge). *n* QDs, B, Contrôle, SE, 67, SI, 64 ; *n* QDs, Latrunculine, SE, 99, SI, 94 ; D, Contrôle, SE, 262, SI, 159 ; *n* QDs, CTD, SE, 407, SI, 278. Mann-Whitney rank sum test ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. **E,** Diminution de la surface moyenne des agrégats de KCC2 après immunodétection de l'étiquette Flag dans les neurones exprimant la GFP (gris) ou le CTD (noir). *n* cellules, GFP, 25 ; CTD, 26 ; 2 expériences. Mann-Whitney rank sum test ** $p < 0.01$. **F-H,** La surexpression du CTD de KCC2 n'altère pas la capacité d'extrusion des ions Cl^- du transporteur. **F,** Comparaison du gradient de chlore somato-dendritique mesuré en patch-clamp (configuration cellule entière). La $[\text{Cl}^-]_{\text{in}}$ somatique était ajustée à 18 mM. Puis, E_{GABA} était mesuré après photolyse locale de Rubi-GABA sur le corps cellulaire ou sur la partie distale du dendrite (à 100 μm du soma). La $[\text{Cl}^-]_{\text{in}}$ dendritique dépend de la capacité d'extrusion du chlore du dendrite. **G,** Exemples de courants obtenus par des sauts de voltage entre -95 et -35 mV et les courbes I/V normalisées correspondantes. Les courbes I/V mesurées sur les dendrites (ronds blancs) sont décalées vers la gauche en comparaison avec les courbes I/V enregistrées sur le soma (ronds noirs), indiquant une capacité d'extrusion du chlore du dendrite. **H,** Résumé des résultats montrant un décalage similaire des courbes I/V normalisées dans les neurones exprimant la GFP ou KCC2-CTD ($p = 0.6$) mais pas dans les neurones exposés à l'antagoniste sélectif de KCC2 (VU0240551 6 μM vs. DMSO). *n* cellules, 10 à 12 pour chaque condition. Mann-Whitney rank sum test ** $p < 0.01$.

2.5.3. Régulation de la dynamique membranaire et de l'agrégation de KCC2 par l'excitation

Dans les neurones matures, la régulation de KCC2 par l'activité contribue à la plasticité des synapses inhibitrices dans des conditions physiologiques et pathologiques. Dans certaines conditions, une augmentation de l'excitation augmente l'activité de transport du chlore de KCC2 qui renforce la signalisation GABAergique et permet ainsi de contrer l'hyperexcitabilité [183,184]. A l'inverse, une augmentation de l'excitation dans certaines conditions pathologiques diminue l'activité de KCC2 et promeut ainsi l'épilepsie [166,171,185,186,187,188,189,190]. La régulation par l'activité de KCC2 participe donc à l'ajustement de la balance entre l'excitation et l'inhibition des réseaux neuronaux. L'activité régule KCC2 au niveau de l'expression de l'ARNm ou de la protéine et au niveau post-traductionnel (phosphorylation, oligomérisation, internalisation). La régulation par l'activité de la fonction de transport de chlore de KCC2 est rapide (minutes) [142,184,188,191,192,193,194] et devance les changements transcriptionnels et traductionnels qui mettent 1-6 heures à se mettre en place [166,186,188,195,196]. Celle-ci implique une régulation de sa stabilité membranaire. Une élévation de l'activité excitatrice provoque la déphosphorylation via PP1 de la Ser940 et la phosphorylation par des Tyrosines Kinases des Tyr903/1087 (des résidus localisés au niveau du CTD de KCC2) [194,197]. Ces modifications induisent l'endocytose rapide et la dégradation lysosomiale de KCC2.

Nous avons voulu savoir si la dynamique membranaire de KCC2 et son agrégation étaient régulées par une élévation de l'activité neuronale. Une augmentation pharmacologique de l'activité neuronale excitatrice par la 4-AP augmentait rapidement (dès les 5 premières minutes) la diffusion de KCC2 (**figure 15A**). Après élévation de l'activité neuronale avec la 4-AP, le transporteur s'échappait plus rapidement de la zone pérисynaptique située autour des synapses excitatrices alors que le temps de résidence du transporteur était inchangé près des synapses inhibitrices (non montré). Nous avons vérifié qu'une élévation de l'activité neuronale avec la 4-AP n'altérait pas la viscosité de la membrane plasmique. En effet, la diffusion latérale de la NCAM120, une molécule d'adhésion membranaire sans domaine intracellulaire et ancrée dans la membrane plasmique par un ancrage glycosylphosphatidylinositol (GPI) [198] n'était pas modifiée après une exposition à la 4-AP (**figure 15A**). L'augmentation de la diffusion de KCC2 par la 4-AP était associée à une dispersion rapide (10 minutes) des agrégats de KCC2-Flag (**figure 15C**), réversible en 30 minutes et à une perte de fonction du transporteur (**figure 15D**). Les effets de la 4-AP dépendaient de l'activation du RNMDA mais pas du RAMPA (**figure 15B**)

ainsi que d'un influx de calcium (**non montré**). Nos résultats et les données de la littérature [194,197] nous ont amené à proposer qu'une élévation du calcium intracellulaire à la suite de l'activation des RNMDA conduit à la déphosphorylation via PP1 de la Ser940 et/ou à la phosphorylation des résidus Tyr903/1087 de KCC2, qui libérerait KCC2 de son ancrage à l'actine et le rendrait disponible pour l'endocytose et la dégradation lysosomiale. **Ce travail fait l'objet d'un article qui sera prochainement soumis à EMBO Journal.**

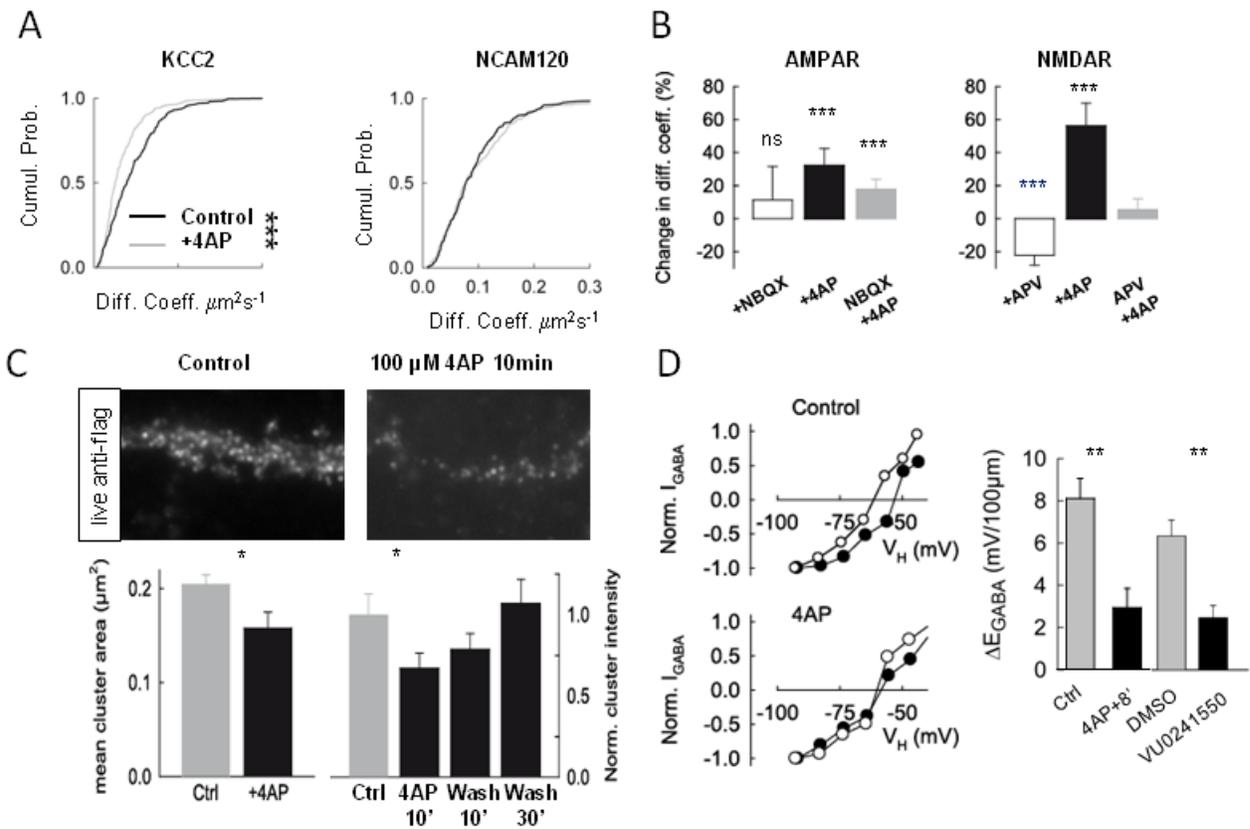


Figure 15. Une augmentation de l'excitabilité neuronale augmente la diffusion, diminue l'agrégation et la fonction de KCC2. **A**, Distributions cumulées des coefficients de diffusion de KCC2-Flag (à gauche) ou de la NCAM120 (à droite) en conditions contrôles (lignes grises) ou en conditions d'hyperexcitabilité induite par la 4-AP (100 μ M, lignes pleines noires). n QDs KCC2, Ctrl, 290, 4-AP, 306 ; 3 expériences différentes. Kolmogorov-Smirnov test $***p < 0.001$. n QDs NCAM120, Ctrl, 241, 4-AP, 228 ; 2 expériences différentes. Kolmogorov-Smirnov test $p = 0.5$. La 4-AP augmente la diffusion de KCC2 mais pas de NCAM120. **B**, L'effet de l'hyperexcitabilité sur la diffusion de KCC2 dépend de l'activité du RNMDA mais pas du RAMPA. Les neurones étaient exposés au 4-AP (noir), ou à l'antagoniste sélectif du RNMDA (APV) ou du RAMPA (NBQX) seuls (blanc) ou en présence de 4-AP (gris). Les résultats sont exprimés en pourcentage de changement des coefficients de diffusion par rapport à la condition contrôle. L'APV mais pas le NBQX reverse l'effet de la 4-AP sur la diffusion de KCC2-Flag. Noter que l'APV diminue également la diffusion de KCC2 en conditions basales. RAMPA, n QDs, Ctrl, 366, 4-AP, 360 ; NBQX, 220, 4-AP+NBQX, 335 ; 4 expériences différentes. Mann-Whitney rank sum test $***p < 0.001$. RNMDA, n QDs, Ctrl, 391, 4-AP, 335 ; APV, 322, 4-AP+APV, 344 ; 3 expériences différentes. Mann-Whitney rank sum test $***p < 0.001$. **C**, En haut, immunodétection de l'étiquette Flag à la surface des neurones maintenus en conditions contrôles ou après 10 min d'exposition à la 4-AP. Bas, réduction de la surface (à gauche) et de l'intensité de fluorescence (à droite) des agrégats de KCC2-Flag après 10 min d'exposition au 4-AP (noir) comparé aux neurones maintenus en condition contrôle (gris). Les effets de la 4-AP sur la dispersion des agrégats de KCC2 étaient réversibles en 30 min. n cellules, Ctrl, 45, 4-AP 10min, 49 ; Lavage 4-AP 10 min, 46, Lavage 4-AP 30 min, 42 ; 3 expériences différentes. Mann-Whitney rank sum test $*p < 0.05$. **D**, A gauche, l'augmentation d'activité neuronale par la 4-AP diminue la capacité d'extrusion des ions Cl^- du transporteur. Mesure du gradient de chlore somato-dendritique. Exemples de courants obtenus par des sauts de voltage entre -95 et -35 mV et les courbes I/V normalisées correspondantes dans les neurones exposés ou non au 4-AP. En condition contrôle, les courbes I/V mesurées sur les dendrites (ronds blancs) sont décalées vers la gauche en comparaison avec les courbes I/V enregistrées sur le soma (ronds noirs). Noter que l'exposition au 4-AP supprime le décalage des courbes I/V normalisées indiquant une réduction significative de l'extrusion des ions Cl^- . A droite, résumé des résultats montrant une réduction du gradient de chlore somato-dendritique après exposition des neurones à la 4-AP ou au VU0240551 (6 μ M) ($p < 0.005$). $n = 10$ à 12 cells pour chaque condition.

Conclusions et perspectives

Ce travail correspond à la première caractérisation de la dynamique membranaire d'un transporteur ionique.

Nos résultats suggèrent que :

- l'agrégation du transporteur répond à un mécanisme de diffusion-capture.
- la capture du transporteur KCC2 par le cytosquelette d'actine via son domaine CTD et son interaction avec 4.1N rend compte de son accumulation près des synapses excitatrices,
- des mécanismes distincts sont probablement responsables de l'agrégation de KCC2 à la périphérie des synapses excitatrices et des synapses inhibitrices. Il faudrait tester le rôle des microtubules et des radeaux lipidiques dans l'accumulation de KCC2 près des synapses inhibitrices.

- l'hyperexcitabilité, en régulant rapidement la diffusion, l'agrégation, et l'endocytose de KCC2, diminue l'efficacité de la signalisation GABAergique. En condition d'hyperactivité, l'activation du RNMDA augmente la diffusion, réduit le confinement et l'agrégation de KCC2. Le transporteur serait alors libre d'être internalisé, ce qui engendrerait une diminution des capacités d'extrusion du chlore des neurones et une réponse dépolarisante des RGABAA. Il faut noter que l'hyperactivité altère à la fois la stabilité membranaire de KCC2 et le maintien du RGABAA et de la géphyrine aux synapses (voir paragraphe 2.4.2.2). Ces effets pourraient s'additionner pour affaiblir la transmission inhibitrice GABAergique (**figure 16**).
- l'agrégation ne constitue pas le mécanisme clef de la régulation de la fonction du transporteur. L'homéostasie du chlore serait contrôlée par la disponibilité membranaire (endocytose) du transporteur.
- KCC2 a un rôle spécifique aux synapses excitatrices (voir ci-dessous).

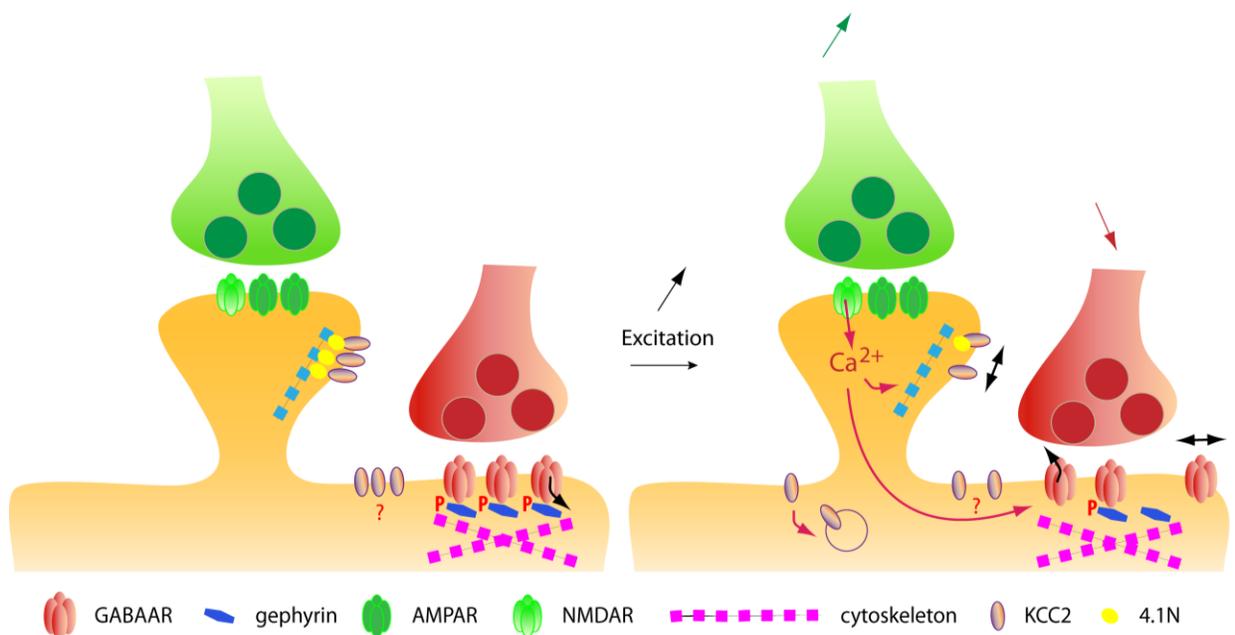


Figure 16. En condition d'hyperactivité, l'activation du RNMDA augmente la diffusion, réduit le confinement et l'agrégation de KCC2. Le transporteur serait alors libre d'être internalisé, ce qui engendrerait une diminution des capacités d'extrusion du chlore des neurones et une réponse dépolarisante des RGABAA. Il faut noter que l'hyperactivité altère à la fois la stabilité membranaire de KCC2 et le maintien du RGABAA et de la géphyrine aux synapses. Ces effets doivent s'additionner pour affaiblir la transmission inhibitrice GABAergique.

2.5.4. Rôle de KCC2 dans les épines dendritiques

L'enrichissement et le confinement de KCC2 dans les épines dendritiques posent la question de sa fonction dans la morphogenèse des épines dendritiques et dans la formation des synapses excitatrices glutamatergiques. L'invalidation du gène de KCC2 compromet la maturation des épines et la formation des synapses excitatrices [181]. Cet effet est indépendant de l'activité de KCC2 et implique l'interaction de KCC2 avec le domaine FERM de 4.1N [181]. Nous avons observé que l'expression membranaire de KCC2 atteint un niveau maximal après l'étape de formation des épines. Nous avons donc étudié le rôle de KCC2 dans le maintien des épines et dans sa fonction aux synapses excitatrices dans des neurones matures. En utilisant une approche shRNA, nous avons montré que bien que KCC2 est nécessaire pour la maturation des épines dans les neurones en développement, le transporteur n'est pas requis pour le maintien des épines dans les neurones matures. En revanche, la suppression de KCC2 dans les neurones matures augmentait significativement le volume des épines. Pour le maintien de l'homéostasie des ions et de l'eau, l'activité du transporteur KCC2 cause l'extrusion de 500 molécules d'eau par ion K⁺ et Cl⁻ transportés (références dans [161], **figure 10**). L'utilisation d'un inhibiteur sélectif du transporteur, le VU0240551 [199], mimait les effets du shRNA de KCC2 sur le volume des épines. En revanche, un empêchement de l'interaction KCC2-4.1 N-actine en surexprimant le domaine CTD de KCC2 n'augmentait pas le volume des épines dendritiques. Ceci signifie donc que les mouvements de molécules d'eau associés aux mouvements d'ions au travers de KCC2 influent sur le volume des épines.

Une augmentation du diamètre des épines dendritiques s'accompagne généralement d'une augmentation de l'efficacité des synapses glutamatergiques. De manière surprenante, nous avons observé l'effet opposé. La suppression de KCC2 causait une réduction significative de l'amplitude des courants miniatures excitateurs médiés par les RAMPs et une perte de l'agrégation de la sous-unité GluA1 du RAMP des épines. Outre leurs propriétés de transport d'ions, des pompes, des échangeurs et des transporteurs ioniques participent à l'ancrage du cytosquelette d'actine à la membrane plasmique (références dans [200]). Ils ancrent les filaments d'actine à la membrane plasmique via des interactions avec des protéines de liaison de la famille de l'ankyrine et 4.1. Par exemple, l'échangeur d'anion 1 AE1 régule la forme de l'érythrocyte en liant l'actine à la membrane plasmique via l'ankyrine et 4.1R [201]. Nous nous sommes donc posé la question d'un rôle de KCC2 via son CTD dans l'organisation du cytosquelette d'actine et par conséquent dans la régulation de l'efficacité de la transmission synaptique glutamatergique. Nos résultats ont montré que la surexpression du CTD mais pas le

blocage de l'activité du transporteur avec le VU0240551 mimait les effets de la suppression de l'expression de KCC2 sur les courants glutamatergiques et l'agrégation synaptique de GluA1. La régulation de la densité de GluA1 dans les épines fait donc appel aux propriétés de liaison du CTD de KCC2 au cytosquelette.

La diffusion latérale est un paramètre clef de la régulation du nombre de RAMPA dans les épines [202]. Nous avons testé l'hypothèse que l'enrichissement de KCC2 dans les épines dendritiques contribue à limiter la diffusion du RAMPA. La suppression de KCC2 induisait une augmentation sélective de la diffusion de la fraction mobile apparentée à la fraction extrasynaptique des GluA1 dans l'épine. Ceci s'accompagnait dans certains cas, d'un échappement de GluA1 de l'épine alors que cela n'était jamais observé, dans nos conditions d'enregistrement, dans les neurones exposés au shRNA contrôle. Par ailleurs, la diffusion des récepteurs lents « synaptiques » n'était pas modifiée à la suite d'une délétion de KCC2. Ceci suggérait que KCC2 n'intervient pas directement dans l'ancrage synaptique du RAMPA. Le nombre de récepteur synaptique dépend d'un équilibre dans les échanges entre les récepteurs synaptiques et extrasynaptiques. Une diminution de la densité extrasynaptique en récepteurs perturberait cet équilibre en faveur d'une sortie plus importante des récepteurs des synapses, ce qui contribuerait alors à réduire la densité synaptique en récepteurs.

Quid du mécanisme de régulation par KCC2 du contenu en RAMPA dans l'épine ? Nous avons voulu savoir si KCC2 contraint GluA1 dans l'épine par encombrement stérique. Ce n'est probablement pas le cas. En effet, la diffusion de la NCAM 120, une protéine membranaire sans domaine intracellulaire et ancrée dans la membrane par un ancrage GPI [198], n'était pas modifiée après suppression de l'expression de KCC2. La protéine 4.1N lie à la fois KCC2 et GluA1 [203]. Nous avons alors adressé la question d'un complexe reliant KCC2, GluA1 et 4.1N. Si tel était le cas, KCC2 contraindrait sélectivement GluA1 et pas d'autres protéines transmembranaires dans l'épine. Or, la diffusion de la NCAM 180, une protéine transmembranaire munie d'un court domaine intracellulaire qui interagit avec le cytosquelette d'actine via la β 1-spectrine [198] était également augmentée après délétion de KCC2. KCC2 restreint donc la diffusion de toutes les protéines transmembranaires avec un domaine intracellulaire capable d'interagir avec le cytosquelette. Ces résultats nous ont permis de proposer que KCC2, en contribuant à l'ancrage sous-membranaire de l'actine dans les épines, gêne la diffusion des protéines à domaine transmembranaire capable d'interagir avec l'actine. Nos résultats prédisent également que la suppression de KCC2 dans les neurones matures agit

de manière homéostatique pour réduire simultanément l'efficacité des synapses excitatrices et inhibitrices (figure 17). Ce travail a fait l'objet d'un article dans PNAS [173].

Perspectives

- L'impact de la suppression de l'expression de KCC2 sur la signalisation glutamatergique prédit que l'absence de KCC2 devrait interférer avec l'induction et/ou la l'expression de la LTP. Nous testerons les effets de la suppression de KCC2 sur l'agrégation du RNMDA et la translocation de la CAMKII dans les épines dendritiques.
- Une augmentation de l'activité induit l'exocytose des RAMPAs contenant GluA1. L'interaction de GluA1 avec 4.1N est requise dans cette régulation [203]. La redistribution de l'actine et de 4.1N en absence de KCC2 préviendrait l'expression de la LTP en entravant l'exocytose de GluA1. Nous évaluerons i) en microscopie STED (*stimulated-emission-depletion*) la réorganisation de l'actine filamenteuse et de 4.1N dans les épines dendritiques après suppression de l'expression de KCC2, et ii) nous suivrons l'exocytose de la sous-unité GluA1 recombinante couplée à la pHluorine au cours de la LTP après déletion de KCC2 par shRNA ou de l'interaction KCC2-4.1N avec le CTD de KCC2.

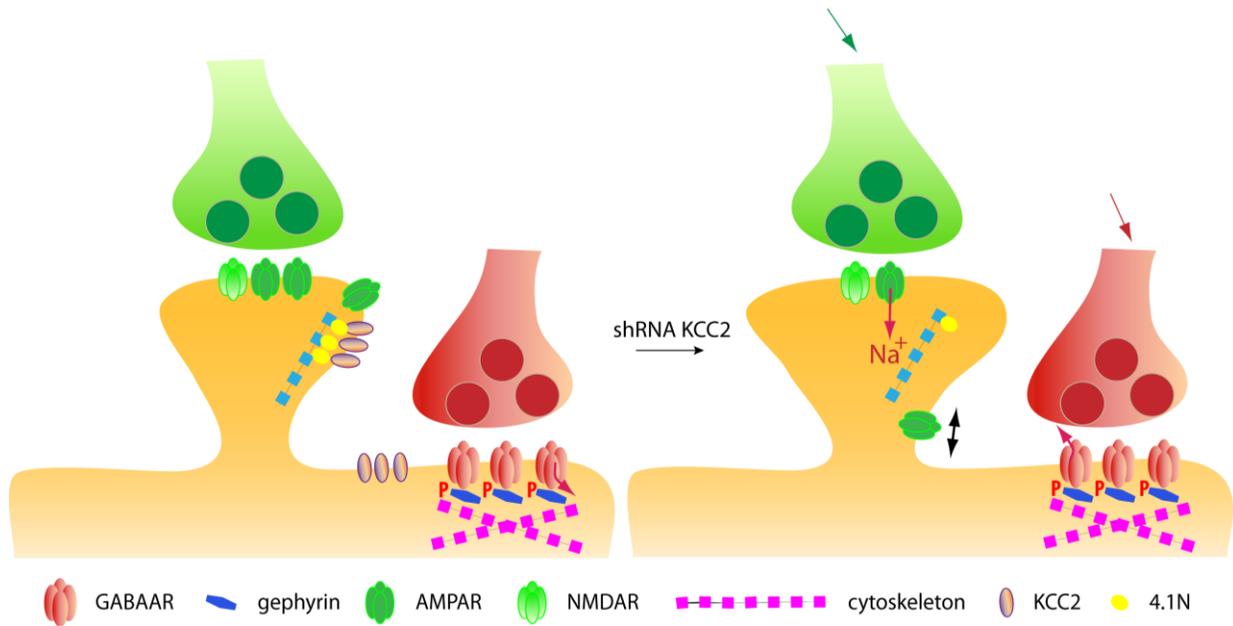


Figure 17. La délétion de KCC2 conduit à une augmentation du volume de la tête de l'épine et à une diminution de l'ancrage sous-membranaire de l'actine. La désorganisation de l'actine sous-membranaire engendrerait une fuite des RAMPA mobiles des épines, et perturberait l'équilibre entre les récepteurs extrasynaptiques et synaptiques en faveur d'une déplétion progressive des RAMPA des synapses. La perte de l'expression de KCC2 mènerait alors à une régulation homéostatique des signalisations GABAergiques et glutamatergiques.

3. Développements futurs

3.1. Régulation locale de KCC2 par l'activité neuronale excitatrice

Nous avons observé qu'une élévation transitoire de l'excitation par la 4-AP augmente rapidement la diffusion membranaire de KCC2, réduisant ainsi son agrégation. Or, ces conditions d'activation sont loin d'être physiologiques car elles ont recours à une stimulation forte et globale du réseau neuronal. Nous testerons au contraire l'hypothèse d'une modulation locale de la mobilité du transporteur par l'activité neuronale intrinsèque ou postsynaptique et nous en mesurerons l'impact sur l'agrégation de KCC2, sa fonction d'extrusion des ions chlorure et sur son rôle d'ancrage du cytosquelette d'actine. L'effet de l'activité intrinsèque (dépolariation) sera évalué en photo-activant localement la channelrhodopsin 2 sur une région dendritique (approx. 10 μm) d'un neurone exprimant la protéine KCC2-Flag recombinante. L'effet de l'activité synaptique sera quant à lui analysé en induisant des réponses postsynaptiques (uniques ou répétées) au niveau de synapses individuelles par photolyse locale (5 μm) de glutamate cagé (MNI-glutamate). Dans ces expériences, les propriétés diffusives du transporteur seront quantifiées en SPT avant et à différents temps après photo-stimulation. Les effets d'une dépolariation locale ou d'une élévation locale de l'activité synaptique seront évalués sur l'agrégation de KCC2, sa fonction d'extrusion des ions chlorure et sur son rôle d'ancrage du cytosquelette d'actine. L'agrégation de KCC2 sera étudiée en vidéomicroscopie avec un KCC2 recombinant couplé à la pHuorine. Les changements locaux en $[\text{Cl}^-]_{\text{in}}$ seront mesurés en imagerie du chlore avec la sonde ratiométrique CFP-YFP. Bien que les vitesses de diffusion intracellulaire du chlore ne sont pas connues, il est probable que les effets d'une augmentation locale en $[\text{Cl}^-]_{\text{in}}$ à la suite d'une perte de l'agrégation de KCC2 disparaissent rapidement. Nos expériences permettront d'élucider ce point. Les réarrangements du cytosquelette d'actine seront étudiés en suivant en videomicroscopie la réorganisation de l'actine filamenteuse dans des neurones exprimant le plasmide pLifeAct-YFP. Puis, nous déterminerons les mécanismes moléculaires qui sous-tendent ces effets. La déphosphorylation de Ser940 et la phosphorylation de Tyr903/1087 de KCC2 par l'activité réduisent la stabilité membranaire de KCC2 en induisant son internalisation et sa dégradation dans les lysosomes [194,197]. Nous évaluerons l'implication de ces sites de phosphorylation sur la régulation de la dynamique membranaire de KCC2 en exprimant des protéines recombinantes mutées pour les sites consensus de phosphorylation.

3.2. Régulation de KCC2 par la signalisation inhibitrice

Puis, nous déterminerons le rôle de la transmission inhibitrice GABAergique dans la régulation de la dynamique membranaire (SPT) et de l'agrégation (vidéomicroscopie de KCC2-pHluorine) de KCC2. Pour cela, des neurones d'hippocampe seront transitoirement exposés dans le bain à l'agoniste du RGABAA, le muscimol et/ou à l'agoniste des RGABAB, le baclofen, en présence de tétradotoxine pour bloquer la libération synaptique en neurotransmetteur dépendante du potentiel d'action et éviter ainsi un effet indirect sur l'excitation. Les effets de ces traitements seront analysés sur la diffusion (SPT), l'agrégation (vidéomicroscopie de KCC2-pHluorine), la stabilité membranaire de KCC2 (biotinylation de surface, SDS-PAGE et Western blot), ainsi que sur sa fonction de transport de chlore (imagerie du chlore ou gradient de chlore somato-dendritique mesuré en patch-clamp) et d'organisation du cytosquelette d'actine (vidéomicroscopie de LifeAct-YFP). Au cas où KCC2 serait modulé par ces traitements, nous étudierons l'impact d'une régulation locale par photolyse de Rubi-GABA.

3.3. Identification de nouveaux partenaires de KCC2

Nous chercherons les partenaires potentiels de KCC2. Pour cela, nous purifierons par immunoprécipitation les protéines associées au transporteur et les identifieront par spectrométrie de masse et protéomique. Puis, nous déterminerons le rôle des partenaires nouvellement identifiés dans la diffusion (SPT), l'agrégation (vidéomicroscopie de KCC2-pHluorine), la stabilité membranaire de KCC2 (biotinylation de surface, SDS-PAGE et Western blot), sa fonction de transport de chlore (imagerie du chlore ou gradient de chlore somato-dendritique) et d'organisation du cytosquelette d'actine (vidéomicroscopie de LifeAct-YFP) en supprimant leur expression par une approche shRNA dans les neurones d'hippocampe en culture.

3.4. Modulation par l'adénosine de la transmission GABAergique

L'adénosine module la transmission synaptique dans des conditions physiologiques et pathologiques. Bien que l'activation des récepteurs adrénérgiques A1 a un effet anticonvulsif [204], l'activation des récepteurs A2A promeut l'épilepsie dans des modèles animaux [205,206]. Les antagonistes des RA2A représentent donc des outils thérapeutiques prometteurs pour le traitement de l'épilepsie. Nous souhaitons élucider les mécanismes impliqués dans la régulation de la transmission GABAergique par les RA2A.

Des résultats préliminaires obtenus en collaboration avec l'équipe de C. Bernard à Marseille indiquent qu'un blocage chronique des RA2A par la caféine (antagoniste non sélectif des RA2A et RA1) ainsi qu'un antagoniste sélectif des RA2A (SCH58261) affaiblit la transmission synaptique GABAergique dans les neurones de l'hippocampe. Une diminution de l'efficacité des synapses inhibitrices reflèterait une disparition des récepteurs postsynaptiques déterminée par i) des altérations de leur diffusion et/ou de leur stabilité membranaire, ii) une diminution de la disponibilité de l'échafaudage moléculaire postsynaptique. Nous déterminerons si ces mécanismes sont impliqués dans la régulation par les RA2A de l'efficacité des synapses GABAergiques. A cette fin, nous testerons si l'activation ou le blocage des RA2A par des agonistes et antagonistes sélectifs, le CGS21680 et le SCH58261, altèrent la diffusion latérale, l'agrégation et l'internalisation du RGABAA et la densité de géphyrine. La dynamique membranaire de KCC2 sera analysée en SPT, l'agrégation du RGABAA et de la géphyrine seront étudiés en vidéomicroscopie de la sous-unité $\gamma 2$ couplée à la pHLuorine et de la géphyrine couplée à DsRed. Le devenir des RGABAA en surface sera déterminé en utilisant des méthodes de biotinylation de surface couplées au SDS-PAGE et WB. Les mécanismes moléculaires sous-jacents seront ensuite adressés. Nous examinerons spécifiquement i) le rôle de l' adénylate cyclase, de la cascade de signalisation liée à la PKA [207], de l'état de phosphorylation des Ser408/409 du RGABAA par la PKA, et d'une interaction directe des RA2A avec RGABAA [208]. Enfin, nous évaluerons l'effet d'une activation ou d'un blocage des RA2A sur l'activité des réseaux neuronaux. Nos résultats suggèrent que l'activation des RA2A stabilise les RGABAAs aux synapses et ainsi potentie la signalisation GABAergique. Nous analyserons les effets d'une activation ou d'un blocage des RA2A sur les réseaux à partir d'enregistrements extracellulaires dans des cultures organotypiques d'hippocampe. Ces expériences nous permettront d'évaluer le potentiel des ligands des RA2A pour la prévention de l'épilepsie.

4. Bibliographie

1. Triller A, Cluzaud F, Pfeiffer F, Betz H, Korn H (1985) Distribution of glycine receptors at central synapses: an immunoelectron microscopy study. *J Cell Biol* 101: 683-688.
2. Kuhse J, Laube B, Magalei D, Betz H (1993) Assembly of the inhibitory glycine receptor: identification of amino acid sequence motifs governing subunit stoichiometry. *Neuron* 11: 1049-1056.
3. Grudzinska J, Schemm R, Haeger S, Nicke A, Schmalzing G, et al. (2005) The beta subunit determines the ligand binding properties of synaptic glycine receptors. *Neuron* 45: 727-739.
4. Bohlhalter S, Weinmann O, Mohler H, Fritschy JM (1996) Laminar compartmentalization of GABAA-receptor subtypes in the spinal cord: an immunohistochemical study. *J Neurosci* 16: 283-297.
5. Bohlhalter S, Mohler H, Fritschy JM (1994) Inhibitory neurotransmission in rat spinal cord: colocalization of glycine- and GABAA-receptors at GABAergic synaptic contacts demonstrated by triple immunofluorescence staining. *Brain Res* 642: 59-69.
6. Todd AJ, Watt C, Spike RC, Sieghart W (1996) Colocalization of GABA, glycine, and their receptors at synapses in the rat spinal cord. *J Neurosci* 16: 974-982.
7. Sagne C, El Mestikawy S, Isambert MF, Hamon M, Henry JP, et al. (1997) Cloning of a functional vesicular GABA and glycine transporter by screening of genome databases. *FEBS Lett* 417: 177-183.
8. McIntire SL, Reimer RJ, Schuske K, Edwards RH, Jorgensen EM (1997) Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature* 389: 870-876.
9. Jonas P, Bischofberger J, Sandkuhler J (1998) Corelease of two fast neurotransmitters at a central synapse. *Science* 281: 419-424.
10. Shrivastava AN, Triller A, Sieghart W, Sarto-Jackson I (2011) Regulation of GABA(A) receptor dynamics by interaction with purinergic P2X(2) receptors. *J Biol Chem* 286: 14455-14468.
11. Triller A, Cluzaud F, Korn H (1987) gamma-Aminobutyric acid-containing terminals can be apposed to glycine receptors at central synapses. *J Cell Biol* 104: 947-956.
12. Levi S, Schweizer C, Bannai H, Pascual O, Charrier C, et al. (2008) Homeostatic regulation of synaptic GlyR numbers driven by lateral diffusion. *Neuron* 59: 261-273.
13. Dumoulin A, Levi S, Riveau B, Gasnier B, Triller A (2000) Formation of mixed glycine and GABAergic synapses in cultured spinal cord neurons. *Eur J Neurosci* 12: 3883-3892.
14. Meyer G, Kirsch J, Betz H, Langosch D (1995) Identification of a gephyrin binding motif on the glycine receptor beta subunit. *Neuron* 15: 563-572.
15. Tretter V, Jacob TC, Mukherjee J, Fritschy JM, Pangalos MN, et al. (2008) The clustering of GABA(A) receptor subtypes at inhibitory synapses is facilitated via the direct binding of receptor alpha 2 subunits to gephyrin. *J Neurosci* 28: 1356-1365.
16. Saiepour L, Fuchs C, Patrizi A, Sassoe-Pognetto M, Harvey RJ, et al. (2010) Complex role of collybistin and gephyrin in GABAA receptor clustering. *J Biol Chem* 285: 29623-29631.
17. Mukherjee J, Kretschmannova K, Gouzer G, Maric HM, Ramsden S, et al. (2011) The residence time of GABA(A)Rs at inhibitory synapses is determined by direct binding of the receptor alpha1 subunit to gephyrin. *J Neurosci* 31: 14677-14687.
18. Tretter V, Kerschner B, Milenkovic I, Ramsden SL, Ramerstorfer J, et al. (2011) Molecular basis of the gamma-aminobutyric acid A receptor alpha3 subunit interaction with the clustering protein gephyrin. *J Biol Chem* 286: 37702-37711.
19. Kirsch J, Wolters I, Triller A, Betz H (1993) Gephyrin antisense oligonucleotides prevent glycine receptor clustering in spinal neurons. *Nature* 366: 745-748.

20. Feng G, Tintrup H, Kirsch J, Nichol MC, Kuhse J, et al. (1998) Dual requirement for gephyrin in glycine receptor clustering and molybdoenzyme activity. *Science* 282: 1321-1324.
21. Levi S, Logan SM, Tovar KR, Craig AM (2004) Gephyrin is critical for glycine receptor clustering but not for the formation of functional GABAergic synapses in hippocampal neurons. *J Neurosci* 24: 207-217.
22. Essrich C, Lorez M, Benson JA, Fritschy JM, Luscher B (1998) Postsynaptic clustering of major GABAA receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin. *Nat Neurosci* 1: 563-571.
23. Kneussel M, Brandstatter JH, Laube B, Stahl S, Muller U, et al. (1999) Loss of postsynaptic GABA(A) receptor clustering in gephyrin-deficient mice. *J Neurosci* 19: 9289-9297.
24. Fischer F, Kneussel M, Tintrup H, Haverkamp S, Rauen T, et al. (2000) Reduced synaptic clustering of GABA and glycine receptors in the retina of the gephyrin null mutant mouse. *J Comp Neurol* 427: 634-648.
25. Jacob TC, Bogdanov YD, Magnus C, Saliba RS, Kittler JT, et al. (2005) Gephyrin regulates the cell surface dynamics of synaptic GABAA receptors. *J Neurosci* 25: 10469-10478.
26. Yu W, Jiang M, Miralles CP, Li RW, Chen G, et al. (2007) Gephyrin clustering is required for the stability of GABAergic synapses. *Mol Cell Neurosci* 36: 484-500.
27. Kirsch J, Langosch D, Prior P, Littauer UZ, Schmitt B, et al. (1991) The 93-kDa glycine receptor-associated protein binds to tubulin. *J Biol Chem* 266: 22242-22245.
28. Mammoto A, Sasaki T, Asakura T, Hotta I, Imamura H, et al. (1998) Interactions of drebrin and gephyrin with profilin. *Biochem Biophys Res Commun* 243: 86-89.
29. Giesemann T, Schwarz G, Nawrotzki R, Berhorster K, Rothkegel M, et al. (2003) Complex formation between the postsynaptic scaffolding protein gephyrin, profilin, and Mena: a possible link to the microfilament system. *J Neurosci* 23: 8330-8339.
30. Tretter V, Moss SJ (2008) GABA(A) Receptor Dynamics and Constructing GABAergic Synapses. *Front Mol Neurosci* 1: 7.
31. Colin I, Rostaing P, Triller A (1996) Gephyrin accumulates at specific plasmalemma loci during neuronal maturation in vitro. *J Comp Neurol* 374: 467-479.
32. Levi S, Chesnoy-Marchais D, Sieghart W, Triller A (1999) Synaptic control of glycine and GABA(A) receptors and gephyrin expression in cultured motoneurons. *J Neurosci* 19: 7434-7449.
33. Kirsch J, Betz H (1998) Glycine-receptor activation is required for receptor clustering in spinal neurons. *Nature* 392: 717-720.
34. Levi S, Vannier C, Triller A (1998) Strychnine-sensitive stabilization of postsynaptic glycine receptor clusters. *J Cell Sci* 111 (Pt 3): 335-345.
35. Sanes JR, Lichtman JW (1999) Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu Rev Neurosci* 22: 389-442.
36. Escher G, Bechade C, Levi S, Triller A (1996) Axonal targeting of agrin in cultured rat dorsal horn neurons. *J Cell Sci* 109 (Pt 13): 2959-2966.
37. Sieghart W, Sperk G (2002) Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. *Curr Top Med Chem* 2: 795-816.
38. Henry MD, Campbell KP (1999) Dystroglycan inside and out. *Curr Opin Cell Biol* 11: 602-607.
39. Blake DJ, Kroger S (2000) The neurobiology of duchenne muscular dystrophy: learning lessons from muscle? *Trends Neurosci* 23: 92-99.
40. Pilgram GS, Potikanond S, Baines RA, Fradkin LG, Noordermeer JN The roles of the dystrophin-associated glycoprotein complex at the synapse. *Mol Neurobiol* 41: 1-21.
41. Waite A, Tinsley CL, Locke M, Blake DJ (2009) The neurobiology of the dystrophin-associated glycoprotein complex. *Ann Med* 41: 344-359.

42. Levi S, Grady RM, Henry MD, Campbell KP, Sanes JR, et al. (2002) Dystroglycan is selectively associated with inhibitory GABAergic synapses but is dispensable for their differentiation. *J Neurosci* 22: 4274-4285.
43. Craig AM, Kang Y (2007) Neurexin-neurologin signaling in synapse development. *Curr Opin Neurobiol* 17: 43-52.
44. Hoon M, Soykan T, Falkenburger B, Hammer M, Patrizi A, et al. (2011) Neurologin-4 is localized to glycinergic postsynapses and regulates inhibition in the retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 3053-3058.
45. Hoon M, Bauer G, Fritschy JM, Moser T, Falkenburger BH, et al. (2009) Neurologin 2 controls the maturation of GABAergic synapses and information processing in the retina. *J Neurosci* 29: 8039-8050.
46. Pouloupoulos A, Aramuni G, Meyer G, Soykan T, Hoon M, et al. (2009) Neurologin 2 drives postsynaptic assembly at perisomatic inhibitory synapses through gephyrin and collybistin. *Neuron* 63: 628-642.
47. Xiang S, Kim EY, Connelly JJ, Nassar N, Kirsch J, et al. (2006) The crystal structure of Cdc42 in complex with collybistin II, a gephyrin-interacting guanine nucleotide exchange factor. *J Mol Biol* 359: 35-46.
48. Papadopoulos T, Korte M, Eulenburg V, Kubota H, Retiounskaia M, et al. (2007) Impaired GABAergic transmission and altered hippocampal synaptic plasticity in collybistin-deficient mice. *EMBO J* 26: 3888-3899.
49. Papadopoulos T, Eulenburg V, Reddy-Alla S, Mansuy IM, Li Y, et al. (2008) Collybistin is required for both the formation and maintenance of GABAergic postsynapses in the hippocampus. *Mol Cell Neurosci* 39: 161-169.
50. Sumita K, Sato Y, Iida J, Kawata A, Hamano M, et al. (2007) Synaptic scaffolding molecule (S-SCAM) membrane-associated guanylate kinase with inverted organization (MAGI)-2 is associated with cell adhesion molecules at inhibitory synapses in rat hippocampal neurons. *J Neurochem* 100: 154-166.
51. Panzanelli P, Gunn BG, Schlatter MC, Benke D, Tyagarajan SK, et al. Distinct mechanisms regulate GABAA receptor and gephyrin clustering at perisomatic and axo-axonic synapses on CA1 pyramidal cells. *J Physiol* 589: 4959-4980.
52. Chubykin AA, Atasoy D, Etherton MR, Brose N, Kavalali ET, et al. (2007) Activity-dependent validation of excitatory versus inhibitory synapses by neurologin-1 versus neurologin-2. *Neuron* 54: 919-931.
53. Thyagarajan A, Ting AY Imaging activity-dependent regulation of neurexin-neurologin interactions using trans-synaptic enzymatic biotinylation. *Cell* 143: 456-469.
54. Specht CG, Triller A (2008) The dynamics of synaptic scaffolds. *Bioessays* 30: 1062-1074.
55. Ashby MC, De La Rue SA, Ralph GS, Uney J, Collingridge GL, et al. (2004) Removal of AMPA receptors (AMPA receptors) from synapses is preceded by transient endocytosis of extrasynaptic AMPARs. *J Neurosci* 24: 5172-5176.
56. Passafaro M, Piech V, Sheng M (2001) Subunit-specific temporal and spatial patterns of AMPA receptor exocytosis in hippocampal neurons. *Nat Neurosci* 4: 917-926.
57. Rosenberg M, Meier J, Triller A, Vannier C (2001) Dynamics of glycine receptor insertion in the neuronal plasma membrane. *J Neurosci* 21: 5036-5044.
58. Tovar KR, Westbrook GL (2002) Mobile NMDA receptors at hippocampal synapses. *Neuron* 34: 255-264.
59. Tanaka J, Matsuzaki M, Tarusawa E, Momiyama A, Molnar E, et al. (2005) Number and density of AMPA receptors in single synapses in immature cerebellum. *J Neurosci* 25: 799-807.
60. Rusakov DA, Harrison E, Stewart MG (1998) Synapses in hippocampus occupy only 1-2% of cell membranes and are spaced less than half-micron apart: a quantitative ultrastructural analysis with discussion of physiological implications. *Neuropharmacology* 37: 513-521.

61. Gardiol A, Racca C, Triller A (1999) Dendritic and postsynaptic protein synthetic machinery. *J Neurosci* 19: 168-179.
62. Racca C, Gardiol A, Triller A (1997) Dendritic and postsynaptic localizations of glycine receptor alpha subunit mRNAs. *J Neurosci* 17: 1691-1700.
63. Ehlers MD (2000) Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. *Neuron* 28: 511-525.
64. Blanpied TA, Scott DB, Ehlers MD (2002) Dynamics and regulation of clathrin coats at specialized endocytic zones of dendrites and spines. *Neuron* 36: 435-449.
65. Racz B, Blanpied TA, Ehlers MD, Weinberg RJ (2004) Lateral organization of endocytic machinery in dendritic spines. *Nat Neurosci* 7: 917-918.
66. Petralia RS, Wang YX, Wenthold RJ (2003) Internalization at glutamatergic synapses during development. *Eur J Neurosci* 18: 3207-3217.
67. Thomas P, Mortensen M, Hosie AM, Smart TG (2005) Dynamic mobility of functional GABAA receptors at inhibitory synapses. *Nat Neurosci* 8: 889-897.
68. Triller A, Choquet D (2008) New concepts in synaptic biology derived from single-molecule imaging. *Neuron* 59: 359-374.
69. Axelrod D, Koppel DE, Schlessinger J, Elson E, Webb WW (1976) Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys J* 16: 1055-1069.
70. Young SH, Poo MM (1983) Rapid lateral diffusion of extrajunctional acetylcholine receptors in the developing muscle membrane of *Xenopus* tadpole. *J Neurosci* 3: 225-231.
71. Charrier C, Ehrensperger MV, Dahan M, Levi S, Triller A (2006) Cytoskeleton regulation of glycine receptor number at synapses and diffusion in the plasma membrane. *J Neurosci* 26: 8502-8511.
72. Bannai H, Levi S, Schweizer C, Inoue T, Launey T, et al. (2009) Activity-dependent tuning of inhibitory neurotransmission based on GABAAR diffusion dynamics. *Neuron* 62: 670-682.
73. Meier J, Vannier C, Serge A, Triller A, Choquet D (2001) Fast and reversible trapping of surface glycine receptors by gephyrin. *Nat Neurosci* 4: 253-260.
74. Ehrensperger MV, Hanus C, Vannier C, Triller A, Dahan M (2007) Multiple association states between glycine receptors and gephyrin identified by SPT analysis. *Biophys J* 92: 3706-3718.
75. Renner M, Choquet D, Triller A (2009) Control of the postsynaptic membrane viscosity. *J Neurosci* 29: 2926-2937.
76. Howarth M, Takao K, Hayashi Y, Ting AY (2005) Targeting quantum dots to surface proteins in living cells with biotin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 7583-7588.
77. Howarth M, Ting AY (2008) Imaging proteins in live mammalian cells with biotin ligase and monovalent streptavidin. *Nat Protoc* 3: 534-545.
78. Bogdanov Y, Michels G, Armstrong-Gold C, Haydon PG, Lindstrom J, et al. (2006) Synaptic GABAA receptors are directly recruited from their extrasynaptic counterparts. *EMBO J* 25: 4381-4389.
79. Groc L, Lafourcade M, Heine M, Renner M, Racine V, et al. (2007) Surface trafficking of neurotransmitter receptor: comparison between single-molecule/quantum dot strategies. *J Neurosci* 27: 12433-12437.
80. Lata S, Gavutis M, Tampe R, Piehler J (2006) Specific and stable fluorescence labeling of histidine-tagged proteins for dissecting multi-protein complex formation. *J Am Chem Soc* 128: 2365-2372.
81. Sonleitner A, Mannuzzu LM, Terakawa S, Isacoff EY (2002) Structural rearrangements in single ion channels detected optically in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 12759-12764.
82. Boyer D, Tamarat P, Maali A, Lounis B, Orrit M (2002) Photothermal imaging of nanometer-sized metal particles among scatterers. *Science* 297: 1160-1163.

83. Fernandez-Suarez M, Ting AY (2008) Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 929-943.
84. Giannone G, Hosy E, Levet F, Constals A, Schulze K, et al. (2010) Dynamic superresolution imaging of endogenous proteins on living cells at ultra-high density. *Biophys J* 99: 1303-1310.
85. Bonneau S, Dahan M, Cohen LD (2005) Single quantum dot tracking based on perceptual grouping using minimal paths in a spatiotemporal volume. *IEEE Trans Image Process* 14: 1384-1395.
86. Saxton MJ, Jacobson K (1997) Single-particle tracking: applications to membrane dynamics. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 26: 373-399.
87. Kusumi A, Sako Y, Yamamoto M (1993) Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. *Biophys J* 65: 2021-2040.
88. Alcor D, Gouzer G, Triller A (2009) Single-particle tracking methods for the study of membrane receptors dynamics. *Eur J Neurosci* 30: 987-997.
89. Serge A, Fourgeaud L, Hemar A, Choquet D (2002) Receptor activation and homer differentially control the lateral mobility of metabotropic glutamate receptor 5 in the neuronal membrane. *J Neurosci* 22: 3910-3920.
90. Dahan M, Levi S, Luccardini C, Rostaing P, Riveau B, et al. (2003) Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking. *Science* 302: 442-445.
91. Bannai H, Levi S, Schweizer C, Dahan M, Triller A (2006) Imaging the lateral diffusion of membrane molecules with quantum dots. *Nat Protoc* 1: 2628-2634.
92. Mikasova L, Groc L, Choquet D, Manzoni OJ (2008) Altered surface trafficking of presynaptic cannabinoid type 1 receptor in and out synaptic terminals parallels receptor desensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 18596-18601.
93. Valentine CD, Haggie PM (2011) Confinement of beta(1)- and beta(2)-adrenergic receptors in the plasma membrane of cardiomyocyte-like H9c2 cells is mediated by selective interactions with PDZ domain and A-kinase anchoring proteins but not caveolae. *Mol Biol Cell* 22: 2970-2982.
94. Fernandes CC, Berg DK, Gomez-Varela D (2010) Lateral mobility of nicotinic acetylcholine receptors on neurons is determined by receptor composition, local domain, and cell type. *J Neurosci* 30: 8841-8851.
95. Burli T, Baer K, Ewers H, Sidler C, Fuhrer C, et al. (2010) Single particle tracking of alpha7 nicotinic AChR in hippocampal neurons reveals regulated confinement at glutamatergic and GABAergic perisynaptic sites. *PLoS One* 5: e11507.
96. Geng L, Zhang HL, Peng HB (2009) The formation of acetylcholine receptor clusters visualized with quantum dots. *BMC Neurosci* 10: 80.
97. Shrivastava AN, Triller A, Sieghart W, Sarto-Jackson I Regulation of GABA(A) receptor dynamics by interaction with purinergic P2X(2) receptors. *J Biol Chem* 286: 14455-14468.
98. Bats C, Groc L, Choquet D (2007) The interaction between Stargazin and PSD-95 regulates AMPA receptor surface trafficking. *Neuron* 53: 719-734.
99. Michaluk P, Mikasova L, Groc L, Frischknecht R, Choquet D, et al. (2009) Matrix metalloproteinase-9 controls NMDA receptor surface diffusion through integrin beta1 signaling. *J Neurosci* 29: 6007-6012.
100. Groc L, Choquet D, Chaouloff F (2008) The stress hormone corticosterone conditions AMPAR surface trafficking and synaptic potentiation. *Nat Neurosci* 11: 868-870.
101. Heine M, Groc L, Frischknecht R, Beique JC, Lounis B, et al. (2008) Surface mobility of postsynaptic AMPARs tunes synaptic transmission. *Science* 320: 201-205.

102. Heine M, Thoumine O, Mondin M, Tessier B, Giannone G, et al. (2008) Activity-independent and subunit-specific recruitment of functional AMPA receptors at neurexin/neurologin contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 20947-20952.
103. Ehlers MD, Heine M, Groc L, Lee MC, Choquet D (2007) Diffusional trapping of GluR1 AMPA receptors by input-specific synaptic activity. *Neuron* 54: 447-460.
104. Bard L, Sainlos M, Bouchet D, Cousins S, Mikasova L, et al. (2010) Dynamic and specific interaction between synaptic NR2-NMDA receptor and PDZ proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 19561-19566.
105. Groc L, Choquet D, Stephenson FA, Verrier D, Manzoni OJ, et al. (2007) NMDA receptor surface trafficking and synaptic subunit composition are developmentally regulated by the extracellular matrix protein Reelin. *J Neurosci* 27: 10165-10175.
106. Groc L, Heine M, Cousins SL, Stephenson FA, Lounis B, et al. (2006) NMDA receptor surface mobility depends on NR2A-2B subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 18769-18774.
107. Charrier C, Machado P, Tweedie-Cullen RY, Rutishauser D, Mansuy IM, et al. (2010) A crosstalk between beta1 and beta3 integrins controls glycine receptor and gephyrin trafficking at synapses. *Nat Neurosci* 13: 1388-1395.
108. Calamai M, Specht CG, Heller J, Alcor D, Machado P, et al. (2009) Gephyrin oligomerization controls GlyR mobility and synaptic clustering. *J Neurosci* 29: 7639-7648.
109. Specht CG, Grunewald N, Pascual O, Rostgaard N, Schwarz G, et al. (2011) Regulation of glycine receptor diffusion properties and gephyrin interactions by protein kinase C. *EMBO J* 30: 3842-3853.
110. Muir J, Arancibia-Carcamo IL, MacAskill AF, Smith KR, Griffin LD, et al. (2010) NMDA receptors regulate GABAA receptor lateral mobility and clustering at inhibitory synapses through serine 327 on the gamma2 subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 16679-16684.
111. Bouthour W, Leroy F, Emmanuelli C, Carnaud M, Dahan M, et al. (2011) A Human Mutation in Gabrg2 Associated with Generalized Epilepsy Alters the Membrane Dynamics of GABAA Receptors. *Cereb Cortex*.
112. Bouzigues C, Morel M, Triller A, Dahan M (2007) Asymmetric redistribution of GABA receptors during GABA gradient sensing by nerve growth cones analyzed by single quantum dot imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 11251-11256.
113. Renner M, Lacor PN, Velasco PT, Xu J, Contractor A, et al. (2010) Deleterious effects of amyloid beta oligomers acting as an extracellular scaffold for mGluR5. *Neuron* 66: 739-754.
114. Gerrow K, Triller A (2010) Synaptic stability and plasticity in a floating world. *Curr Opin Neurobiol* 20: 631-639.
115. Levi S, Triller A (2006) Neurotransmitter Dynamics.
116. Howarth M, Liu W, Puthenveetil S, Zheng Y, Marshall LF, et al. (2008) Monovalent, reduced-size quantum dots for imaging receptors on living cells. *Nat Methods* 5: 397-399.
117. Michalet X, Pinaud FF, Bentolila LA, Tsay JM, Doose S, et al. (2005) Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science* 307: 538-544.
118. Pinaud F, Michalet X, Bentolila LA, Tsay JM, Doose S, et al. (2006) Advances in fluorescence imaging with quantum dot bio-probes. *Biomaterials* 27: 1679-1687.
119. Kusumi A, Nakada C, Ritchie K, Murase K, Suzuki K, et al. (2005) Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 34: 351-378.
120. Renner ML, Cognet L, Lounis B, Triller A, Choquet D (2009) The excitatory postsynaptic density is a size exclusion diffusion environment. *Neuropharmacology* 56: 30-36.

121. Anderson RG, Jacobson K (2002) A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science* 296: 1821-1825.
122. Dietrich C, Yang B, Fujiwara T, Kusumi A, Jacobson K (2002) Relationship of lipid rafts to transient confinement zones detected by single particle tracking. *Biophys J* 82: 274-284.
123. Iino R, Koyama I, Kusumi A (2001) Single molecule imaging of green fluorescent proteins in living cells: E-cadherin forms oligomers on the free cell surface. *Biophys J* 80: 2667-2677.
124. Ribault C, Triller A, Sekimoto K (2007) Diffusion trajectory of an asymmetric object: information overlooked by the mean square displacement. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 75: 021112.
125. Hanus C, Vannier C, Triller A (2004) Intracellular association of glycine receptor with gephyrin increases its plasma membrane accumulation rate. *J Neurosci* 24: 1119-1128.
126. Nusser Z, Sieghart W, Stephenson FA, Somogyi P (1996) 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.
127. Nusser Z, Sieghart W, Somogyi P (1998) Segregation of different GABAA receptors to synaptic and extrasynaptic membranes of cerebellar granule cells. *J Neurosci* 18: 1693-1703.
128. Rossi DJ, Hamann M (1998) Spillover-mediated transmission at inhibitory synapses promoted by high affinity alpha6 subunit GABA(A) receptors and glomerular geometry. *Neuron* 20: 783-795.
129. Collingridge GL, Isaac JT, Wang YT (2004) Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 5: 952-962.
130. Pozo K, Goda Y Unraveling mechanisms of homeostatic synaptic plasticity. *Neuron* 66: 337-351.
131. Burrone J, Murthy VN (2003) Synaptic gain control and homeostasis. *Curr Opin Neurobiol* 13: 560-567.
132. Turrigiano GG (2008) The self-tuning neuron: synaptic scaling of excitatory synapses. *Cell* 135: 422-435.
133. Malinow R, Malenka RC (2002) AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 25: 103-126.
134. Turrigiano GG, Nelson SB (2000) Hebb and homeostasis in neuronal plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 10: 358-364.
135. Gaiarsa JL, Caillard O, Ben-Ari Y (2002) Long-term plasticity at GABAergic and glycinergic synapses: mechanisms and functional significance. *Trends Neurosci* 25: 564-570.
136. Gaiarsa JL, Ben-Ari Y (2006) Long-Term Plasticity at Inhibitory Synapses: A Phenomenon That Has Been Overlooked.
137. Zita MM, Marchionni I, Bottos E, Righi M, Del Sal G, et al. (2007) Post-phosphorylation prolyl isomerisation of gephyrin represents a mechanism to modulate glycine receptors function. *EMBO J* 26: 1761-1771.
138. Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M (1998) Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci* 1: 683-692.
139. Caillard O, Ben-Ari Y, Gaiarsa JL (1999) Long-term potentiation of GABAergic synaptic transmission in neonatal rat hippocampus. *J Physiol* 518 (Pt 1): 109-119.
140. Lu YM, Mansuy IM, Kandel ER, Roder J (2000) Calcineurin-mediated LTD of GABAergic inhibition underlies the increased excitability of CA1 neurons associated with LTP. *Neuron* 26: 197-205.
141. Chevaleyre V, Castillo PE (2003) Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: a novel role of endocannabinoids in regulating excitability. *Neuron* 38: 461-472.

142. Woodin MA, Ganguly K, Poo MM (2003) Coincident pre- and postsynaptic activity modifies GABAergic synapses by postsynaptic changes in Cl⁻ transporter activity. *Neuron* 39: 807-820.
143. Wang J, Liu S, Haditsch U, Tu W, Cochrane K, et al. (2003) Interaction of calcineurin and type-A GABA receptor gamma 2 subunits produces long-term depression at CA1 inhibitory synapses. *J Neurosci* 23: 826-836.
144. Chen QX, Wong RK (1995) Suppression of GABA_A receptor responses by NMDA application in hippocampal neurones acutely isolated from the adult guinea-pig. *J Physiol* 482 (Pt 2): 353-362.
145. Wang JH, Stelzer A (1996) Shared calcium signaling pathways in the induction of long-term potentiation and synaptic disinhibition in CA1 pyramidal cell dendrites. *J Neurophysiol* 75: 1687-1702.
146. Borgdorff AJ, Choquet D (2002) Regulation of AMPA receptor lateral movements. *Nature* 417: 649-653.
147. Tardin C, Cognet L, Bats C, Lounis B, Choquet D (2003) Direct imaging of lateral movements of AMPA receptors inside synapses. *EMBO J* 22: 4656-4665.
148. Groc L, Heine M, Cognet L, Brickley K, Stephenson FA, et al. (2004) Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of AMPA and NMDA receptors. *Nat Neurosci* 7: 695-696.
149. Sharma K, Fong DK, Craig AM (2006) Postsynaptic protein mobility in dendritic spines: long-term regulation by synaptic NMDA receptor activation. *Mol Cell Neurosci* 31: 702-712.
150. Makino H, Malinow R (2009) AMPA receptor incorporation into synapses during LTP: the role of lateral movement and exocytosis. *Neuron* 64: 381-390.
151. Alldred MJ, Mulder-Rosi J, Lingenfelter SE, Chen G, Luscher B (2005) Distinct gamma2 subunit domains mediate clustering and synaptic function of postsynaptic GABA_A receptors and gephyrin. *J Neurosci* 25: 594-603.
152. Schweizer C, Balsiger S, Bluethmann H, Mansuy IM, Fritschy JM, et al. (2003) The gamma 2 subunit of GABA(A) receptors is required for maintenance of receptors at mature synapses. *Mol Cell Neurosci* 24: 442-450.
153. Li RW, Yu W, Christie S, Miralles CP, Bai J, et al. (2005) Disruption of postsynaptic GABA receptor clusters leads to decreased GABAergic innervation of pyramidal neurons. *J Neurochem* 95: 756-770.
154. Kralic JE, Sidler C, Parpan F, Homanics GE, Morrow AL, et al. (2006) Compensatory alteration of inhibitory synaptic circuits in cerebellum and thalamus of gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha1 subunit knockout mice. *J Comp Neurol* 495: 408-421.
155. Studer R, von Boehmer L, Haenggi T, Schweizer C, Benke D, et al. (2006) Alteration of GABAergic synapses and gephyrin clusters in the thalamic reticular nucleus of GABA_A receptor alpha3 subunit-null mice. *Eur J Neurosci* 24: 1307-1315.
156. Winsky-Sommerer R, Knapman A, Fedele DE, Schofield CM, Vyazovskiy VV, et al. (2008) Normal sleep homeostasis and lack of epilepsy phenotype in GABA A receptor alpha3 subunit-knockout mice. *Neuroscience* 154: 595-605.
157. Eugene E, Depienne C, Baulac S, Baulac M, Fritschy JM, et al. (2007) GABA(A) receptor gamma 2 subunit mutations linked to human epileptic syndromes differentially affect phasic and tonic inhibition. *J Neurosci* 27: 14108-14116.
158. Ben-Ari Y (2002) Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* 3: 728-739.
159. Marty A, Llano I (2005) Excitatory effects of GABA in established brain networks. *Trends Neurosci* 28: 284-289.

160. Ben-Ari Y, Gaiarsa JL, Tyzio R, Khazipov R (2007) GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol Rev* 87: 1215-1284.
161. MacAulay N, Zeuthen T (2010) Water transport between CNS compartments: contributions of aquaporins and cotransporters. *Neuroscience* 168: 941-956.
162. Katchman AN, Vicini S, Hershkowitz N (1994) Mechanism of early anoxia-induced suppression of the GABAA-mediated inhibitory postsynaptic current. *J Neurophysiol* 71: 1128-1138.
163. van den Pol AN, Obrietan K, Chen G (1996) Excitatory actions of GABA after neuronal trauma. *J Neurosci* 16: 4283-4292.
164. Vale C, Sanes DH (2000) Afferent regulation of inhibitory synaptic transmission in the developing auditory midbrain. *J Neurosci* 20: 1912-1921.
165. Nabekura J, Ueno T, Okabe A, Furuta A, Iwaki T, et al. (2002) Reduction of KCC2 expression and GABAA receptor-mediated excitation after in vivo axonal injury. *J Neurosci* 22: 4412-4417.
166. Rivera C, Li H, Thomas-Crusells J, Lahtinen H, Viitanen T, et al. (2002) BDNF-induced TrkB activation down-regulates the K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 and impairs neuronal Cl⁻ extrusion. *J Cell Biol* 159: 747-752.
167. Coull JA, Boudreau D, Bachand K, Prescott SA, Nault F, et al. (2003) Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature* 424: 938-942.
168. Topolnik L, Steriade M, Timofeev I (2003) Hyperexcitability of intact neurons underlies acute development of trauma-related electrographic seizures in cats in vivo. *Eur J Neurosci* 18: 486-496.
169. Cohen I, Navarro V, Clemenceau S, Baulac M, Miles R (2002) On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. *Science* 298: 1418-1421.
170. Khalilov I, Holmes GL, Ben-Ari Y (2003) In vitro formation of a secondary epileptogenic mirror focus by interhippocampal propagation of seizures. *Nat Neurosci* 6: 1079-1085.
171. Huberfeld G, Wittner L, Clemenceau S, Baulac M, Kaila K, et al. (2007) Perturbed chloride homeostasis and GABAergic signaling in human temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 27: 9866-9873.
172. Watanabe M, Wake H, Moorhouse AJ, Nabekura J (2009) Clustering of neuronal K⁺-Cl⁻ cotransporters in lipid rafts by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 284: 27980-27988.
173. Gauvain G, Chamma I, Chevy Q, Cabezas C, Irinopoulou T, et al. (2011) The neuronal K-Cl cotransporter KCC2 influences postsynaptic AMPA receptor content and lateral diffusion in dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 15474-15479.
174. Chamma I, Chevy Q, Poncer JC, Levi S (2012) Role of the neuronal K-Cl co-transporter KCC2 in inhibitory and excitatory neurotransmission. *Front Cell Neurosci* 6: 5.
175. Gulyas AI, Sik A, Payne JA, Kaila K, Freund TF (2001) The KCl cotransporter, KCC2, is highly expressed in the vicinity of excitatory synapses in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 13: 2205-2217.
176. Bartho P, Payne JA, Freund TF, Acsady L (2004) Differential distribution of the KCl cotransporter KCC2 in thalamic relay and reticular nuclei. *Eur J Neurosci* 20: 965-975.
177. Takayama C, Inoue Y (2006) Developmental localization of potassium chloride cotransporter 2 in granule cells of the early postnatal mouse cerebellum with special reference to the synapse formation. *Neuroscience* 143: 757-767.
178. Blaesse P, Guillemain I, Schindler J, Schweizer M, Delpire E, et al. (2006) Oligomerization of KCC2 correlates with development of inhibitory neurotransmission. *J Neurosci* 26: 10407-10419.
179. Markova O, Mukhtarov M, Real E, Jacob Y, Bregestovski P (2008) Genetically encoded chloride indicator with improved sensitivity. *J Neurosci Methods* 170: 67-76.

180. Casula S, Shmukler BE, Wilhelm S, Stuart-Tilley AK, Su W, et al. (2001) A dominant negative mutant of the KCC1 K-Cl cotransporter: both N- and C-terminal cytoplasmic domains are required for K-Cl cotransport activity. *J Biol Chem* 276: 41870-41878.
181. Li H, Khirug S, Cai C, Ludwig A, Blaesse P, et al. (2007) KCC2 interacts with the dendritic cytoskeleton to promote spine development. *Neuron* 56: 1019-1033.
182. Baines AJ, Bennett PM, Carter EW, Terracciano C (2009) Protein 4.1 and the control of ion channels. *Blood Cells Mol Dis* 42: 211-215.
183. Banke TG, Gegelashvili G (2008) Tonic activation of group I mGluRs modulates inhibitory synaptic strength by regulating KCC2 activity. *J Physiol* 586: 4925-4934.
184. Chorin E, Vinograd O, Fleidervish I, Gilad D, Herrmann S, et al. (2011) Upregulation of KCC2 Activity by Zinc-Mediated Neurotransmission via the mZnR/GPR39 Receptor. *J Neurosci* 31: 12916-12926.
185. Reid KH, Li GY, Payne RS, Schurr A, Cooper NG (2001) The mRNA level of the potassium-chloride cotransporter KCC2 covaries with seizure susceptibility in inferior colliculus of the post-ischemic audiogenic seizure-prone rat. *Neurosci Lett* 308: 29-32.
186. Rivera C, Voipio J, Thomas-Crusells J, Li H, Emri Z, et al. (2004) Mechanism of activity-dependent downregulation of the neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2. *J Neurosci* 24: 4683-4691.
187. Pathak HR, Weissinger F, Terunuma M, Carlson GC, Hsu FC, et al. (2007) Disrupted dentate granule cell chloride regulation enhances synaptic excitability during development of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 27: 14012-14022.
188. Wake H, Watanabe M, Moorhouse AJ, Kanematsu T, Horibe S, et al. (2007) Early changes in KCC2 phosphorylation in response to neuronal stress result in functional downregulation. *J Neurosci* 27: 1642-1650.
189. Li X, Zhou J, Chen Z, Chen S, Zhu F, et al. (2008) Long-term expressional changes of Na⁺-K⁺-Cl⁻ co-transporter 1 (NKCC1) and K⁺-Cl⁻ co-transporter 2 (KCC2) in CA1 region of hippocampus following lithium-pilocarpine induced status epilepticus (PISE). *Brain Res* 1221: 141-146.
190. Shimizu-Okabe C, Tanaka M, Matsuda K, Mihara T, Okabe A, et al. (2011) KCC2 was downregulated in small neurons localized in epileptogenic human focal cortical dysplasia. *Epilepsy Res* 93: 177-184.
191. Fiumelli H, Woodin MA (2007) Role of activity-dependent regulation of neuronal chloride homeostasis in development. *Curr Opin Neurobiol* 17: 81-86.
192. Wang W, Gong N, Xu TL (2006) Downregulation of KCC2 following LTP contributes to EPSP-spike potentiation in rat hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun* 343: 1209-1215.
193. Kitamura A, Ishibashi H, Watanabe M, Takatsuru Y, Brodwick M, et al. (2008) Sustained depolarizing shift of the GABA reversal potential by glutamate receptor activation in hippocampal neurons. *Neurosci Res* 62: 270-277.
194. Lee HH, Deeb TZ, Walker JA, Davies PA, Moss SJ (2011) NMDA receptor activity downregulates KCC2 resulting in depolarizing GABA(A) receptor-mediated currents. *Nat Neurosci* 14: 736-743.
195. Wang W, Wang H, Gong N, Xu TL (2006) Changes of K⁺-Cl⁻ cotransporter 2 (KCC2) and circuit activity in propofol-induced impairment of long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Brain Res Bull* 70: 444-449.
196. Ludwig A, Uvarov P, Soni S, Thomas-Crusells J, Airaksinen MS, et al. (2011) Early growth response 4 mediates BDNF induction of potassium chloride cotransporter 2 transcription. *J Neurosci* 31: 644-649.
197. Lee HH, Jurd R, Moss SJ (2010) Tyrosine phosphorylation regulates the membrane trafficking of the potassium chloride co-transporter KCC2. *Mol Cell Neurosci* 45: 173-179.
198. Buttner B, Horstkorte R (2010) Intracellular ligands of NCAM. *Adv Exp Med Biol* 663: 55-66.

199. Delpire E, Days E, Lewis LM, Mi D, Kim K, et al. (2009) Small-molecule screen identifies inhibitors of the neuronal K-Cl cotransporter KCC2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 5383-5388.
200. Denker SP, Barber DL (2002) Ion transport proteins anchor and regulate the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 14: 214-220.
201. Jons T, Drenckhahn D (1992) Identification of the binding interface involved in linkage of cytoskeletal protein 4.1 to the erythrocyte anion exchanger. *EMBO J* 11: 2863-2867.
202. Ashby MC, Maier SR, Nishimune A, Henley JM (2006) Lateral diffusion drives constitutive exchange of AMPA receptors at dendritic spines and is regulated by spine morphology. *J Neurosci* 26: 7046-7055.
203. Shen L, Liang F, Walensky LD, Haganir RL (2000) Regulation of AMPA receptor GluR1 subunit surface expression by a 4. 1N-linked actin cytoskeletal association. *J Neurosci* 20: 7932-7940.
204. Boison D (2008) Adenosine as a neuromodulator in neurological diseases. *Curr Opin Pharmacol* 8: 2-7.
205. Zeraati M, Mirnajafi-Zadeh J, Fathollahi Y, Namvar S, Rezvani ME (2006) Adenosine A1 and A2A receptors of hippocampal CA1 region have opposite effects on piriform cortex kindled seizures in rats. *Seizure* 15: 41-48.
206. D'Alimonte I, D'Auro M, Citraro R, Biagioni F, Jiang S, et al. (2009) Altered distribution and function of A2A adenosine receptors in the brain of WAG/Rij rats with genetic absence epilepsy, before and after appearance of the disease. *Eur J Neurosci* 30: 1023-1035.
207. Jacobson KA, Gao ZG (2006) Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 5: 247-264.
208. Shrivastava AN, Triller A, Sieghart W (2011) GABA(A) Receptors: Post-Synaptic Co-Localization and Cross-Talk with Other Receptors. *Front Cell Neurosci* 5: 7.