

Aix-Marseille Université

Faculté des Sciences de Luminy

Ecole doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Thèse de Doctorat

présentée et soutenue publiquement par

Anaïs Langlois

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université d'Aix Marseille

spécialité Neurosciences

Rôle du BDNF dans le développement des synapses GABAergiques de l'hippocampe de rat

Soutenue le 19 décembre 2012 devant le jury composé de

Dr. Antoine Depaulis rapporteur

Dr. Laurent Groc rapporteur

Dr. Dominique Debanne examinateur

Pr. Frédéric Libersat examinateur

Pr. Christophe Porcher co-directeur de thèse

Dr. Jean-Luc Gaïarsa directeur de thèse

Sommaire

Introduction	7
 Chapitre 1 : Développement du réseau synaptique dans l'hippocampe	 9
I. Organisation de l'hippocampe (Danglot et al., 2006).	11
I.1 Neurones principaux.....	11
I.2 Interneurones.	12
II. Chronologie développementale.....	14
II.1 Différentiation et migration.	14
II.2 Croissance.....	16
II.3 Synaptogénèse.	16
 Chapitre 2 : Neurotransmission dans l'hippocampe	 19
I. Neurotransmission glutamatergique (Ozawa et al., 1998).	21
I.1 Récepteurs glutamatergiques métabotropiques.	21
I.2 Les récepteurs glutamatergiques ionotropiques.	21
II. Neurotransmission GABAergique.	23
II.1 Récepteurs GABAergiques métabotropiques (Benarroch, 2012 ; Ben-Ari <i>et al.</i> , 2007).23	
II.2 Les récepteurs GABAergiques ionotropiques (Michels and Moss, 2007 ; Ben-Ari <i>et al.</i> , 2007).	24
II.2.1 Structure.	24
II.2.2 Localisation (Farrant et al., 2005).	25
II.2.3 Transduction du signal.	26
II.2.4 Maturation.	27
 Chapitre 3 : Maturation du réseau hippocampique	 29
I. Origine de l'activité dans les réseaux immatures (Ben Ari <i>et al.</i> , 2001 ; Feller <i>et al.</i> , 1999 ; Blankenship <i>et al.</i> , 2010).	31
II. Activité dans l'hippocampe immature (Ben Ari <i>et al.</i> , 2001 ; Feller <i>et al.</i> , 1999 ; Blankenship <i>et al.</i> , 2009 ; Cherubini <i>et al.</i> , 2011).	32
II.1 GDPs et GABA.	32
II.2 Rôle développemental des GDPs (Cherubini <i>et al.</i> , 2011).	33
III. Plasticité synaptique (Michmizos <i>et al.</i> , 2011).	34
III.1 Historique.....	34
III.2 LTP et LTD des synapses inhibitrices.	35
III.2.1 Différentes formes d'induction de plasticités GABAergiques (Gaïarsa <i>et al.</i> , 2002).	35
III.2.2 Différentes formes d'expressions de plasticités des synapses GABAergiques (Castillo <i>et al.</i> , 2001).	36
III.2.3 Rôle de la plasticité inhibitrice (Maffei <i>et al.</i> , 2011 ; Castillo <i>et al.</i> , 2011).	37

Chapitre 4 : BDNF	39
I. Généralités (Lessman et al., 2003 ; Skaper, 2012).....	41
II. BDNF : synthèse, adressage, maturation et localisation (Lessmann <i>et al.</i> , 2003 ; Lessmann <i>et al.</i> , 2009 ; Skaper, 2012).	42
II.1 Synthèse.	42
II.2 Adressage.	43
II.3 Maturation.	44
II.4 Localisation.	45
III. BDNF : libération activité-dépendante (Lessmann <i>et al.</i> , 2003 ; Lessmann <i>et al.</i> , 2009 ; Kuczewski <i>et al.</i> , 2010 ; Skaper, 2012).	46
III.1 Site de libération.	46
III.2 Mécanisme de libération.	47
III.3 Libération BDNF mature versus proBDNF.	49
III.4 Importance de la libération dendritique de BDNF (An et al., 2008).	50
III.5 Récepteurs aux neurotrophines.	50
III.5.1 Les récepteurs p75 ^{NTR}	50
III.5.2 Les récepteurs TrkRs.	51
III.5.3 Rôle du BDNF dans le SNC en développement.	52
IV. BDNF et développement des synapses GABAergiques.	53
IV.1 Migration et différenciation.	53
IV.2 Plasticité et maturation.	53
IV.3 Rôle développemental (Lessmann et al., 2009).	54
 Résultats	 55
Discussion	71
Bibliographie.....	79

Remerciements

Je tiens à commencer par de profonds remerciements pour Jean-Luc Gaïarsa, qui m'a accueillie au sein de son équipe, m'a formée et m'a soutenue tout au long de mon master et de ma thèse. Un grand merci pour ta patience et ton humour. Je garderai un excellent souvenir de tous les moments passés au sein de ton équipe.

Je remercie le professeur Yehezkiel Ben-Ari et le docteur Alfonso Represa pour m'avoir accueillie au sein de leur institut et avoir mis à ma disposition les moyens techniques et financiers qui m'ont permis d'effectuer cette thèse dans de très bonnes conditions.

Je remercie les membres de mon jury : le docteur Antoine Depaulis, le docteur Laurent Groc, le docteur Dominique Debannne et le professeur Frédéric Libersat pour avoir accepté d'évaluer mon travail.

Un grand merci aux membres passés et présents de mon équipe : Christophe Porcher, mon co-directeur de thèse, un grand merci pour ton humour et ton soutien ; Hervé Fiorentino, merci de m'avoir enseigné tout ce que tout ce que je sais en électrophysiologie ; Diabé Diabira, mon collègue de paillasse, merci de ta gentillesse, j'ai beaucoup apprécié tout ce temps passé en ta compagnie ; Nadine Ferrand, merci pour ta gentillesse et ton soutien ; Damien Guimond, merci pour ton aide précieuse à la mise en page de ce manuscrit ; Nicola Kuczewski, merci pour ton regard critique ; Igor Medyna, merci pour ton humour si particulier ; Perrine Friedel, ma collègue de bureau ; Baptiste et Camille.

Merci à Thomas Marissal et Romain Nardou pour m'avoir introduite dans le laboratoire et pour leur humour si adapté à la gent féminine.

Merci à Thibault Ganay, Belkacem Oltsmane, Anice Moumem, Aurore Thomazeau Lamine Bouamarane, Julien Artinian et Bahija Hafidh pour tous ces apéros et ces fous rires. Je garderai un excellent souvenir de chacun d'entre vous.

Merci à Papa, Maman, Jice et Mauvaise.

Merci à Poups, Claire, Papa, Cams, Abecassou, Bouclette, Poussin, Baban, Dodich et Annabelle.

Antoine, merci pour tout.

Introduction

Chapitre 1 :

Développement du réseau synaptique dans l'hippocampe

I. Organisation de l'hippocampe (Danglot et al., 2006).

La formation hippocampique du rat est caractérisée par la présence de 2 structures principales interconnectées : la corne d'Ammon (CA), elle-même divisée en 2 parties CA1-3, et le gyrus denté (DG). Ces couches cellulaires sont majoritairement composées de cellules pyramidales et de cellules granulaires, respectivement. Ces cellules principales ont pour caractéristique d'être en connexion avec d'autres parties du cerveau, principalement le cortex. D'autres neurones, en revanche, ne forment la majorité de leurs synapses qu'avec des cellules hippocampiques : les interneurones.

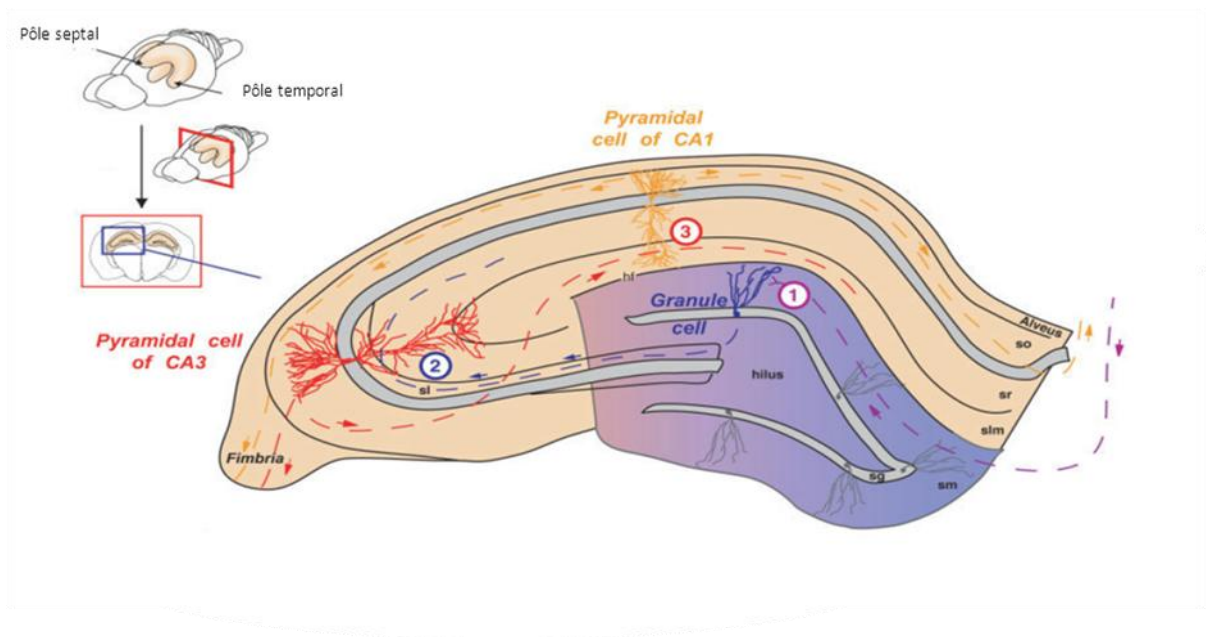


Figure 1. Structure histologique et circuit trisynaptique de l'hippocampe, d'après Danglot, 2006. La corne d'Ammon est représentée en orange et le gyrus denté en bleu. 1 : voie perforante ; les axones issus du cortex entorhinal innervent les cellules granulaires (granule cells) dans le stratum moleculare (sm) et les cellules pyramidales (pyramidal cells) dans le stratum lacunosum moleculare (slm). 2 : les axones issus des cellules granulaires, les fibres moussues, innervent les cellules pyramidales de CA3 dans le stratum lucidum (sl). 3 : les axones issus des cellules pyramidales de CA3 (collatérales de Schaffer) innervent les cellules pyramidales de CA1, qui vont à leur tour innervier le cortex entorhinal. hf = fissure hippocampique ; so = stratum oriens ; sr = stratum radiatum ; sg = stratum granulosum.

I.1 Neurones principaux.

Les cellules des couches principales de l'hippocampe présentent une organisation similaire caractéristique : leurs corps cellulaires sont alignés le long des différentes couches et elles partagent toutes une même orientation apico-basale au sein d'une même couche. Elles y partagent également une même morphologie et les mêmes caractéristiques physiologiques et physico-chimiques. Bien que les cellules granulaires expriment de façon transitoire des marqueurs GABAergiques au cours du développement, les cellules principales sont des neurones excitateurs glutamatergiques. De façon simplifiée et schématique, ils forment entre eux un circuit trisynaptique (figure 1). Il est

important de noter qu'en plus des connexions décrites ci-après, d'autres contacts inter- et intra-couches font de l'hippocampe une structure plus complexe. Des projections du cortex entorhinal contactent, via la voie perforante, les dendrites des cellules granulaires au niveau du stratum moléculaire. Les cellules granulaires projettent à leur tour des fibres mossy, qui se connectent aux dendrites des cellules pyramidales de CA3 au niveau du stratum lucidum. Les cellules pyramidales de CA3 émettent des collatérales de Schaffer, qui établissent des connexions avec les dendrites des cellules pyramidales de CA1 au niveau du stratum radiatum. Enfin les cellules pyramidales de CA1 vont projeter vers le cortex entorhinal et le subiculum.

I.2 Interneurones.

Contrairement aux cellules principales, les interneurones ne sont pas organisés en couches et diffèrent aux niveaux de leur localisation, de leur morphologie et de leurs caractéristiques physiologiques et physico-chimiques. Ce sont cependant tous des neurones GABAergiques. Aux stades précoces du développement, ils exercent à la fois une activité excitatrice (le GABA est alors dépolarisant) et inhibitrice (shunt). Ils participent entre autres à la régulation de l'activité des cellules principales. De plus, ils possèdent une importante arborisation axonique qui permet à chaque interneurone de contacter plusieurs centaines de cellules pyramidales. Ceci leur permet de contrôler la synchronisation des neurones glutamatergiques et de construire différents patrons d'activités oscillatoires.

Traditionnellement, le patron de projection axonale des interneurones hippocampiques est utilisé comme critère principal de classification de ces cellules, plutôt que leur morphologie (la forme de leurs corps cellulaires est très hétérogène). En effet, certains groupes d'interneurones établissent des connexions avec une partie spécifique des neurones principaux (figure 2).

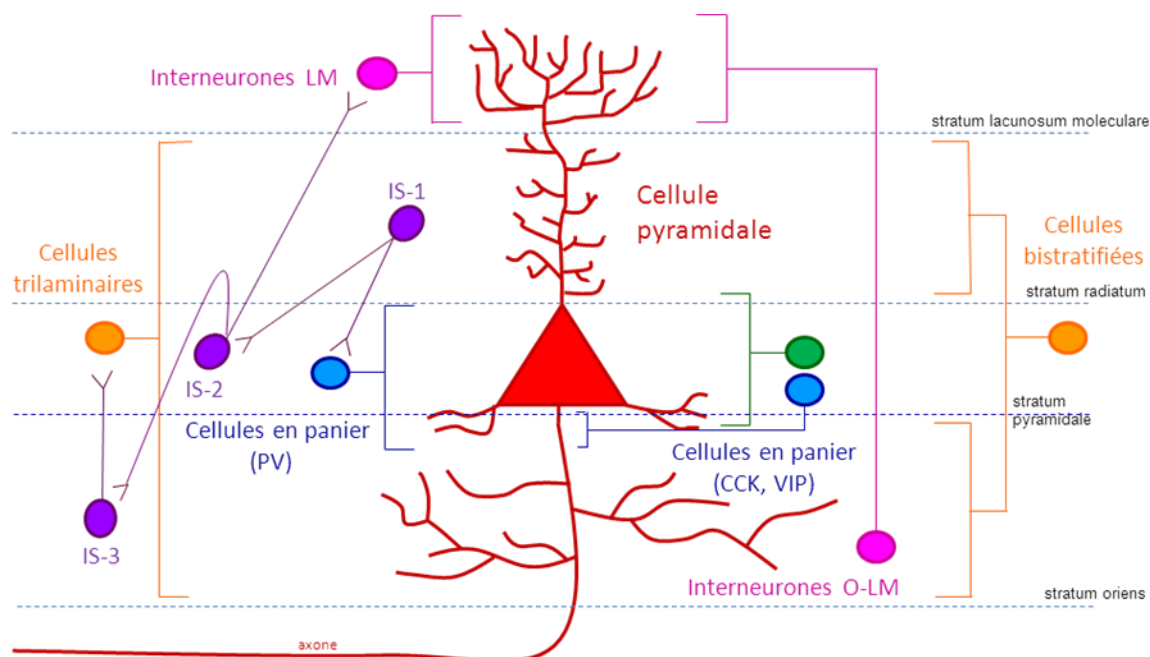


Figure 2. Les interneurones de la région CA3 de l'hippocampe, d'après Danglot, 2006. Les corps cellulaires des IS peuvent être situés dans le strata oriens, pyramidale et radiatum. LM : lacunosum moleculare ; O-LM : oriens-lacunosum moleculare ; IS : interneurones sélectifs des interneurones ; PV : paravalbumine ; CCK : cholécystokinine ; VIP : polypeptide intestinal vasoactif.

* Les cellules en panier forment des synapses avec les corps cellulaires et les dendrites proximales des cellules principales. Certaines expriment la paravalbumine, caractéristique des interneurones innervant le soma ou le segment initial de l'axone des cellules pyramidales, d'autres la cholécystokinine, le polypeptide intestinal vasoactif (VIP) et le récepteur cannabinoïde 1. Certaines expriment également la calbindine ou l'enzyme de synthèse de l'oxyde nitrique neuronal, spécifiques des interneurones innervant les dendrites proximaux des cellules pyramidales.

* Les cellules chandeliers contactent le segment initial de l'axone des neurones principaux. Elles expriment la paravalbumine.

* Les cellules lacunosum moleculare (LM) et oriens-lacunosum moleculare (O-LM) innervent la partie distale des dendrites apicales des cellules pyramidales au niveau du stratum lacunosum moleculare. Elles expriment la somatostatine et le neuropeptide Y (pour les O-LM).

* Les cellules bistratifiées et trilinguaires innervent les dendrites des cellules pyramidales de part et d'autre du stratum pyramidale. Elles expriment la calbindine.

Ces différentes localisations permettent aux différents types d'interneurones un contrôle différentiel de l'activité des cellules principales. Les synapses au niveau du corps cellulaire ou du segment initial de l'axone vont plutôt contrôler la genèse des potentiels d'action, tandis que celles situées au niveau des dendrites vont plutôt moduler les pics de calcium dendritiques ainsi que la sommation des activités excitatrices.

D'autres groupes d'interneurones établissent des connexions avec d'autres interneurones, les interneurones sélectifs des interneurones (IS1-3).

- * Les IS1 innervent les interneurones contactant les dendrites des cellules pyramidales et les autres IS1. Ils expriment la calretinine (CR).

- * Les IS2 innervent les interneurones contactant les dendrites de cellules pyramidales et les IS3. Ils expriment le VIP.

- * Les IS3 innervent les cellules O-LM. Ils expriment la calrétinine et le VIP.

- * Les cellules en panier innervent d'autres cellules en panier.

Ainsi, si les interneurones peuvent être classifiés selon leur projection axonique, ils ne peuvent l'être en fonction des molécules de liaison au calcium ou des neuropeptides qu'ils expriment. En effet, plusieurs groupes peuvent partager un même patron d'expression de ces molécules. Une diversité supplémentaire s'ajoute lorsque leur patron de décharge est pris en compte. De plus, ces 2 derniers paramètres peuvent varier au cours du développement. Il est donc très compliqué de classifier différents sous-groupes d'interneurones quand tous les critères sont pris en compte, surtout aux stades périnataux. En effet, à ces stades, les marqueurs physico-chimiques ne sont pas encore tous exprimés et les patrons de décharge ne sont pas encore spécifiques.

II. Chronologie développementale.

II.1 Différentiation et migration.

Chez le rat, l'hippocampe devient identifiable à partir de la fin de la deuxième semaine de vie embryonnaire suite à la différenciation des neurones. Les neurones principaux et les interneurones ne sont pas originaires de la même région et suivent un schéma développemental radicalement différent.

Au 14ème jour embryonnaire (E14), le début de la formation hippocampique se trouve au stade pré-plaque, et est constitué de 2 couches superposées : le neuroépithélium et la couche plexiforme primitive où se trouvent déjà des interneurones.

Les neurones principaux proviennent du neuroépithélium, situé dans la zone ventriculaire du pallium (télencéphalon dorsal). Le neuroépithélium est constitué de 3 composants : le neuroépithélium ammonique, qui donnera les cellules pyramidales ; le neuroépithélium denté, qui donnera les cellules granulaires ; le gliopithélium, qui donnera les cellules gliales de la fimbria.

Entre E15 et 19 se déroule le stade de la plaque hippocampique. Les cellules pyramidales sont générées avec un pic de différenciation des cellules

de CA3 à E17, précédant celui des cellules CA1 à E19. Les cellules pyramidales quittent le neuroépithélium 1 jour après leur genèse afin de former une bande de cellules pyramidales dans la zone intermédiaire. 1 jour plus tard, elles migrent radialement plus profondément afin de former la plaque hippocampique. Cela prendra 4 jours pour les cellules de CA1, plus longtemps pour les cellules de CA3, du fait de leur trajectoire courbée. A la naissance, certaines cellules pyramidales sont toujours en migration. Les cellules granulaires sont générées à partir de E20, avec un pic pendant la première semaine de vie postnatale. Le gyrus denté est reconnaissable comme entité morphologique à partir de E21-22.

Les interneurones sont générés entre E12 et E18, avec les interneurones de CA1 et CA3 commençant à être générés à E12-13, et ceux du gyrus denté à E13-14. Les interneurones de la plaque plexiforme primitive, future stratum oriens et stratum radiatum, sont générés avant ceux qui coloniseront la couche pyramidale. Enfin, ceux-ci sont, comme les cellules pyramidales, générés selon un gradient intérieur/extérieur, avec les cellules les plus vieilles dans la portion inférieure de la couche. Les interneurones sont générés au niveau du subpallium (télencéphale ventral), bien que certains pourraient avoir des précurseurs dans la pallium (Bellion *et al.*, 2003). Le subpallium est constitué de 3 parties : l'éminence ganglionnaire médiale (MGE), l'éminence ganglionnaire latérale (LGE) et l'éminence ganglionnaire caudale (CGE). La CGE donnera les interneurones des CA et DG, tandis que la MGE donnera les interneurones de la CA uniquement. La LGE pourrait également donner naissance à des interneurones de la formation hippocampique, mais c'est en grande partie le rôle de la CGE, surtout aux stades tardifs du développement embryonnaire (Lopez-Benito *et al.*, 2004). Les interneurones suivront ensuite 2 courants de migration tangentielle vers l'hippocampe en formation : un dans la zone sous-ventriculaire (SVZ), l'autre dans la zone marginale (MZ, courant majeur). A E14, les interneurones sont présents dans la plaque plexiforme primitive. Entre E15 et E19, les interneurones sont présents dans la zone sous-ventriculaire (= zone intermédiaire (ZI) + sous-plaque (SP), futur stratum oriens (SO)) et les zones marginales interne (futur stratum radiatum (SR)) et denté (futur stratum moléculaire (SM)) de la formation hippocampique. A E15, les interneurones de la MZ atteignent CA1 à E15, CA3 à E16 et le DG à 17. Les interneurones de la ZI atteignent CA1 à E16. Aux stades post-nataux précoces, les interneurones de la SP et la majorité des interneurones de la MZ deviennent résidents des SO et SR et SM, respectivement.

Chez l'adulte, la majorité des interneurones ont leurs corps cellulaires dans les couches de cellules principales ou dans leur entourage immédiat, ainsi qu'à la limite SR/SLM. Il est donc supposé que les interneurones vont migrer des couches dendritiques vers les couches des corps cellulaires pyramidaux, dentés et à la limite SR/SLM.

II.2 Croissance.

Le développement morphologique et fonctionnel des neurones hippocampiques s'étale entre le début de la neurogenèse et l'âge adulte. La maturation neuronale est caractérisée par la grande hétérogénéité des stades développementaux entre les différents neurones observés à un stade donné (Tyzio *et al.*, 1999). Cette propriété est liée à l'étalement de la période de neurogenèse sur une durée de plusieurs jours ainsi qu'aux différentes distances que doivent parcourir les neurones pour atteindre leur destination finale. La maturation des cellules pyramidales se fait selon la séquence temporelle suivante : l'axone se développe avant les dendrites et la dendrite apicale se développe avant les dendrites basales (Tyzio *et al.*, 1999). La maturation morphologique des interneurones se fait avant celle des neurones principaux et ne présente pas un patron stéréotypé d'arborisation dendritique. De plus, l'arborisation axonale dépend de la partie du neurone pyramidal qu'elle innerve. Pour les interneurones comme pour les cellules pyramidales, l'arbre dendritique va ensuite perdre ses cônes de croissance, parallèlement à une élongation des branches dendritiques. Plusieurs interneurones ont des collatérales axonales plus développées que chez l'adulte (Hennou *et al.*, 2002). Il y a donc 2 hypothèses : soit ces collatérales axonales vont être éliminées, soit les interneurones établissant ces connexions vont mourir. Il y a effectivement une réduction importante du nombre de neurones GABAergiques dans le stratum radiatum de l'hippocampe de souris entre P5 et P15, dont une partie semble attribuée à la mort neuronale (Jiang *et al.*, 2001). Etant donné qu'il y a également une réorganisation des corps cellulaires et de l'arborisation axonale des interneurones durant le développement post-natal, il n'est pas sûr que les synapses GABAergiques fonctionnelles aux stades précoces soient les mêmes que chez l'adulte.

II.3 Synaptogénèse.

A la naissance, les interneurones à différents stades de maturation morphologique présentent différents patrons d'entrées synaptiques. Les interneurones ne possédant aucun contact synaptique fonctionnel présentent un axone et des dendrites très peu développés (5%). Ceux présentant une activité synaptique GABAergique sont plus développés mais avec des dendrites courtes et un axone sans collatérale. Enfin, ceux présentant à la fois des activités synaptiques GABAergique et glutamatergique présentent des dendrites plus développées et un axone ramifié. Au même stade, la majorité des cellules pyramidales sont silencieuses (80%), bien qu'elles suivent ensuite la même séquence de synaptogénèse. La transmission GABAergique apparaît donc dans l'hippocampe avant la transmission glutamatergique. Les IN sont donc la source et la cible des premières synapses fonctionnelles. Seuls les interneurones et les cellules pyramidales ayant atteint un certain degré de maturation morphologique reçoivent des entrées synaptiques fonctionnelles. De

même que les interneurones, formés avant les cellules pyramidales, reçoivent synapses fonctionnelles avant ces dernières, les cellules de CA3 reçoivent des terminaisons GABAergiques avant celles de CA1.

Chapitre 2 :

Neurotransmission dans l'hippocampe

I. Neurotransmission glutamatergique (Ozawa et al., 1998).

Les récepteurs glutamatergiques sont responsables de la transmission excitatrice majeure dans le système nerveux central des mammifères. Le glutamate peut activer des récepteurs métabotropiques, couplés à des protéines G, ainsi que des récepteurs ionotropiques.

I.1 Récepteurs glutamatergiques métabotropiques.

Il existe 8 de ces récepteurs, mGluR1-8. Bien qu'ils soient structurellement proches, ces sous-types de récepteurs sont très hétérogènes quant à leur mécanisme de transduction du signal et leur distribution dans le cerveau. Ils sont classés en 3 groupes, en fonction de l'homologie de leurs séquences d'acides aminés. Les récepteurs mGluR1 et mGluR5 constituent le groupe I, mGluR2 et mGluR3 le groupe II et mGluR4 et mGluR6-8 le groupe III. Les récepteurs d'un même groupe partagent également les mêmes mécanismes de transduction du signal. Le groupe I est couplé à l'activation de la voie PLC conduisant à la formation subséquente d'IP₃, menant à la libération de calcium par les stores intracellulaires. Les groupes II et III sont couplés négativement au système adénylate cyclase.

Les récepteurs glutamatergiques métabotropiques sont impliqués dans plusieurs processus physiologiques. Leur activation induit une légère dépolarisation, accompagnée par une augmentation de la fréquence de décharge des neurones de l'hippocampe. Ces effets excitateurs peuvent être attribués à une action directe sur les canaux potassiques, une modification de la cinétique des potentiels d'action et une augmentation des conductances cationiques non-spécifiques activées par le calcium. L'activation des mGluRs pré-synaptiques peut également conduire à l'inhibition des transmissions excitatrices et inhibitrices en supprimant la sécrétion de neurotransmetteurs. Cet effet pourrait être attribué à une inhibition de l'influx calcique dans la terminaison pré-synaptique. Enfin, ces récepteurs sont impliqués dans plusieurs formes de plasticité synaptiques, mais les résultats sont parfois contradictoires et les mécanismes peu connus. Les mGluRs sont également impliqués dans des phénomènes de neurotoxicité ou d'induction d'activités épileptiformes, mais l'étude de leur implication est compliquée du fait de leur rôle à la fois excitateur et inhibiteur de l'activité neuronale.

I.2 Les récepteurs glutamatergiques ionotropiques.

Les récepteurs ionotropiques au glutamate forment des canaux perméables à différents ions dont l'ouverture est déclenchée par la liaison du neurotransmetteur. Ils sont divisés en 3 sous-types : AMPA, kainate et NMDA,

en fonction de la spécificité de leurs agonistes. Leur activation entraîne une dépolarisation de la membrane neuronale et une réponse post-synaptique excitatrice. Ils sont perméables aux ions sodium et potassium, et avec différents degrés au calcium. Ils sont formés par un assemblage de sous-unités protéiques, formant des récepteurs homo- ou hétéromériques, dont la combinatoire est à l'origine d'une grande diversité d'isoformes, déterminant les propriétés physico-chimiques et physiologiques des récepteurs.

Il existe 5 sous-unités chez les récepteurs AMPA (AMPA_Rs), GluR1-4. Ils sont présents de façon ubiquitaire dans le système nerveux central, mais de façon plus importante dans certaines régions telles que l'hippocampe. Le glutamate et l'AMPA évoquent une réponse rapide et très désensibilisante de ces récepteurs. Cette propriété rend ces récepteurs responsables de la neurotransmission excitatrice rapide dans la majorité des synapses du système nerveux central. Certains AMPA_Rs sont perméables aux ions calcium, une propriété déterminée par l'absence de la sous-unité GluR2. Ces récepteurs sont fortement exprimés dans l'hippocampe pendant les premières semaines de vie postnatale, puis elle chute pour atteindre une proportion relativement faible chez l'adulte (Liu SJ *et al.*, 2007). Les récepteurs contenant GluR2 présentent une légère rectification sortante, tandis que ceux ne l'exprimant pas présentent une forte rectification entrante. Cette dernière est induite par les polyamines intracellulaires, telles que la spermine, qui bouchent les pores des canaux à des potentiels positifs. L'entrée de calcium via les AMPA_Rs perméables au calcium participe à certaines formes de plasticité synaptique. Mais l'entrée excessive de calcium via ces récepteurs peut conduire à la mort neuronale, induisant de multiples désordres neurologiques, tels que l'ischémie.

Il existe 5 sous-unités chez les récepteurs kainate (kainate_Rs), GluR5-7 et KA1-2. Ils sont largement distribués à travers le système nerveux central mais sont très abondamment exprimés dans l'hippocampe. Leur activation évoque une réponse à désensibilisation rapide mais leur rôle dans la transmission excitatrice rapide n'a pas encore été clairement établi. Les récepteurs homomériques GluR-6 ont une perméabilité élevée au calcium. Selon leurs compositions, les kainate_Rs présentent une relation I-V très variable. Ils jouent un rôle dans la plasticité de certaines synapses en augmentant ou en supprimant la libération de GABA ou de glutamate. Ils sont également mis en jeu dans l'expression d'activités épileptiformes dans l'hippocampe (Epsztein *et al.*, 2005).

Il existe 7 sous-unités chez les récepteurs NMDA (NMDA_Rs), NR1, NR2A-D et NR3A-B. Les NMDA_Rs se composent de 4 sous-unités : 2 NR1 obligatoires et 2 sous-unités régulatrices NR2A-D ou NR3A-B. Ils sont présents dans tout le cerveau, mais de façon prédominante dans le cerveau antérieur, et plus précisément dans l'hippocampe. Les 2 sous-unités régulatrices les plus exprimées sont NR2A et NR2B. Au cours du développement, NR2B, qui est la sous-unité la plus abondante dans le cerveau post-natal, est progressivement remplacé par NR2A. Les cinétiques d'activation, de désactivation et de désensibilisation de ces récepteurs sont plus lentes que celles des AMPA_Rs. Les NMDA_Rs vont donc être impliqués dans la neurotransmission excitatrice d'une façon différente des AMPA_Rs. Ces

récepteurs sont hautement perméables au calcium, ainsi qu'au sodium et au potassium. Ils sont également perméables aux ions magnésium lorsque la membrane est hyperpolarisée, mais les molécules d'eau qui entourent ceux-ci vont engendrer un blocage du canal. Lorsque la membrane est dépolarisée, l'affinité du récepteur pour ces ions est minimale et les cations peuvent donc circuler à travers le pore du récepteur. Cette dépolarisation nécessaire à l'activation des NMDARs est généralement attribuée à l'activation des AMPARs. Cependant, dans l'hippocampe immature, le GABA est dépolarisant et les récepteurs GABA_A peuvent remplir ce rôle (Leinekugel *et al.*, 1997). Ces propriétés permettent aux NMDARs de détecter la coïncidence d'une activité présynaptique et d'une dépolarisation post-synaptique (réponse lente et prolongée), d'injecter du calcium dans la cellule post-synaptique et d'initier des voies de signalisation entraînant des phénomènes de plasticité synaptique : potentialisation ou dépression des synapses GABAergiques ou glutamatergiques (Gaiarsa *et al.*, 2002). Les NMDARs sont également impliqués dans la plupart des cas d'excitotoxicité pouvant entraîner la mort cellulaire (Hardingham *et al.*, 2003) et dans beaucoup de neuropathologies.

II. Neurotransmission GABAergique.

Le GABA est le neurotransmetteur inhibiteur majeur dans le système nerveux central des vertébrés. Chez les mammifères, il est le plus abondant et 30% des synapses l'utilisent. Il active 2 types de récepteurs : les récepteurs métabotropiques GABA_B (GABA_BRs) et les récepteurs ionotropiques GABA_A (GABA_ARs) et GABA_C (GABA_CRs).

II.1 Récepteurs GABAergiques métabotropiques (Benarroch, 2012 ; Ben-Ari *et al.*, 2007).

Le GABA peut activer des récepteurs métabotropiques couplés à des protéines G_i et G_o. Ils font partie, comme les récepteurs métabotropiques glutamatergiques, de la classe C des récepteurs couplés à une protéine G. 2 sous-unités, GABA_{B1} (existant sous 2 isoformes, GABA_{B1a} and GABA_{B1b}) et GABA_{B2}, ont été identifiées chez les mammifères. L'obtention de récepteurs GABA_B fonctionnels nécessite le coassemblage de ces 2 sous-unités.

L'activation des GABA_BRs induit l'activation de différentes voies de signalisation en fonction de leur localisation. L'activation des récepteurs post-synaptiques induit l'activation des canaux potassiques GIRK ou Kir3, responsables de la phase tardive des potentiels d'inhibition postsynaptiques. L'activation des récepteurs pré-synaptiques inhibe les canaux calciques voltage-dépendants de type N ou P/Q, ce qui diminue la libération de neurotransmetteurs. L'activation des GABA_BRs module également la production d'AMPc, conduisant à un large spectre d'actions sur les canaux

ioniques et les protéines cibles des kinases AMPc-dépendantes, modulant donc les fonctions neuronales et synaptiques.

Ces récepteurs sont largement exprimés dans le système nerveux et sont impliqués dans la modulation de l'activité excitatrice et la génération d'activités rythmiques dans le cerveau. Ils sont également impliqués dans une grande variété de désordres neurologiques et psychiatriques.

II.2 Les récepteurs GABAergiques ionotropiques (Michels and Moss, 2007 ; Ben-Ari *et al.*, 2007).

Les récepteurs ionotropiques GABA_A sont membres de la superfamille nicotinoïde des canaux ioniques ligands-dépendants. Cette famille comprend également les récepteurs nicotiques à acétylcholine, glycine et les récepteurs 5HT₃ à sérotonine. Les membres de cette superfamille partagent des similarités de séquence significatives et une structure similaire avec un large domaine N-terminal extracellulaire et une boucle Cys-Cys très conservée. Les récepteurs ionotropiques GABA_C étant principalement exprimés dans la rétine, nous n'en discuteront pas ici.

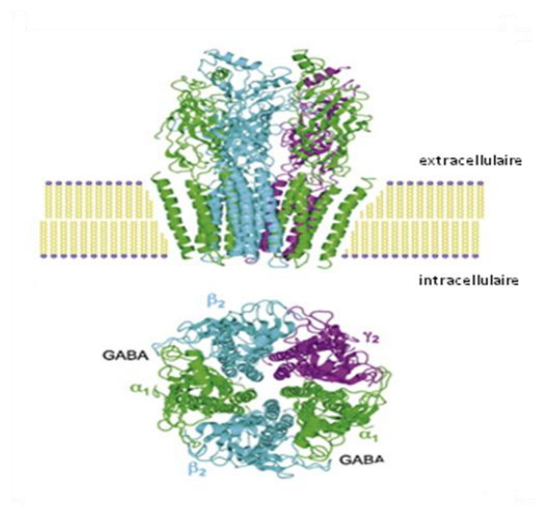


Figure 3. Structure cristallographique des récepteurs ionotropiques GABA_A, d'après D'Hulst, 2009.

II.2.1 Structure.

Les GABA_ARs sont des pentamères hétéromériques formant un canal ionique perméable au chlore, et dans une moindre mesure aux ions bicarbonates. On compte aujourd'hui 19 sous-unités différentes : $\alpha_{(1-6)}$, $\beta_{(1-3)}$, $\gamma_{(1-3)}$, δ , ϵ , π , θ , $\rho_{(1-3)}$. Elles possèdent toutes 4 domaines transmembranaires (TM1-4), où TM2 définit le pore du canal. Le domaine N-terminal est le site de fixation du ligand ainsi que le site d'action de plusieurs drogues. Chaque sous-unité possède également

une grande boucle intracellulaire entre les TM3 et 4, site d'interactions protéines-protéines et de modifications post-traductionnelles modifiant l'activité du récepteur. Ce nombre important de sous-unités induit une grande hétérogénéité potentielle, à laquelle s'ajoute l'épissage alternatif. L'expression des différents sous-types de récepteurs est régulée spatialement et de façon développementale. En plus de l'expression de sous-unités différentielle selon les régions du cerveau, la composition des GABA_ARs varie selon le type cellulaire et le site d'adressage subcellulaire. La majorité des récepteurs est composée de 2 sous-unités α , 2 β et 1 γ , arrangés pseudo-symétriquement autour du canal selon la séquence γ - β - α - β - α , de façon antihoraire vue de l'espace synaptique (figure 3). Les sous-unités δ , ϵ et π semblent pouvoir remplacer la sous-unité γ et θ semble pouvoir remplacer β . Les sous-unités ρ forment des homopentamères et sont surtout exprimés dans la rétine. Le sous-récepteur le plus abondant dans le cerveau est formé par les sous-unités $\alpha 1$, $\beta 2$ et $\gamma 2$. D'autres assemblages contiennent α , β , et $\gamma 2$, tandis que les récepteurs où $\gamma 2$ est remplacé par $\gamma 1$, $\gamma 3$, ou δ sont moins abondants. π et θ peuvent également s'assembler aux sous-unités α , β , et γ pour former des récepteurs contenant des sous-unités de 4 familles. La composition des GABA_ARs a des conséquences fonctionnelles très importantes car elle détermine l'adressage, les propriétés et la modulation pharmacologique de ces récepteurs.

II.2.2 Localisation (Farrant et al., 2005).

Dans l'hippocampe, les GABA_ARs postsynaptiques sont localisés sur les cellules pyramidales, les cellules granulaires et les interneurons aux niveaux du compartiment somato-dendritique et du segment initial de l'axone. On trouve également des récepteurs GABA_A présynaptiques au niveau des synapses entre les fibres moussues des cellules granulaires et les cellules pyramidales de CA3, ainsi qu'entre les collatérales de Schäffer des cellules pyramidales de CA3 et des cellules pyramidales de CA1. Il existe également des récepteurs extrasynaptiques.

La cinétique rapide des courants postsynaptiques GABAergiques dans de nombreux neurones du système nerveux central indique une forte densité de récepteurs proche des sites de libération du GABA. On a effectivement pu observer un enrichissement en sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\beta 2/3$ et $\gamma 2$ au sein de spécialisations postsynaptiques de synapses contenant du GABA dans plusieurs régions du cerveau, dont l'hippocampe. Cependant il faut noter que chacune de ces sous-unités a également été localisée extrasynaptiquement et qu'aucune sous-unité n'a encore été observée uniquement de façon synaptique. Même les récepteurs $\alpha 1\beta 2/3\gamma 2$, très abondants au niveau synaptiques, sont plus présents à l'extérieur des synapses. Par contre, la sous-unité δ est présente exclusivement aux niveaux extra- et pérисynaptiques des cellules granulaires du gyrus denté. Elle s'assemble avec les sous-unités

$\alpha 4$ et βx , l'absence de la sous-unité γ étant probablement responsable de l'absence d'incorporation dans les synapses de ces récepteurs. Il est en effet clair que la sous-unité γ_2 a un rôle central dans la clusterisation des GABA_ARs au niveau synaptique. Les récepteurs contenant γ_2 en association avec $\alpha 1$, $\alpha 2$ ou $\alpha 3$ ($\alpha_1\beta_{2/3}\gamma_2$, $\alpha_2\beta_{2/3}\gamma_2$, $\alpha_3\beta_{2/3}\gamma_2$) sont les principaux sous-types de récepteurs responsables de l'inhibition synaptique phasique (courants rapides). Les récepteurs contenant les sous-unités $\alpha 4$, $\alpha 5$ ou $\alpha 6$ ($\alpha_6\beta_x\delta$, $\alpha_4\beta_x\delta$ et $\alpha_5\beta_x\gamma_2$) sont exclusivement, ou de manière prédominante, extrasynaptiques et semblent être responsables de l'inhibition tonique (courants lents).

II.2.3 Transduction du signal.

L'action des GABA_ARs se fait par 3 modes différents. Premièrement, leur ouverture permet le passage d'anions d'un côté ou de l'autre de la membrane plasmique neuronale, modifiant ainsi la charge de celle-ci. Le sens du mouvement de ces anions dépend de leur gradient électrochimique de part et d'autre de cette membrane, et il se modifie au cours du développement. Celui-ci va donc déterminer l'action dépolarisante ou hyperpolarisante du GABA et les conséquences excitatrice ou inhibitrice de l'activation des GABA_ARs. Chez l'adulte, cette activation génère une hyperpolarisation de la membrane neuronale et une réduction de la décharge de potentiels d'action. Cependant, dans le cerveau en développement, le potentiel d'équilibre du GABA est plus dépolarisé que le potentiel de repos membranaire ; le GABA est alors dépolarisant et peut être excitateur si la dépolarisation atteint le seuil de genèse des PAs.

Deuxièmement, les GABA_ARs présentent une action inhibitrice via le phénomène de « shunting » : l'augmentation locale de conductance de la membrane plasmique, due à l'ouverture de ces canaux, conduit à une diminution de la réponse excitatrice glutamatergique, si celle-ci a lieu dans une fenêtre spatiale et temporelle proche de celle de la réponse GABAergique.

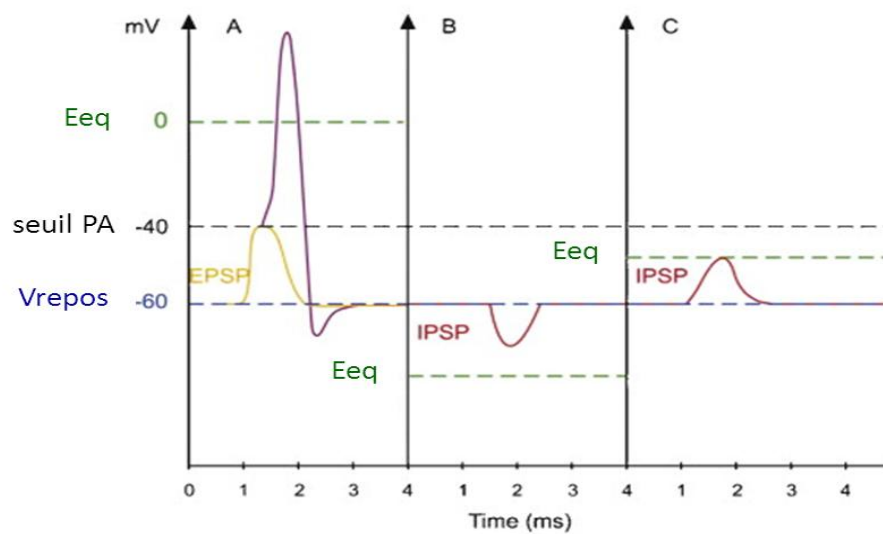
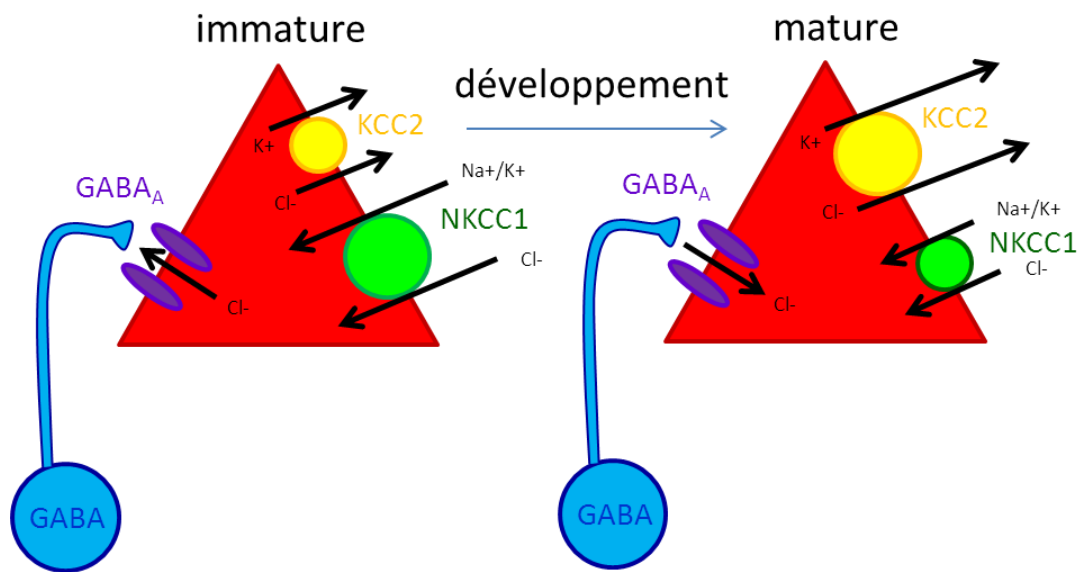
Troisièmement, la réponse hyperpolarisante peut générer des rebonds calciques désinactivant des canaux calciques à bas seuil, et donc augmenter l'excitabilité neuronale et/ou permettre la synchronisation de décharge des cellules excitatrices.

En conditions pathologiques, la polarité de la réponse générée par les GABA_ARs peut changer et contribuer par exemple à la génération d'activités épileptiformes.

II.2.4 Maturation.

Dans le cerveau en développement, la dépolarisation induite par le GABA est due à un efflux d'anions chlorure via les GABA_ARs. Le résultat de l'ouverture de ces canaux est donc un courant entrant dans le neurone concerné. Lorsque la dépolarisation médiée par les GABA_ARs atteint, directement ou via l'activation de conductances voltage-dépendantes, le seuil de génération de potentiels d'action, le GABA est excitateur. La dépolarisation médiée par les GABA_ARs va directement (via l'activation de conductances calciques voltage-dépendantes) ou indirectement (via la genèse de potentiels d'action) induire une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire. Cette dépolarisation peut également avoir un effet excitateur via un effet sur les récepteurs glutamatergiques. En effet, au potentiel de repos membranaire, les canaux NMDA sont obstrués des ions magnésium. Ce blocage étant voltage-dépendant, l'activation des GABA_ARs peut permettre la libération des canaux NMDA et donc être excitatrice.

L'inversion développementale de la polarité de l'action GABAergique est déterminée par le changement progressif du potentiel d'équilibre du chlore qui va devenir plus négatif que le potentiel de repos membranaire. Ceci reflète une réduction de la concentration intracellulaire en chlore. L'homéostasie neuronale du chlore est contrôlée par plusieurs co-transporteurs, échangeurs et canaux chlore. Le changement développemental de l'expression de 2 co-transporteurs cation-chlore est impliqué dans cette réduction de concentration intracellulaire en chlore. Le premier, NKCC1 (co-transporteur sodium/potassium/chlore), est une protéine de transport transmembranaire qui permet l'entrée de 1 Na⁺, 1 K⁺ et 2 Cl⁻ dans le neurone, de façon électroneutre. NKCC1 est exprimé dans pratiquement toutes les cellules mammifères, et semble jouer un rôle dans le contrôle du volume cellulaire et la composition cytosolique. Il fonctionne grâce au gradient électrochimique du sodium, généré de part et d'autre de la membrane grâce aux pompes Na⁺/K⁺ ATPases. La forte expression de NKCC1 dans les neurones immatures joue un rôle important dans la forte concentration intracellulaire en chlore. Le second, KCC2 (co-transporteur potassium/chlore), est le principal transporteur permettant l'extrusion du chlore dans les neurones. Il extrude des ions K⁺ et Cl⁻ en utilisant le gradient électrochimique du potassium. Cette extrusion de chlore est faible dans les neurones immatures et augmente avec la maturation neuronale. L'expression de KCC2 commence autour de la naissance, augmente pendant la première semaine de vie post-natale, atteint son maximum autour de la troisième semaine de vie post-natale et ce niveau est maintenu chez l'adulte. L'inversion développementale de l'action GABAergique se fait en parallèle du changement négatif du potentiel d'équilibre du GABA et du chlore et varie en fonction des espèces, des structures cérébrales et du type neuronal (figure 4).



$E_{eq} < \text{seuil PA} = \text{inhibition}$

$E_{eq} > \text{seuil PA} = \text{excitation}$

Figure 4. Séquence développementale des transporteurs de chlore, d'après D'Hulst, 2009. Aux stades précoces du développement, le GABA est dépolarisant : son potentiel d'équilibre, E_{eq} , est supérieur au potentiel de repos membranaire, V_{repos} . Le passage des ions chlore à travers les GABAARs induit alors un potentiel postsynaptique exciteur, EPSP. Si les EPSP ont une amplitude qui dépasse le seuil de genèse des potentiels d'action, seuil PA, le GABA est exciteur. Aux stades adultes, le GABA est hyperpolarisant : son E_{eq} est supérieur au V_{repos} . Le passage des ions chlore à travers les GABAARs induit alors un potentiel postsynaptique inhibiteur, IPSP.

Chapitre 3 :

Maturation du réseau hippocampique

I. Origine de l'activité dans les réseaux immatures (Ben Ari *et al.*, 2001 ; Feller *et al.*, 1999 ; Blankenship *et al.*, 2010).

La formation du système nerveux est classiquement décrite en 2 étapes : une phase précoce et une phase tardive. Durant la phase précoce, les précurseurs neuronaux se différencient et acquièrent des phénotypes distincts, migrent jusqu'à une position caractéristique dans les structures nerveuses en développement et forment entre eux un réseau établi par des connexions rudimentaires. Durant cette phase, un ensemble prédéterminé de gènes était supposé contrôler l'organisation générale du cerveau de façon activité-indépendante. Durant la phase tardive, les connexions préalablement établies sont raffinées afin de former un réseau neuronal adulte fonctionnel. Les synapses primitives sont alors éliminées ou renforcées grâce à l'activité neuronale générée par les afférences sensorielles qui relient le système nerveux à son environnement. Les mécanismes activité-dépendants de ce raffinement ont été montrés dans de nombreuses structures cérébrales, lorsque les réseaux immatures expérimentent leurs premières expériences sensorielles. Par exemple, la vision traditionnelle du développement du système visuel consiste en une première phase où le programme génétique spécifie l'organisation des projections de la rétine jusqu'au cerveau. Durant la seconde phase, lorsque la vision s'établit, l'activité neuronale produite par l'expérience visuelle affine un circuit primitif en un patron de connectivité adulte. L'importance de ces processus activité-dépendants est montrée par le changement marqué des circuits neuronaux et les conséquences délétères qui font suite à la perturbation de la décharge normale des afférences sensorielles.

Cette vision du développement du système nerveux a depuis évolué. En effet, il a été montré dans plusieurs structures et chez plusieurs espèces que même à des stades très précoces et avant la formation des premières synapses, les précurseurs neuronaux présentent une activité chimique et électrique spontanée. De nombreuses évidences montrent que cette activité peut influencer profondément des processus intracellulaires tels que l'établissement d'un phénotype cellulaire, l'activation d'enzymes ou l'expression de gènes. De plus en plus d'observations montrent qu'en effet, l'activité neuronale et le programme génétique interagissent afin de spécifier la composition et l'organisation des circuits neuronaux à tous les stades du développement. Les premières formes précoces d'activité neuronale ne sont généralement pas corrélées entre cellules et influencent des événements développementaux tels que la différenciation neuronale ou la migration. Lorsque les premières connexions synaptiques se forment et que des circuits fonctionnels commencent à émerger, l'activité spontanée devient corrélée au sein de larges groupes de cellules voisines et constitue alors des patrons récurrents d'activité neuronale synchronisée. Cette activité de réseau spontanée existe dans de nombreuses structures en développement, telles que la rétine, la moelle épinière, le cortex et l'hippocampe, et y constitue la majorité de l'activité neuronale pendant une période transitoire allant de plusieurs jours à plusieurs semaines selon les structures et les espèces. Elle y joue un rôle important dans différents processus développementaux tels que la migration, la mise en place des connexions, la maturation des synapses et le développement de circuits locaux. Par exemple, on sait maintenant qu'avant toute expérience sensorielle, des potentiels d'action générés spontanément dans la rétine sont nécessaires à la formation des

connexions rétino-géniculées. Des circuits immatures peuvent donc générer des patrons d'activité qui conduisent à des processus développementaux.

II. Activité dans l'hippocampe immature (Ben Ari *et al.*, 2001 ; Feller *et al.*, 1999 ; Blankenship *et al.*, 2009 ; Cherubini *et al.*, 2011).

Dans l'hippocampe en développement, entre E18 et P10, on observe de larges événements dépolarisants spontanés de réseau, crêtés de bouffées de potentiels d'action. Les cellules pyramidales présentent 2 patrons différents de décharge corrélée spontanée : les SPAs (synchronous plateau assemblies) et les GDPs (giant depolarizing potentials). Les SPAs durent d'E18 à P5 et sont caractérisés par des bouffées de potentiels de plateau corrélées à travers 3 à 7 neurones. Ils sont générés par des pics de calcium intracellulaires spontanés dans les cellules pyramidales via les canaux calciques de type L et corrélés via des jonctions GAP. Les GDPs apparaissent vers P0 et sont présents jusqu'à P10, lorsque le GABA devient hyperpolarisant. Des activités « GDPs-like » ont été observés aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* et chez plusieurs espèces. Ils consistent en de larges dépolarisations d'amplitudes supérieures à 50mV et crêtées de PAs durant environ 500ms et séparés par de longs intervalles. Ils sont générés par les cellules pyramidales en interaction avec les interneurons GABAergiques.

II.1 GDPs et GABA.

Dans l'hippocampe de rat, la neurogenèse des cellules pyramidales et des interneurons se fait pendant la dernière semaine de vie embryonnaire. Les premières connexions synaptiques sont créées autour de la naissance et sont accompagnées d'une forte croissance des axones et dendrites. C'est pendant cette période de croissance intense qu'apparaissent les GDPs. Une caractéristique importante de nombreux réseaux neuronaux à ce stade de développement est que le GABA est alors dépolarisant et peut être excitateur. Les GDPs constituent alors la majorité de l'activité électrique des cellules pyramidales et interneurons. Ils représentent la première réelle activité de décharge d'une population synchronisée dans une fenêtre temporelle d'une centaine de millisecondes. Le mode de genèse des GDPs est aujourd'hui toujours discuté et 3 théories différentes s'opposent afin d'expliquer ce phénomène de synchronisation de réponse d'une population de neurones. La première est que l'action excitatrice du GABA et les récurrences excitatrices formées entre les cellules pyramidales et par les interneurons facilite la synchronisation neuronale et permet l'initiation de bouffées d'activité (Traub *et al.*, 1982). La seconde s'appuie sur le fait que les cellules pyramidales de CA3 peuvent générer des bouffées « pacemaker », durant le développement et chez l'adulte, grâce à des courants sodiques persistants, possiblement activés par une dépolarisation membranaire due à un courant tonique GABAergique (Sipila *et al.*, 2005). L'initiation spontanée de décharge dans ces cellules, combinée à l'action excitatrice du GABA et à l'existence de récurrentes excitatrices,

pourrait permettre à d'autres neurones de décharger de manière synchrone. Enfin, la troisième est basée sur l'identification de cellules GABAergiques « Hub » extrêmement développées et connectées à une grande partie du réseau hippocampique, qui de par leur anatomie permettraient la synchronisation de décharge des cellules connectées à elles (Bonifazi *et al.*, 2009). Ces décharges synchrones entraînent des oscillations calciques dans les cellules pyramidales et les interneurones. Les GDPs se terminent par une lente AHP (afterhyperpolarisation), générée par une conductance potassique activée par le calcium. La fréquence des GDPs semble être déterminée par la cinétique de ces conductances. Cependant, la durée des GDPs est également en partie contrôlée par les récepteurs GABA_B présynaptique. En effet leur inhibition entraîne un rallongement de la durée des GDPs, via l'inhibition de la libération de GABA et de glutamate (McLean *et al.*, 1996). L'application d'antagonistes glutamatergiques entraîne la diminution de la fréquence des GDPs, montrant que les synapses glutamatergiques jouent également un rôle dans la genèse de ces événements synchrones dépolarisants. En effet, les NMDARs peuvent agir en synergie avec le GABA. Celui-ci va entraîner une dépolarisation de la membrane, ce qui va libérer les NMDARs de leur blocage voltage-dépendant par du magnésium, et ainsi faire participer ces récepteurs à l'augmentation de calcium intracellulaire. Les courants AMPA sont également impliqués. La grande hétérogénéité des neurones à cette phase du développement implique donc qu'on aura des neurones présentant des GDPs avec une composante purement GABA et des neurones présentant des GDPs avec une composante GABAergique et une composante glutamatergique.

II.2 Rôle développemental des GDPs (Cherubini *et al.*, 2011).

Dans le cerveau, les modifications durables de la force synaptique dépendantes de l'activité, appelées les potentialisations à long terme (LTP) ou les dépressions à long terme (LTD), sont essentielles pour le développement des circuits neuronaux et le stockage de l'information dans le cerveau.

Plusieurs exemples de plasticités activité-dépendantes dans l'hippocampe en développement ont été montrés. Tout d'abord au niveau des synapses formées par les fibres moussues des cellules granulaires du gyrus denté et les cellules pyramidales de CA3, qui tôt dans le développement sont GABAergiques. Une procédure de pairing a été réalisée, dans laquelle les fibres moussues sont stimulées de façon concomitante au déclenchement d'un GDP au sein du neurone de CA3, de sorte que les excitations pré- et post-synaptique aient lieu en même temps, selon la loi hebbienne. Le résultat est une augmentation de l'efficacité synaptique pour des neurones auparavant silencieux présynaptiquement ou avec une faible probabilité de décharge (Kasyanov *et al.*, 2004). Ces données montrent que pendant le développement, les GDPs constituent un signal de détection de coïncidence essentiel à la maturation de la transmission GABAergique au niveau des connexions émergentes entre les fibres moussues et les cellules pyramidales de CA3. Les GDPs sont également déterminants dans la maturation des synapses glutamatergiques. En effet, un protocole de pairing similaire, effectué au

niveau des synapses formées par les collatérales de Schaffer des cellules pyramidales de CA3 et les cellules pyramidales de CA1, induit une potentialisation des courants spontanés et évoqués glutamatergiques (Mohajerani *et al.*, 2007).

Etant donné que ce sont des phénomènes de plasticité synaptique qui permettent le passage d'un réseau immature primitif à un réseau mature affiné et fonctionnel, le fait que les GDPs puissent modifier l'efficacité des synapses hippocampiques en fait de potentiels acteurs nécessaires au bon développement de l'hippocampe.

III. Plasticité synaptique (Michmizos *et al.*, 2011).

III.1 Historique.

En 1973, Bliss et Lomo ont montré que la stimulation de la voie perforante qui relie le cortex à l'hippocampe permettait l'enregistrement de décharges dans le gyrus denté. Une stimulation à haute fréquence pouvait induire une augmentation prolongée de la réponse synaptique neuronale. Ce phénomène a été défini comme une potentialisation à long terme (LTP, long term potentiation) de l'efficacité synaptique. Plus tard, il a été montré qu'une LTP pouvait être produite au niveau des cellules pyramidales de CA1 grâce à une brève stimulation tétanique à une fréquence physiologique pour des neurones de mammifères. Il s'avérait donc possible que ce type de modification synaptique ait lieu dans le cerveau vivant. De plus, ce phénomène de LTP s'est avéré pouvoir être stable pendant plusieurs semaines, un prérequis indispensable dans l'optique de considérer ce type de plasticité synaptique comme un paradigme expérimental de l'apprentissage. L'importance de l'hippocampe pour la mémoire ayant déjà été établie, les phénomènes de plasticité dans cette région du cerveau ont été très largement étudiés.

En 1979, Levy et Steward ont découvert la dépression à long terme (LTD, long term depression). Sur des tranches d'hippocampe, l'application d'une stimulation à basse fréquence au lieu d'une stimulation à haute fréquence induisait une réponse subséquente significativement plus faibles des neurones de CA1. Ces résultats firent l'objet d'un intérêt immédiat, étant donné qu'ils étaient en accord avec la théorie synaptique de stockage mnémonique : pour qu'un système de stockage d'information fonctionne au niveau de synapses neuronales, certaines d'entre elles doivent augmenter leur efficacité tandis que d'autres la voient diminuer.

En 1985, Stelzer, Slater et Bruggencate ont montré la première forme de plasticité des synapses GABAergiques. Ils ont montré, sur des tranches d'hippocampe, que l'application d'une stimulation électrique tétanique au

niveau du stratum radiatum pouvait induire une augmentation de l'efficacité synaptique conduisant à la genèse de décharges épileptiformes. Ce modèle d'épilepsie est appelé « kindling ». Ils ont montré que ce processus était accompagné d'une réduction des potentiels inhibiteurs postsynaptiques dépendante de l'activation des NMDARs post-synaptiques. Ils en ont conclu que la modulation de l'inhibition GABAergique par les NMDARs pouvait être la cause la plasticité synaptique qui induit le modèle « kindling » d'épilepsie.

III.2 LTP et LTD des synapses inhibitrices.

III.2.1 Différentes formes d'induction de plasticités GABAergiques (Gäiarsa *et al.*, 2002).

Plusieurs formes de plasticité des synapses inhibitrices ont été reportées dans différentes régions du cerveau, dont l'hippocampe, et via différents protocoles d'induction. Des stimulations à haute ou basse fréquence des afférences inhibitrices peuvent induire des formes de plasticité, mais ces patrons d'activité ne sont vraisemblablement pas expérimentés *in vivo*. D'autres protocoles conditionnant relèvent eux de conditions physiologiques ou pathologiques. Par exemple, dans l'hippocampe de rat en développement, une LTP GABAergique peut-être induite par l'application de bouffées de PAs à faible fréquence sur les cellules pyramidales de CA3. Ces bouffées sont similaires à ce que peuvent endurer ces cellules de par leur propriété de décharge intrinsèque ou lors des GDPs. Le point commun entre toutes les structures du cerveau étudiées à tous les stades développementaux et tous les protocoles d'induction utilisés est la nécessité d'une augmentation de la concentration en calcium, dans le compartiment pré- ou postsynaptique, voire dans les astrocytes avoisinants et via plusieurs sources potentielles. Dans l'hippocampe de rat en développement, une stimulation tétanique des afférences inhibitrices peut induire une LTP ou une LTD en fonction de la source de calcium sollicitée. L'induction de cette plasticité bidirectionnelle nécessite une dépolarisation de la membrane postsynaptique grâce à l'ouverture des GABA_ARs. Dans le cas d'une plasticité homosynaptique (synapses GABAergiques), cette dépolarisation va activer les VDCCs, qui vont eux-mêmes entraîner une cascade d'évènements conduisant à une LTP GABAergique. Dans le cas d'une plasticité hétérosynaptique (synapses GABAergiques et glutamatergiques), cette dépolarisation va activer les NMDARs, qui vont eux-mêmes entraîner une cascade d'évènements conduisant à une LTD GABAergique.

III.2.2 Différentes formes d'expressions de plasticités des synapses GABAergiques (Castillo *et al.*, 2001).

La diversité des formes de plasticité des synapses inhibitrices vient également du fait que leur expression peut se faire pré- ou postsynaptiquement (comme les synapses glutamatergiques). En effet, cette expression peut se manifester par un changement du nombre ou des propriétés des récepteurs au niveau des synapses fonctionnelles, un changement du potentiel d'inversion des réponses postsynaptiques, une modification de la probabilité de libération de neurotransmetteurs ou une modification du nombre de synapses fonctionnelles.

Comme la plupart des plasticités GABAergiques, l'induction d'une plasticité présynaptique inhibitrice nécessite une stimulation hétérosynaptique, le plus souvent des cellules excitatrices voisines. Cela nécessite qu'un signal soit transmis à la terminaison présynaptique via un messenger rétrograde. Ce messenger va être produit par la cellule postsynaptique de façon activité-dépendante et moduler la libération de neurotransmetteur par le compartiment présynaptique. Le glutamate peut lui-même servir de messenger. Nous allons ici traiter des 2 facteurs rétrogrades les plus étudiés : les endocannabinoïdes (eCBs) et le brain-derived neurotrophic factor (BDNF).

Dans plusieurs régions du cerveau, la stimulation répétée d'afférences glutamatergiques permet la libération d'eCBs. Les patrons d'activité nécessaires changent en fonction des régions, mais dans tous les cas, l'activation des mGluRsI sur la cellule postsynaptique est nécessaire. Ces récepteurs activés vont déclencher une cascade d'événements conduisant à la libération d'eCBs qui vont se fixer sur des récepteurs aux eCBs de type 1 (CB1Rs) au niveau du compartiment présynaptique. Ces CB1Rs sont couplés à des protéines $G_{i/o}$ qui vont inhiber la cascade de la protéine kinase A (PKA). Ceci va entraîner une suppression de la libération de neurotransmetteurs à court ou à long terme (Heifets *et al.*, 2008). C'est une forme de plasticité associative car elle nécessite également une activité présynaptique. Les eCBs sont largement exprimés dans le cerveau et induisent le même type de plasticité au niveau des synapses glutamatergiques.

Le BDNF peut être sécrété par les compartiments pré- et postsynaptique en réponse à une activité neuronale et moduler les synapses excitatrices et inhibitrices (Lessmann *et al.*, 2003 ; Lu *et al.*, 2003). Le patron de stimulation varie en fonction des régions du cerveau étudiées, mais cette libération nécessite toujours une augmentation intracellulaire en calcium via les VDCCs, les récepteurs NMDARs ou les réserves intracellulaires. Plusieurs études électrophysiologiques récentes montrent une action rétrograde du BDNF libéré par les dendrites potentialisant les synapses inhibitrices (Gubellini *et al.*, 2005 ; Liu Z *et al.*, 2007 ; Sivakumaran *et al.*, 2009). Le BDNF va ensuite se fixer aux récepteurs tyrosine kinase B (TrkBRS)

présynaptiques. En effet, l'application d'un inhibiteur de ces récepteurs, le k252a, dans le bain mais pas dans la cellule postsynaptique, inhibe cette potentialisation. L'application de BDNF concomitante à une stimulation des afférences inhibitrices restaure la LTP GABAergique inhibée par un chélateur de calcium, BAPTA, injecté dans le neurone postsynaptique. Mais, appliqué de cette façon, le BDNF peut également, selon la région du cerveau, le type cellulaire et la période développementale, augmenter le nombre de terminaisons, supprimer la libération de GABA (possiblement via une mobilisation des eCBs), moduler la transmission inhibitrice postsynaptiquement ou modifier l'expression de KCC2.

Plusieurs formes de plasticités inhibitrices sont attribuées à des changements postsynaptiques. Ces changements peuvent relever de différents mécanismes :

- le changement des fonctions du canal dû par exemple à une phosphorylation de ces derniers par des kinases
- la modification du cycle constitutif d'insertion et de retrait des récepteurs à la membrane
- la diffusion latérale à l'intérieur ou à l'extérieur des synapses fonctionnelles des récepteurs
- la modification de la concentration ionique intracellulaire.

III.2.3 Rôle de la plasticité inhibitrice (Maffei *et al.*, 2011 ; Castillo *et al.*, 2011).

De nombreuses études ont montré que la transmission synaptique inhibitrice était cruciale au développement et à la stabilité des circuits neuronaux. Ceci était basé sur l'assomption que ces synapses n'étaient pas plastiques et remplissaient leur fonction en supprimant l'excitabilité excessive du réseau. Il est cependant maintenant clair que ces synapses sont plastiques. La plasticité des synapses inhibitrices permet le contrôle direct et dynamique de l'excitabilité neuronale et de la balance excitation/inhibition de façon activité-dépendante. Ceci est crucial pour l'adaptation du réseau excitateur aux changements de l'excitabilité du circuit neuronal par des modifications des entrées environnementales. La maintenance de la stabilité du système nerveux est en effet un processus dynamique qui nécessite la plasticité de plusieurs composants cellulaires du circuit neuronal. La plasticité des synapses inhibitrices joue également un rôle central dans de nombreuses maladies neurologiques et psychiatriques, telles que l'épilepsie.

Chapitre 4 :

BDNF

I. Généralités (Lessman et al., 2003 ; Skaper, 2012).

En 1954, Levi-Montalcini et Hamburger implantent un sarcome de souris proche de la moelle épinière d'un poulet en développement *in ovo*. La sécrétion d'un facteur soluble va induire la croissance et l'hypertrophie de fibres neuronales sympathiques. Une protéine de faible poids moléculaire est identifiée : le NGF (nerve growth factor). Depuis, plusieurs autres molécules aux propriétés similaires ont été identifiées pour constituer la super famille des facteurs neurotrophiques. Ce sont des protéines sécrétées qui promeuvent la survie et la différenciation neuronale et la croissance neuritique. Le phénomène généralisé de mort programmée suite à une privation de cible (axotomie) suggère que la majorité des neurones répond à et est régulée par des facteurs neurotrophiques. Au sein de cette super famille, le NGF fait partie de la famille des neurotrophines (NTs). Celle-ci regroupe des protéines constituées d'homodimères liés de façon non covalent, présentant de fortes similarités de séquences, exprimées dans presque tous les neurones du système nerveux central (SNC) et périphérique (SNP) et possédant un rôle physiologique bien connu dans la régulation de la plasticité neuronale. Chez les autres familles de facteurs neurotrophiques, un rôle dans la plasticité synaptique n'a pas encore été établi. Les neurotrophines sont sécrétées par la cellule post-synaptique, non neuronale dans le SNP, majoritairement neuronale en conditions physiologiques dans le SNC. Pendant le développement, un flux rétrograde de neurotrophines est établi, transportant les neurotrophines de la cellule postsynaptique à la terminaison présynaptique, puis le long de l'axone jusqu'au corps cellulaire. Les neurones établissant ce flux survivent à la période de mort neuronale tandis que les autres meurent. Une fois ce flux rétrograde établi, il continue pendant toute la vie du neurone afin de maintenir son état fonctionnel différencié. Il existe également des modes de présentation des neurotrophines aux neurones différents : autocrine et paracrine lorsqu'elles sont sécrétées par des cellules différentes de la cible postsynaptique. Les neurotrophines présentent une action sur des sous-populations de neurones des SNC et SNP, distinctes mais parfois partiellement superposées et chaque neurone peut répondre à plusieurs neurotrophines à un moment donné ou à différents moments subséquent pendant le développement.

En 1982, Barde *et al.* isolent un facteur de survie neuronale présentant une homologie de séquence avec NGF, à partir du cerveau de cochon, le BDNF. Depuis, 4 autres membres de la famille des NTs ont été identifiés : NT-3, NT4/5, NT-6 et NT-7. Ces 2 derniers ne sont exprimés que chez le poisson, nous n'en discuteront pas plus ici.

NGF, BDNF et NT-3 jouent un rôle important dans la survie et la différenciation des neurones du SNP. NT-3 est le premier à être exprimé pendant l'embryogenèse et supporte la mitogenèse ou la sortie des précurseurs neuronaux du cycle cellulaire. Pendant le développement périnatal, il promeut la survie et la différenciation des neurones sensoriels, dont beaucoup deviennent dépendants de NGF à des stades plus tardifs du développement post-natal. Le BDNF est un facteur de survie pour une catégorie de ganglions de la racine dorsale et d'autres neurones sensitifs du SNP. Par contre, aucune neurotrophine n'a de rôle similairement indispensable dans la survie des neurones du SNC. Ceci s'explique par des phénomènes de compensation qui ont lieu dans le SNC. Par exemple, dans l'hippocampe et le cervelet, le rôle du BDNF et de NT-3 dans la survie neuronale n'est mis en évidence que lorsque les voies de signalisation

des 2 neurotrophines sont abrogées. Dans le SNC, les neurotrophines semblent essentiels pour la différenciation et la modulation des fonctions neuronales plus que pour la survie. Pendant le développement post-natal du SNP, les neurotrophines voient leur rôle évoluer de simples agents de survie vers des facteurs de différenciation, supportant par exemple la croissance neuritique. Les neurotrophines sont également importantes dans le SNC et le SNP pour la protection des neurones contre l'excitotoxicité, l'hypoxie et l'hypoglycémie ; elles ont donc un rôle essentiel dans la promotion de la survie suite à des insultes neuronales.

II. BDNF : synthèse, adressage, maturation et localisation (Lessmann *et al.*, 2003 ; Lessmann *et al.*, 2009 ; Skaper, 2012).

Le BDNF est la neurotrophine la plus exprimée dans le cerveau de mammifère en développement et adulte, ainsi que la principale neurotrophine dans l'hippocampe. Lors du développement, il est impliqué dans plusieurs formes de plasticité synaptique, notamment dans l'hippocampe. Pour cette raison, la suite de l'introduction sera focalisée sur le BDNF.

II.1 Synthèse.

Dans le cerveau des mammifères, le BDNF est synthétisé de façon activité-dépendante. L'expression du BDNF est faible à la naissance mais augmente drastiquement durant la première semaine de vie postnatale, et est prédominante dans l'hippocampe, le néocortex et le cervelet. Dans l'hippocampe, ce sont principalement les neurones glutamatergiques, les cellules pyramidales et granulaires, et les cellules microgliales activées qui expriment du BDNF. Cette expression augmente fortement avec l'activité neuronale physiologique et physiopathologique. Ceci a pour but de remplir respectivement 2 fonctions : l'augmentation locale de BDNF qui va engendrer un feedback positif sur la fonction de la synapse activée ; suite à une injure neuronale, protéger contre l'excitotoxicité.

Comme tous les neuropeptides, les neurotrophines sont synthétisées sous forme de précurseurs, les pré-proneurotrophines (240-260 acides aminés). Ces précurseurs doivent être clivés afin d'obtenir une protéine homodimérique mature (118-129 acides aminés pour un monomère). Le pré-ARN messager va diriger la synthèse protéique dans les ribosomes attachés au réticulum endoplasmique (RE), ce qui va permettre la séquestration des polypeptides ainsi traduits dans ce dernier. Immédiatement après, les pré-proneurotrophines vont être clivées afin de donner ce qu'on appelle des peptides signal et des proneurotrophines. Celles-ci vont former des homodimères de façon non-covalente ou des hétérodimères entre différentes proneurotrophines. Puis elles transitent dans l'appareil de Golgi, semblerait-il via des vésicules non

recouvertes de clathrines et s'accumulent dans le réseau trans-Golgien (trans-Golgian network, TGN).

Il existe plusieurs ARNm du BDNF, conduisant à l'obtention de la même protéine, mais sous le contrôle de différents promoteurs (Aid *et al.*, 2007). Ces différents ARNm issus de l'épissage alternatif sont composés de différents exons (I-IX) et confèrent des patrons d'expression différents à ces derniers. Par exemple, les ARNm contenant l'exon III vont être traduits de façon constitutive, tandis que ceux contenant les exons IV et VII seront traduits de façon régulée. Les ARNm contenant les exons I et IV vont être traduits dans le soma et ceux contenant les exons II et VI vont être traduits dans le compartiment somato-dendritique.

II.2 Adressage.

A partir du TGN, 2 types de vésicules, remplies d'un ou plusieurs types de neurotrophines, peuvent bourgeonner à la surface de ce dernier (figure 5):

- les petites vésicules de ce qu'on appelle la voie constitutive vont être transportées par défaut jusqu'à la périphérie de la cellule et peuvent fusionner avec la membrane de celle-ci sans mécanisme d'induction (ne nécessite pas d'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire). Cette voie est présente dans tous les types cellulaires.
- les grosses vésicules de la voie régulée, présentant (large dense core vesicles) ou non un cœur dense aux électrons, vont fusionner avec la membrane de façon calcium-dépendante et il semblerait plutôt au niveau de sites de libération spécialisés riches en cholestérol. Cette voie n'est présente que dans les cellules excitables. Dans les cellules non-neuronales, une sécrétion calcium-indépendante participe à la voie régulée.

L'adressage du BDNF dépend d'un polymorphisme val66met dans le prodomaine. Le val-BDNF emprunte la voie régulée tandis que le metBDNF (40% chez les humains) ne peut pas être libéré de façon activité-dépendante. Une séquence additionnelle d'information présente dans la portion mature et constituant un site de reconnaissance pour la carboxypeptidase E semble agir de concert avec les informations d'adressage du prodomaine. Un récepteur d'adressage résidant du Golgi, la sortiline, interagit avec le prodomaine pour orienter le BDNF vers la voie de sécrétion régulée. La sortiline agit également comme co-récepteur de p75^{NTR} dans la signalisation pro-apoptoyique du proBDNF et du proNGF.

Dans le TGN, des complexes protéiques membranaires constitués de chromogranines, de sécrétogranines II, de carboxypeptidases E, de sortiline et d'autres protéines d'adressage forment des clusters qui se lient au BDNF et induisent le bourgeonnement de granules de sécrétion. La carboxypeptidase E est également impliquée dans le mouvement des vésicules de BDNF le long des microtubules : la queue cytoplasmique de la carboxypeptidase E interagit avec le système de transport des microtubules.

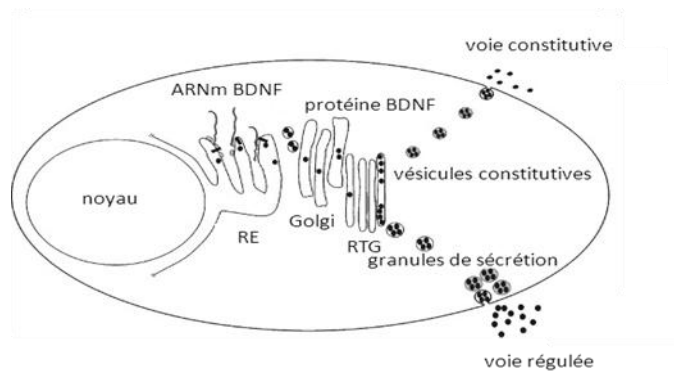


Figure 5. Voies de sécrétion constitutive et régulée du BDNF, d'après Lessman, 2003. RE ; réticulum endoplasmique ; RTG : réseau trans-Golgien.

II.3 Maturation.

Les neurotrophines sont glycosylées au niveau de leur prodomaine, ce qui semble être important pour la sortie du RE et l'évitement de la voie de dégradation intracellulaire. Les oligosaccharides ainsi générés vont ensuite être sulfatés.

Le clivage de ce prodomaine va ensuite générer les neurotrophines matures. Ce clivage peut être fait intracellulairement par différentes proprotéines convertases (PCs) : PC1/3, PC2, PC4, PC5/6, PC7, paired basic amino acid cleaning enzyme 4 (PACE4) et furine. L'activité de ces sérineprotéinases nécessite une concentration en calcium comprise entre 10μM et 10mM et un pH d'une valeur comprise entre 5 et 7, conditions qu'on retrouve dans le TGN et dans les granules de sécrétion. Selon leur localisation subcellulaire, on définit 2 groupes de convertases :

- PC1/3, PC2, PC4 et PC5/6A, qui ne possèdent pas de domaine trans-membranaire (TM) et sont présentes dans les vésicules de la voie régulée ; elles sont donc spécifiques de cette dernière
- PACE4, PC5/6B, PC7 et furine, qui possèdent un TM et sont présentes dans le TGN, les endosomes et dans de rares cas dans les vésicules de la voie constitutive.

En fonction du pH optimal des convertases présentes dans une cellule, le clivage se fera dans l'appareil de Golgi, dans le TGN ou dans les vésicules de sécrétion.

La furine est présente de façon ubiquitaire dans tous les tissus, mais est fortement exprimée dans l'hippocampe et les neurones corticaux. C'est la convertase la mieux caractérisée et probablement la plus abondante dans les cellules non excitables. Le clivage du BDNF par la furine n'est pas très efficace, ce qui est en accord avec plusieurs rapports indiquant que les protéines empruntant la voie régulée sont moins sensibles à la furine qu'aux PCs de la voie régulée. Pourtant, lorsqu'on exprime toutes les combinaisons

possibles de convertases de la voie régulée dans des lignées cellulaires possédant seulement la voie de sécrétion constitutive, les PCs les plus efficaces sont furine, PACE4 et PC5/6B. Le clivage du proBDNF est donc dépendant du répertoire de convertases présent au sein de la cellule, et bien que les 2 groupes puissent potentiellement cliver le proBDNF, aucun d'eux n'est vraiment efficace, laissant une grande partie du proBDNF intracellulaire non clivé (Mowla *et al.*, 1999 ; Farhadi *et al.*, 2000).. Contrairement à ce qui a pu être pensé, ce clivage n'est pas un prérequis à la sécrétion. Le clivage peut également se faire extracellulairement par la voie tPA/plasmine ou par les métalloprotéases de la matrice extracellulaire.

A la suite du clivage intracellulaire, des exoprotéases vont enlever les résidus N-terminaux et/ou C-terminaux. Ensuite, d'autres modifications post-traductionnelles peuvent avoir lieu, telles que la N-acétylation ou l'amidation carboxy-terminale. Bien que toutes les enzymes nécessaires à ces modifications soient présentes dans les granules de sécrétion, il n'est toujours pas certain que tous les neuropeptides subissent toutes ces modifications post-translationnelles. Ces modifications ont des conséquences très importantes. Par exemple, le BDNF est la NT la plus efficacement adressée à la voie de sécrétion régulée. Dans son prodomaine, aucune séquence consensus nécessaire à l'adressage vers la voie régulée n'a été identifiée, mais plusieurs motifs de séquence et domaines protéiques contribuent synergiquement aux mécanismes responsables de l'orientation des NTs dans cette voie. Ces mécanismes incluent les interactions électrostatiques de clusters chargés négativement dans le prodomaine avec des acides aminés chargés positivement dans la portion mature et les interactions moléculaires entre le prodomaine et des récepteurs résidents du TGN triant les NTs vers les granules de sécrétion (certaines PCs, carboxypeptidase E, chromogranine...). L'autoaggrégation des pro-protéines et la formation de ces complexes protéiques hétéromoléculaires sont des étapes clefs dans l'adressage des proNTs dans les granules de sécrétion.

II.4 Localisation.

Selon la théorie classique, les NTs sont sécrétées par des cellules non-neuronales (peau, muscles, glandes) ou par le soma et les dendrites de cellules neuronales innervées. Suite à leur sécrétion, elles se lient aux TrkRs ou aux p75^{NTR}, ce qui entraîne leur endocytose. S'en suit leur transport rétrograde le long de l'axone jusqu'au soma de la cellule innervante. Elles induisent alors l'activation de cascades de signalisation cellulaires, qui peuvent par exemple induire l'expression de gènes.

Cependant il existe également un transport antérograde, où le BDNF est synthétisé par la cellule innervante et transporté via l'axone au niveau de la synapse où il pourra agir de façon autocrine ou paracrine sur la cellule cible.

Dans les neurones de l'hippocampe, le BDNF est prédominant dans le compartiment somato-dendritique, mais il est également présent dans l'axone et la terminaison présynaptique. Sa localisation est activité-dépendante. En

conditions basales, la faible abondance de BDNF rend sa détection difficile. Afin de déterminer sa localisation, il a donc fallu utiliser des protéines chimériques surexprimées, BDNF-GFP, dont le traitement et l'adressage sont similaires au BDNF endogène dans les neurones du SNC. Le BDNF-GFP s'accumule majoritairement dans des granules de sécrétion positifs à la sécrétogranine II accumulées au niveau des synapses glutamatergiues du SNC. Dans l'hippocampe, plus de 95% du BDNF-GFP se trouve dans les dendrites.

III. BDNF : libération activité-dépendante (Lessmann *et al.*, 2003 ; Lessmann *et al.*, 2009 ; Kuczewski *et al.*, 2010 ; Skaper, 2012).

III.1 Site de libération.

La libération via la voie de sécrétion constitutive ne nécessitant pas de mécanisme d'induction, nous étudierons ici les mécanismes de libération via la voie de sécrétion régulée.

Le niveau de BDNF endogène est faible dans les neurones du SNC ; par conséquent, la plupart des études portant sur la libération de BDNF ont été faites sur cultures dissociées de neurones hippocampiques transfectées par un vecteur viral surexprimant du BDNF marqué (myc ou GFP). Ces études ont montré que la sécrétion de BDNF peut se faire de façons pré- et postsynaptique. En 2001, Hartmann *et al.* ont montré, sur des cultures surexprimant du BDNF-GFP, une accumulation de cette protéine chimérique dans des vésicules de sécrétion au niveau des jonctions glutamatergiques. Suite à un stimulus téτανique à haute fréquence, une diminution de la fluorescence dans le compartiment dendritique indique indirectement une sécrétion de BDNF postsynaptique. Cette libération est inhibée en présence d'antagonistes des NMDARs et des AMPARs et est dépendante d'un influx calcique postsynaptique. Un marquage fluorescent axonal a néanmoins également été observé. En 2001 également, Kohara *et al.* ont montré, sur des cultures de neurones néocorticaux surexprimant BDNF-GFP, un mouvement antérograde axonal de la fluorescence puis, 24h après, une transmission de cette fluorescence aux somas des cellules adjacentes, phénomène bloqué par la tétródotoxine (TTX). Comme dans l'étude précédente, un marquage fluorescent dendritique a également été observé.

Le BDNF libéré dans l'espace extracellulaire peut être internalisé subséquemment à sa fixation aux TrkBRS. Il peut alors être ré-exocyté par le neurone sécréteur ou une cellule voisine neuronale ou gliale (astrocytes). Le BDNF est internalisé dans des vésicules endosomales qui peuvent entrer dans la voie de ré-exocytose locale et rapide ou bien fusionner avec des endosomes et entrer dans la voie de ré-exocytose distante. Ces mécanismes de ré-exocytose sont encore méconnus mais semblent être différents des mécanismes d'exocytose.

Le BDNF peut donc être libérée de façon extrasynaptique, présynaptique et postsynaptique. En 2009, Matsuda *et al.* ont montré, sur des cultures de neurones hippocampiques, que quelques potentiels d'actions élicitaient une fusion transitoire des vésicules contenant du BDNF avec la membrane plasmique, suivie par une récupération immédiate de la vésicule par l'axone. Dans les dendrites, la même stimulation entraîne une fusion complète des vésicules. Des modes de sécrétion similaires dendritique complète versus axonale partielle ont également été observés dans des cultures neuronales dépolarisées avec une forte concentration en potassium extracellulaire. La libération postsynaptique semble donc être la voie de sécrétion principale de BDNF.

III.2 Mécanisme de libération.

Les libérations dendritique et axonale de BDNF nécessitent la genèse de potentiels d'action (PA) ainsi qu'une entrée massive et soutenue de calcium dans la cellule sécrétrice. Cependant, les mécanismes de sécrétion axonale sont moins connus que les mécanismes de sécrétion dendritique, qui constituent semble-t-il la voie de libération principale du BDNF. Nous nous focaliseront donc sur ces derniers dans la partie suivante.

Les différents patrons d'activité pouvant engendrer la libération postsynaptique de BDNF sont les suivants :

- une stimulation haute fréquence des fibres excitatrices.
- une dépolarisation prolongée de la membrane postsynaptique.
- la rétropropagation de PA vers le compartiment dendritique.

Plusieurs études ont permis d'établir un modèle de libération de BDNF au niveau des synapses glutamatergiques. Selon ce modèle, la libération de glutamate par la terminaison présynaptique, suite à l'arrivée de PA, induit l'activation des mGluRs et des AMPARs post-synaptiques. Ces derniers vont induire une dépolarisation de la membrane neuronale et activer les NMDARs ainsi que les VDCCs. Cela va engendrer un influx de calcium dans le compartiment postsynaptique. Les mGluRs vont activer la phospholipase C (PLC), qui elle-même va activer l'inositol triphosphate (IP3). Le calcium et l'IP3 ainsi accumulés dans la cellule vont alors activer les récepteurs sensibles à IP3 et les récepteurs ryadonine, respectivement, se trouvant à la surface des réserves intracellulaires en calcium. Celles-ci vont alors libérer à leur tour du calcium, augmentant et soutenant l'élévation en calcium intracellulaire. Celui-ci va alors activer la CaMKII qui va induire la fusion des vésicules de sécrétion avec la membrane plasmique postsynaptique. La libération axonale nécessite également un influx de calcium extracellulaire ainsi que la mobilisation des réserves en calcium intracellulaires et l'activation de la CaMKII. Les AMPARs perméables au calcium ainsi que les kainateRs pourraient également participer à l'influx calcique. Au niveau des synapses GABAergiques, l'activation des GABA_BRs entraîne également une libération de BDNF mais via l'activation de la PLC et de la phosphokinase C. La sécrétion de BDNF est inhibée par la synaptotagmine IV, une protéine de transport membranaire.

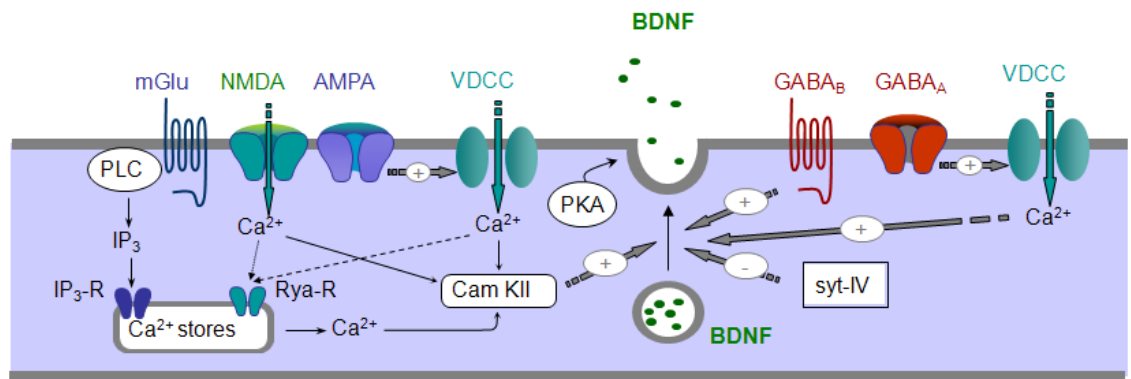


Figure 6. Sécrétion dendritique régulée du BDNF, d'après Kuczewski, 2010.

La libération du BDNF se fait via la fusion des vésicules de sécrétion avec la membrane plasmique selon le mode « kiss and run ». Celui-ci consiste en une ouverture d'un pore de fusion, suivi rapidement par sa fermeture et ainsi de suite, permettant ou non la libération totale ou partielle du contenu des vésicules. La vitesse de sécrétion du BDNF est limitée par plusieurs paramètres :

- la SgII forme dans les vésicules, en présence d'une concentration élevée en calcium et d'un pH faible, une matrice à la structure quasi-cristalline qui emprisonne les neuropeptides. L'ouverture du pore de fusion permet une neutralisation du pH intravésiculaire et une dissolution du cœur peptique des granules de sécrétion. Ce processus lent est un prérequis indispensable à la libération du BDNF.
- les neurotrophines présentes dans une vésicule peuvent appartenir à des groupes ou être dans des états de maturation différents. Les pores de fusion étant assez étroits, la taille et le nombre des différentes neurotrophines présentes dans un même granule de sécrétion vont donc être des facteurs limitant à la sécrétion du BDNF.

La libération de BDNF est dépendante de l'activité de la protéine kinase A (PKA), ce qui peut être dû au fait que celle-ci régule l'ancrage des granules de sécrétion au niveau des sites de libération.

La diffusion du BDNF dans le milieu extracellulaire est très limitée. En effet, le BDNF est ce qu'on appelle une molécule « collante » ; à pH physiologique, le BDNF est chargé positivement et va donc interagir et se fixer à toutes les molécules environnantes chargées négativement. De plus sa liaison aux TrkBRS entraîne son internalisation. Le BDNF doit donc être libéré près de sa cible. La présence d'ARNm codant pour le BDNF au niveau des dendrites permet une synthèse locale de BDNF et une action ciblée sur des sous-populations de synapses et/ou de neurones.

III.3 Libération BDNF mature versus proBDNF.

Jusqu'à récemment, on pensait que le BDNF mature (mBDNF) était la seule forme de BDNF libérée et biologiquement active. Or, plusieurs études ont montré que le proBDNF pouvait être sécrété et jouer un rôle dans plusieurs processus développementaux.

En 1995, Heymach *et al.* ont montré pour la première fois que des cellules mammifères en culture transfectées pouvaient sécréter du proBDNF. En 2001, Lee *et al.* ont montré que le proBDNF était libéré par des cellules 293 transfectées en culture, et que la cascade de protéases tPA/plasmine et les métalloprotéases pouvaient cliver le BDNF immature dans le milieu extracellulaire. Enfin en 2004, Pang *et al.* ont montré que la cascade tPA/plasmine jouait un rôle essentiel dans l'induction d'une LTP hippocampique BDNF-dépendante sur tranches aigües, vraisemblablement via le clivage du proBDNF dans le milieu extracellulaire. Il semble donc que le proBDNF puisse être sécrété et que son clivage par la cascade tPA/plasmine soit nécessaire à la fonction du BDNF mature sur la potentialisation des synapses hippocampiques.

En 2005, Rösch *et al.* ont identifié une LTD $p75^{NTR}$ -dépendante sur tranches hippocampiques aigües et Teng *et al.* ont montré que du proBDNF endogène pouvait être sécrété par des neurones corticaux en culture. Cette même année, Woo *et al.* ont montré que l'application de proBDNF non-clivable (cleavage resistant-proBDNF, CR-proBDNF) sur tranches hippocampiques aigües facilitait l'apparition de LTD chez des souris wild-type (WT) mais pas chez des souris KO pour $p75^{NTR}$. Enfin, en 2008, Bergami *et al.* ont montré que du proBDNF endogène pouvait être sécrété par des tranches corticales aigües. Le proBDNF peut donc être sécrété sans être surexprimé et être impliqué dans des phénomènes de plasticité synaptique.

En 2009, Nagappan *et al.* ont montré que des neurones hippocampiques transfectés pouvaient sécréter du proBDNF de façon activité-dépendante. Cette même année, Yang *et al.* ont montré que du proBDNF endogène pouvait être libéré par des neurones hippocampiques en culture (mais voir Matsumoto *et al.* 2008) et que le CR-proBDNF pouvait induire une dépression et une rétraction des synapses neuro-musculaires en culture et Koshimizu *et al.* que l'application CR-proBDNF sur neurones hippocampiques en cultures primaire et organotypique induisait une diminution de la densité des épines dendritiques. Les neurones hippocampiques en culture peuvent donc sécréter du proBDNF de façon activité-dépendante et le proBDNF semble pouvoir déprimer des synapses via des modifications morphologiques.

III.4 Importance de la libération dendritique de BDNF (An et al., 2008).

Le BDNF peut être épissé de 2 façons différentes, conduisant à des sites et à des niveaux de polyadénylation différents. On nomme les transcrits ainsi produits 3'-UTR courts et 3'-UTR longs. Ces derniers sont en majorité au niveau des dendrites, tandis que les 3'-UTR courts sont restreints au niveau du compartiment somatique. Chez des souris mutantes ne possédant pas de messagers 3'-UTR longs, le niveau protéique de BDNF augmente dans le soma et diminue dans les dendrites, indiquant qu'une partie du BDNF dendritique est issu d'une synthèse locale, vraisemblablement grâce aux ARNm 3'-UTR. On observe également chez ces souris une augmentation de la densité et une diminution de l'épaisseur des épines dendritiques des neurones pyramidaux de CA1 et une diminution de la LTP. La synthèse locale de BDNF et sa sécrétion dendritique subséquente semblent donc jouer un rôle important dans la croissance neuritique et la plasticité synaptique.

III.5 Récepteurs aux neurotrophines.

Les neurotrophines interagissent avec 2 classes de récepteurs complètement différents : les récepteurs pan-neurotrophiques 75 (p75^{NTR}) et les récepteurs tyrosine-kinase (TrkRs).

III.5.1 Les récepteurs p75^{NTR}.

Les p75^{NTR} sont les premiers membres de la super famille des récepteurs aux facteurs de nécrose tuméreuse et ont d'abord été identifié comme des récepteurs de faible affinité au NGF. Il a finalement été montré qu'ils possèdent la même affinité pour les autres neurotrophines, avec une affinité mille fois supérieure pour les formes précurseurs. Ils possèdent dans leur domaine extracellulaire 4 domaines répétés riches en cystéine, participant à la liaison aux NTs, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique contenant un « domaine de mort » comme les autres membres de cette superfamille. Ils ne possèdent pas de domaine catalytique mais interagissent avec de nombreuses protéines reliant le signal jusqu'à l'intérieur de la cellule. Leur expression est régulée spatialement et temporellement : aux stades précoces du développement, correspondant aux phases de mort cellulaire développementale et de synaptogenèse, ils sont fortement et largement exprimés dans le cerveau, puis cette expression diminue avec l'arrivée à l'âge adulte. Cependant, elle peut réapparaître suite à des blessures neuronales (Yang *et al.*, 2009).

Les voies de signalisation sollicitées par l'activation des p75^{NTR} (figure 7) et leurs conséquences dépendent de la présence ou non d'un co-récepteur et le cas échéant, de la nature de ce dernier. En effet, les p75^{NTR} peuvent se lier avec une protéine contenant un domaine Vsp10, la sortiline. Les principales voies de signalisation activées sont alors NF-κB, c-Jun et RhoA. Les principales conséquences de l'activation des p75^{NTR} sont la transcription de gènes pro-apoptotiques et des phénomènes d'inhibition de la croissance neuritique et de plasticité synaptique. Ils peuvent également former un complexe de récepteurs avec le récepteur Nogo-66 et LINGO-1. L'activation de ce complexe par des protéines de myéline induit l'activation de Rho A et l'inhibition de la croissance du cône axonal.

III.5.2 Les récepteurs TrkRs.

Chez les mammifères, la sous-famille des TrkRs représente la 2ème classe majeure de récepteurs aux neurotrophines. Ces récepteurs sont constitués dans la partie extracellulaire d'un cluster riche en cystéine, 3 domaines répétés riches en leucine, un autre cluster riche en cystéine, et 2 domaines Ig-like, site de liaison aux neurotrophines. Ils possèdent un seul domaine transmembranaire, suivi d'une terminaison cytoplasmique constituée d'un domaine tyrosine kinase, entouré de plusieurs résidus tyrosine servant de sites d'amarrage phosphorylation-dépendants pour les adaptateurs cytoplasmiques et enzymes. Chaque neurotrophine présente une spécificité pour un TrkR particulier : NGF se lie préférentiellement à TrkA, BDNF et NT-4/5 se lient à TrkB avec une forte affinité, NT-3 se lie à TrkC, et à TrkA et TrkB avec une plus faible affinité.

Suite à la liaison par leur ligand des TrkRs, ces derniers se dimérisent. Leurs domaines tyrosine kinase vont alors se transphosphoryler. Les résidus tyrosines phosphorylés vont servir de plateforme au recrutement de protéines adaptatrices et d'enzymes qui vont propager le signal des neurotrophines. Les voies de signalisation majeures ainsi sollicitées sont les voies Ras, PI3-kinase et PKC. Les TrkRs sont ensuite endocytés pour être transportés dans d'autres compartiments cellulaires ou d'autres protéines adaptatrices sont localisées et/ou être dégradés. Les finalités des différentes voies de signalisation activées par les TrkRs peuvent être des phénomènes de plasticité synaptique et/ou de transcription de gènes pro-survie et/ou pro-différenciation (figure 7). Les TrkRs peuvent également activer les canaux TRPCs (transient receptor potential canonical) via la PLC (Amaral *et al.*, 2007). Ils pourraient également activer un canal sodique (Na_v1.9) et induire ainsi induire une dépolarisation et une entrée de calcium (Blum *et al.*, 2002).

Les fonctions des TrkRs sont modulées par les p75^{NTR} : ces derniers promeuvent la liaison aux neurotrophines (Esposito *et al.*,

2001), la promotion de l'endocytose du complexe NTs/TrkRs et le transport rétrograde vers des compartiments membranaires propices à la signalisation. Par exemple, les p75^{NTR} empêchent la liaison des TrkRs à leur neurotrophine non-préférée, mais il potentialise l'activation de TrkA par des concentrations sous-optimales de NGF. Les p75^{NTR} collaborent avec TrkA pour former des sites de liaison de haute affinité avec NGF. Ils permettent également de diminuer l'ubiquitination des TrkRs induite par leurs ligands, ce qui retarde leur internalisation et leur dégradation. Dans l'autre sens, ils promeuvent la polyubiquitination des TrkRs, permettant ainsi leur endocytose et leur internalisation dans des compartiments endosomaux, augmentant ainsi leur signalisation.

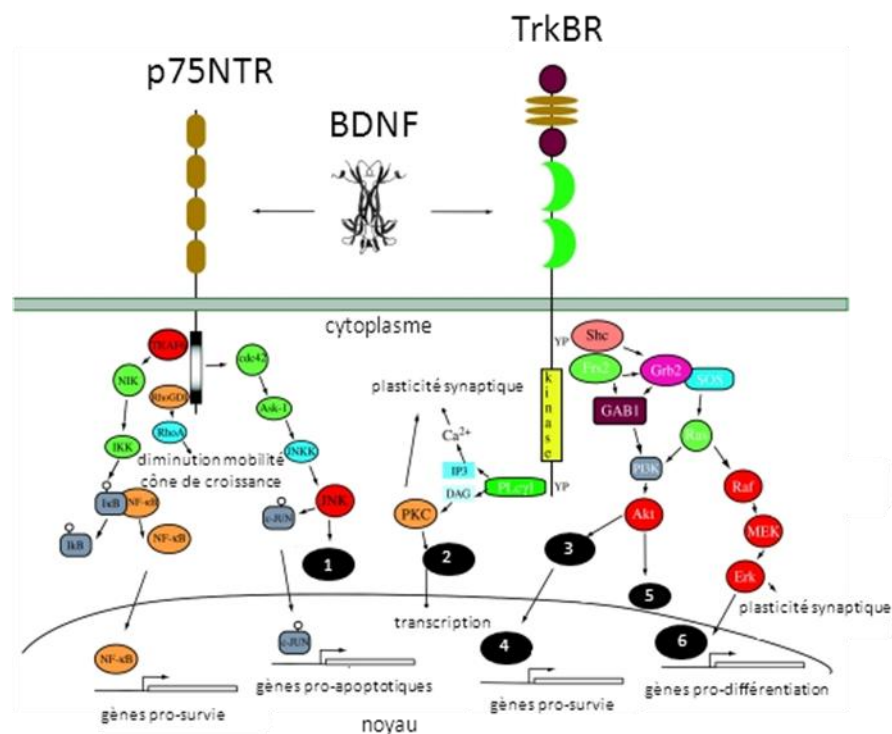


Figure 7. Voies de signalisation des TrkBRS et des p75^{NTR}, d'après Reichardt, 2007. 1 : autres substrats ; 2 : substrats ; 3 et 4 : facteurs de transcription ; 5 : autres substrats promouvant la survie et la croissance ; 6 : substrats promouvant la différenciation.

III.5.3 Rôle du BDNF dans le SNC en développement.

Le BDNF joue un rôle central dans le développement du système nerveux : les souris KO BDNF homozygotes ne sont pas viables. En effet, il a été montré que le BDNF est impliqué dans la survie cellulaire (Ichim *et al.*, 2012), la neurogenèse et la croissance de différents types neuronaux (Binder, 2004), la croissance et le guidage du cône axonal et la différenciation morphologique et l'arborisation des axones, des dendrites et épines dendritiques (Cohen-Cory *et al.*, 2010 ; Yoshii *et al.*, 2010), et enfin dans la

plasticité des synapses glutamatergiques et GABAergiques, via une action pré- ou postsynaptique ou une modification de l'excitabilité neuronale (Poo, 2001). Le BDNF peut être impliqué dans ces diverses étapes développementales dans différentes régions du cerveau, dont le cortex, l'hippocampe, le cervelet... Nous nous intéresseront ici spécifiquement au rôle du BDNF dans le développement des synapses GABAergiques dans l'hippocampe en développement.

IV. BDNF et développement des synapses GABAergiques.

IV.1 Migration et différenciation.

Le rôle du BDNF dans la migration neuronale hippocampique n'a été que peu étudié. En 2002, Polleux *et al.* ont montré que le BDNF jouait un rôle dans la migration des neurones GABAergiques issus de la MGE vers l'hippocampe. En effet, le traitement au BDNF d'une coculture de GE et de cortex (avec hippocampe), induit une migration des cellules GABAergiques de la GE vers la tranche de cortex.

Le rôle du BDNF dans la différenciation morphologique et fonctionnelle des neurones GABAergiques a quant à lui largement été démontré. En effet, l'application de BDNF exogène sur des cultures hippocampiques immatures permet la maturation de l'arborisation dendritique et l'augmentation de l'expression de GAD ainsi que de la libération de GABA (Yamada *et al.* 2002; Berghuis *et al.* 2004) et la maturation de l'arborisation axonale et l'augmentation de l'expression de GABA_A (Vicario-Abejon *et al.* 1998 et 2000) des neurones GABAergiques. Elle peut également permettre la formation de synapses inhibitrices et excitatrices (Vicario-Abejon *et al.* 1998 et 2000). Il a été montré que l'activité neuronale, et plus particulièrement GABAergique, pouvait être à l'origine de la libération du BDNF impliqué dans ces processus (Marty *et al.* 1996 et 2000).

IV.2 Plasticité et maturation.

Une fois que les neurones ont acquis un phénotype et ont établi des connexions synaptiques fonctionnelles, ces dernières doivent être éliminées ou renforcées afin d'affiner l'efficacité du réseau ainsi formé. Dans l'hippocampe de rat en développement, la libération de BDNF suite à une dépolarisation postsynaptique induit une augmentation de la transmission GABAergique (Gubellini *et al.*, 2001 et 2005). Selon la structure étudiée, le type cellulaire et le stade développemental, le BDNF peut potentialiser ou déprimer l'efficacité des synapses GABAergiques via des modifications présynaptiques (probabilité de libération, nombre de terminaisons...) ou postsynaptiques (nombre de

récepteurs fonctionnels à la membrane, propriétés de ces récepteurs, expression de KCC2...) (Lessmann *et al.*, 2009).

IV.3 Rôle développemental (Lessmann *et al.*, 2009).

Le BDNF est une neurotrophine produite dans l'hippocampe par les cellules principales excitatrices. Sa synthèse ainsi que sa libération et la forme sous laquelle il est libéré sont dépendants de l'activité neuronale expérimentée par ces cellules. Il a largement été montré que cette activité neuronale est impliquée dans la maturation du cerveau et plus particulièrement du circuit hippocampique. Dans de nombreuses études, cette implication a été attribuée au BDNF, étant donné l'absence d'effet de cette activité lorsque celui-ci est inactif (souris KO, blocage pharmacologique...) ou étant donné le fait que l'application de BDNF exogène puisse mimer les effets de cette activité. Cependant, dans l'hippocampe de rat en développement, les effets de la libération endogène de BDNF sur les synapses GABAergiques ainsi que la forme libérée et le type d'activité permettant cette libération n'ont pas encore été étudiés. Le but de cette thèse est donc de comprendre comment, via la modulation de l'expression et de la libération de BDNF, l'activité neuronale immature présente dans l'hippocampe de rat en développement peut moduler le développement de la transmission synaptique GABAergique afin de conduire à une structure cérébrale mature et fonctionnelle.

Résultats

Article 1

Spontaneous glutamatergic activity induces a BDNF-dependent potentiation of GABAergic synapses in the newborn rat hippocampus

Nicola Kuczewski^{1,2}, Anais Langlois^{1,2}, Hervé Fiorentino^{1,2}, Stéphanie Bonnet^{1,2}, Thomas Marissal^{1,2}, Diabe Diabira^{1,2}, Nadine Ferrand^{1,2}, Christophe Porcher^{1,2} and Jean-Luc Gaiarsa^{1,2}

¹INSERM U901 (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 901), INMED (Institut de Neurobiologie de la Méditerranée), Marseille 13009, France

²Aix Marseille Université, Faculté des Sciences, Marseille 13000, France

Spontaneous ongoing synaptic activity is thought to play an instructive role in the maturation of the neuronal circuits. However the type of synaptic activity involved and how this activity is translated into structural and functional changes is not fully understood. Here we show that ongoing glutamatergic synaptic activity triggers a long-lasting potentiation of γ -aminobutyric acid (GABA) mediated synaptic activity (LLP_{GABA-A}) in the developing rat hippocampus. LLP_{GABA-A} induction requires (i) the activation of AMPA receptors and L-type voltage-dependent calcium channels, (ii) the release of endogenous brain-derived neurotrophic factor (BDNF), and (iii) the activation of postsynaptic tropomyosin-related kinase receptors B (TrkB). We found that spontaneous glutamatergic activity is required to maintain a high level of native BDNF in the newborn rat hippocampus and that application of exogenous BDNF induced LLP_{GABA-A} in the absence of glutamatergic activity. These results suggest that ongoing glutamatergic synaptic activity plays a pivotal role in the functional maturation of hippocampal GABAergic synapses by means of a cascade involving BDNF release and downstream signalling through postsynaptic TrkB receptor activation.

(Received 20 June 2008; accepted after revision 2 September 2008; first published online 4 September 2008)

Corresponding author J.-L. Gaiarsa: INMED, Parc scientifique de Luminy, BP 13, 13273 Marseille Cedex 9, France.

Email: gaiarsa@inmed.univ-mrs.fr

Ongoing synaptic activity plays an important role in the construction and refinement of developing neuronal networks (Zhang & Poo, 2001). However the type of synaptic activity involved and how activity is translated into structural or functional changes are not fully understood. Neurotrophins, in particular brain-derived neurotrophic factor (BDNF), are attractive candidates. Neurotrophins are secreted proteins whose expression and release are up-regulated by neuronal activity (Lessmann *et al.* 2003). Moreover, impairing network activity produces structural and functional alterations that can be reverted by application of exogenous BDNF (McAllister *et al.* 1996; Rutherford *et al.* 1997; Marty *et al.* 2000; Seil & Drake-Baumann, 2000). These observations therefore suggest that activity-dependent secretion of BDNF can act as a regulatory mechanism of network development and plasticity. However, to date most of the studies investigating the effects of BDNF on synaptic development or efficacy have relied on non-physiological application of exogenous BDNF (Marty *et al.* 1996, 2000; MacLean Bolton *et al.* 2000; Jin *et al.* 2003) or on chronic alteration

of the BDNF signalling pathway (Aguado *et al.* 2003; Ohba *et al.* 2005; Carmona *et al.* 2006). Although these studies have been extremely informative for the understanding of the BDNF actions, crucial questions remain to be addressed in terms of the physiological pattern of synaptic activity that triggers the release of BDNF, as well as the impact this release may have on network activity and development.

Several studies have shown that neuronal activity contributes to the formation of GABAergic synapses in the developing brain (Benevento *et al.* 1995; Kilman *et al.* 2002; Chattopadhyaya *et al.* 2004). Accordingly, in a previous study we reported that silencing neonatal rat hippocampus *in vitro* delayed the functional maturation of GABAergic synapses onto hippocampal CA3 pyramidal neurons (Colin-Le Brun *et al.* 2004). In the present work, we investigated the effect of synaptic activity recovery on GABAergic synaptic transmission. We show that a transient recovery from activity deprivation leads to a long-lasting potentiation of GABA_A receptor-mediated synaptic transmission (LLP_{GABA-A}) in the developing

rat hippocampus. $\text{LLP}_{\text{GABA-A}}$ induction requires (i) the activation of AMPA receptors and the voltage-dependent L-type calcium channel (VDCC), (ii) a postsynaptic rise in intracellular calcium concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), (iii) the release of endogenous brain derived neurotrophic factor (BDNF), and (iv) the activation postsynaptic tropomyosin-related kinase receptors B (TrkB).

Methods

Slices preparation

Experiments were performed on hippocampal slices obtained from Wistar rats, between postnatal days 1 and 6. All animal experiments have been carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC). Brains were removed from anaesthetized (350 mg kg^{-1} chloral hydrate i.p.) animals and immersed into ice-cold ($2\text{--}4^\circ\text{C}$) artificial cerebrospinal fluid (ACSF) of the following composition (mM): NaCl, 126; KCl, 3.5; CaCl_2 , 2; MgCl_2 , 1.3; NaH_2PO_4 , 1.2; NaHCO_3 , 25; and glucose, 11; pH 7.4, when equilibrated with 95% O_2 and 5% CO_2 . Hippocampal slices ($600 \mu\text{m}$ thick) were cut with a McIlwain tissue chopper and submerged in ACSF supplemented with 1,2,3,4-tetrahydro-6-nitro-2,3-dioxo-benzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide (NBQX; $5 \mu\text{M}$) and D(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (D-AP5; $40 \mu\text{M}$) to reduce network-driven synaptic activity (Ben-Ari *et al.* 1989). Slices were then transferred to a submerged recording chamber and perfused with ACSF (3 ml min^{-1}) containing NBQX ($5 \mu\text{M}$) and D-AP5 ($40 \mu\text{M}$) at 34°C .

Electrophysiological recordings

Whole cell patch-clamp recordings of CA3 pyramidal neurons were performed with an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments, Union City, CA, USA). Micro-electrodes ($4\text{--}8 \text{ M}\Omega$) were filled with the following solution (in mM): CsCl, 110; potassium gluconate, 30; Hepes, 10; EGTA, 1.1; CaCl_2 , 0.1; MgATP, 4; and NaGTP, 0.3. With this solution, GABA_A receptor-mediated responses reversed at 0 mV. In some experiments (Fig. 2), the intracellular solution contained (in mM): caesium gluconate, 120; CsCl, 14; Hepes, 10; EGTA, 1.1; CaCl_2 , 0.1; Na_2GTP , 0.4; and MgATP, 4; pH 7.4. In these ionic conditions, GABA_A currents reversed around -55 mV , while ionotropic glutamatergic currents reversed around $+10 \text{ mV}$. Field potentials were recorded using a DAM80 Amplifier (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) using a $1\text{--}3 \text{ Hz}$ bandpass filter. Spontaneous synaptic activity was monitored and stored with Axoscope 8.1 (Axon Instruments). Series resistance (R_s), membrane capacitance (C_m) and input resistance

(R_i) were determined by an online fitting analysis of the transient currents in response to a 5 mV pulse with Acquis 4.0 software (Bio-logic, Orsay, France). Criteria for accepting a recording included a resting potential $< -55 \text{ mV}$, $R_i > 400 \text{ M}\Omega$ and $R_s < 25 \text{ M}\Omega$.

BDNF immunoassay

To measure the release of BDNF from hippocampal slices, 6 ml fractions of the medium were collected. The fractions were concentrated using the Amicon Ultra concentration devices (Millipore Corp., Ireland), with $200 \mu\text{l}$ final volume. The BDNF sandwich ELISA Kit (Chemicon International, Temecula, CA, USA) was used to quantify the amount of BDNF in the concentrated solutions following the manufacturer's protocol. Experiments and analysis were done blind.

Data acquisition and analysis

The spontaneous GABA_A receptor-mediated synaptic activity was stored on-line on a personal computer and analysed off-line with Mini Analysis 6.0 software (Synaptosoft, Leonia, NJ, USA). The fact that no false events would be identified was confirmed by visual inspection for each experiment. To calculate the amplitude of spontaneous GABA_A receptor-mediated postsynaptic currents (s GABA_A -PSCs), multiple overlapping events were discarded. For each recorded cell, the mean frequency of s GABA_A -PSCs within bins of 30 s was normalized to the mean frequency for the 10 min preceding activity recovery. The effective plasticity was quantified as the mean frequency or amplitude s GABA_A -PSCs between 20 and 30 min after activity recovery, normalized to the mean of the frequency and amplitude for the 10 min preceding activity recovery. When comparing cumulative distribution of s GABA_A -PSCs amplitude and frequency before and after activity recovery for a given cell, the Kolmogorov–Smirnov (K-S test) was used. For average data, statistical analysis was performed using Student's paired *t* test when comparing pre- and post-activity recovery values, and Student's unpaired *t* test when comparing post-giant depolarizing potential (GDP) values from control and treated slices.

Drugs

1,2,3,4-Tetrahydro-6-nitro-2,3-dioxo-benzo[f]quinoxaline-7-sulphonamide (NBQX) and D-2-amino-5-phosphoaleric acid (D-AP-5) were from Tocris Cookson (Bristol, UK); k-252a (Calbiochem, San Diego, CA, USA); Thapsigargin (MP Biological, Solon, OH, USA); Nifedipine (Sigma, St Louis, MO, USA); TrkB-IgG and TrkC-IgG (R&D system, Minneapolis, MN, USA).

Results

Transient recovery from activity-deprivation induces a calcium-dependent long-lasting enhancement of GABAergic synaptic activity

The aim of this study was to investigate the mechanisms underlying activity-dependent plasticity of GABAergic synapses. To this end, hippocampal slices were incubated for 5–8 h in medium containing NBQX (5 μ M) and D-AP5 (40 μ M). We have previously shown that incubation in the presence of the ionotropic glutamatergic receptors delayed the functional maturation of GABAergic synapses (Colin-Le Brun *et al.* 2004). Here, we investigate the effect of a transient recovery from activity deprivation.

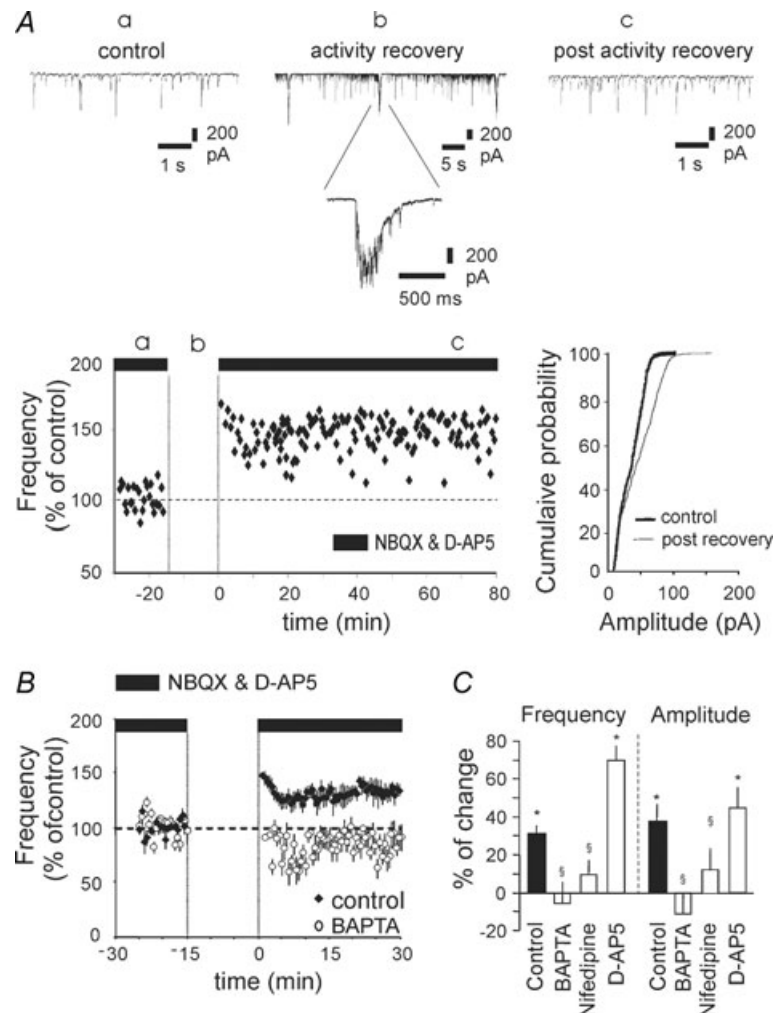
Spontaneous GABA_A receptor-mediated postsynaptic currents (sGABA_A-PSCs) were recorded at a holding potential of -70 mV in the presence of 5 μ M NBQX and 40 μ M D-AP5 (Fig. 1A). After 10 min of stable GABAergic transmission, NBQX and D-AP5 were washed out for 15 min to recover global network activity. Figure 1A illustrates a typical experiment in which activity recovery

resulted in a long-lasting potentiation of GABAergic synaptic transmission (LLP_{GABA-A}), consisting of a persistent increase in both frequency (from 0.56 ± 0.02 Hz to 1.02 ± 0.09 Hz, $P < 0.05$, K-S test, Fig. 1A) and amplitude (from 38 ± 0.7 pA to 57 ± 4.6 pA, $P < 0.05$, K-S test, Fig. 1A) of sGABA_A-PSCs. A summary of 33 similar experiments showed an average $31 \pm 4\%$ (from 5.7 ± 0.9 to 7.3 ± 1.1 Hz) and $36 \pm 7\%$ (from 45 ± 6 to 59 ± 6 pA) increase in sGABA_A-PSC frequency and amplitude 30 min after restoration of synaptic activity ($P < 0.05$ for both, Student's *t* test, Fig. 1B and C). In three experiments, bicuculline (10 μ M) was applied at the end of the experiments. All events were blocked, showing that they were mediated by GABA_A receptor.

A postsynaptic rise in $[Ca^{2+}]_i$ is a common trigger for long-lasting changes in the strength of GABAergic synapses (Gärsars *et al.* 2002). We therefore investigated the contribution of postsynaptic Ca^{2+} in LLP_{GABA-A} induction. Loading the recorded neuron with the calcium chelator BAPTA (10 mM) prevents the induction of LLP_{GABA-A} (from 5.5 ± 1.3 to 4.7 ± 1 Hz and 42 ± 8 to

Figure 1. Synaptic activity recovery induced a Ca^{2+} -dependent long-lasting increase in GABAergic synaptic activity

A, upper, sGABA_A-PSCs (holding potential = -70 mV) before (left, a) and 30 min (right, c) after the activity recovery (middle, b). Middle, a single GDP recorded during activity recovery is shown at an expanded time scale. Lower right, graph showing the average time course of sGABA_A-PSC frequency. In this and following figures the frequency of sGABA_A-PSCs is expressed as a percentage of control pre-recovery value and plotted against time (bin = 30 s). Lower right, cumulative probability plot of sGABA_A-PSC amplitude before (control) and 20 min after activity recovery (post-recovery). B, summary plots showing the mean frequency of sGABA_A-PSCs before and after activity recovery in control (●, $n = 33$) and BAPTA-loaded cells (10 mM, ○, $n = 6$). C, bar plot showing the modification in sGABA_A-PSC frequency and amplitude induced by activity recovery in control (filled bars) and treated cells (open bars) (BAPTA 10 mM, $n = 6$; nifedipine 10 μ M, $n = 12$; D-APV 40 μ M, $n = 7$) (in this and following figures, * $P < 0.05$ when compared to pre-recovery; § $P < 0.05$ when compared to control post-recovery).



36 ± 5 pA, $n = 6$, $P > 0.05$ for both, Student's t test, Fig. 1B and C). We next investigated the possible contribution of VDCCs and NMDA receptors, two major sources of $[Ca^{2+}]_i$ implicated in many forms of GABAergic synaptic plasticity. LLP_{GABA-A} was induced when synaptic activity was recovered in the presence of the NMDA receptor antagonist D-AP5 (from 3.2 ± 1.8 to 5.3 ± 1.6 Hz and 34 ± 5 to 47 ± 6 pA, $n = 7$, $P < 0.05$ for both, Student's t test, Fig. 1C), but not in the presence of nifedipine ($10 \mu M$), an L-type Ca^{2+} channel blocker (from 4.2 ± 0.9 to 4.7 ± 0.9 Hz and 57 ± 12 to 59 ± 8 pA, $n = 12$, $P > 0.05$ for both, Student's t test, Fig. 1C).

Overall, these experiments show that a transient recovery from network activity deprivation induces a persistent enhancement of GABAergic transmission requiring a postsynaptic rise in $[Ca^{2+}]_i$ and the activation of VDCCs.

Recovery of spontaneous glutamatergic synaptic activity is required to induce LLP_{GABA}

In normal ACSF, i.e. during NBQX and D-AP5 washout, synaptic activity consists of three broad classes of events: network-driven patterned activity, termed giant depolarizing potentials (GDPs), sGABA_A-PSCs and spontaneous glutamatergic postsynaptic currents (sGlu-PSCs) (Figs 1A and 2). Recent observations suggested a role of sGDPs in the induction of GABAergic and glutamatergic synaptic potentiation in the developing rat hippocampus (Kasyanov *et al.* 2004; Mohajerani *et al.* 2007). We therefore investigated the possible contribution of sGDPs in LLP_{GABA} induction. To this end, gabazine (GBZ), a specific GABA_A-receptor antagonist, was applied at a low concentration ($0.1 \mu M$) during the washout of NBQX and D-AP5. At this concentration, GBZ prevented the recovery of GDPs in 5 out of 6 slices. In these slices,

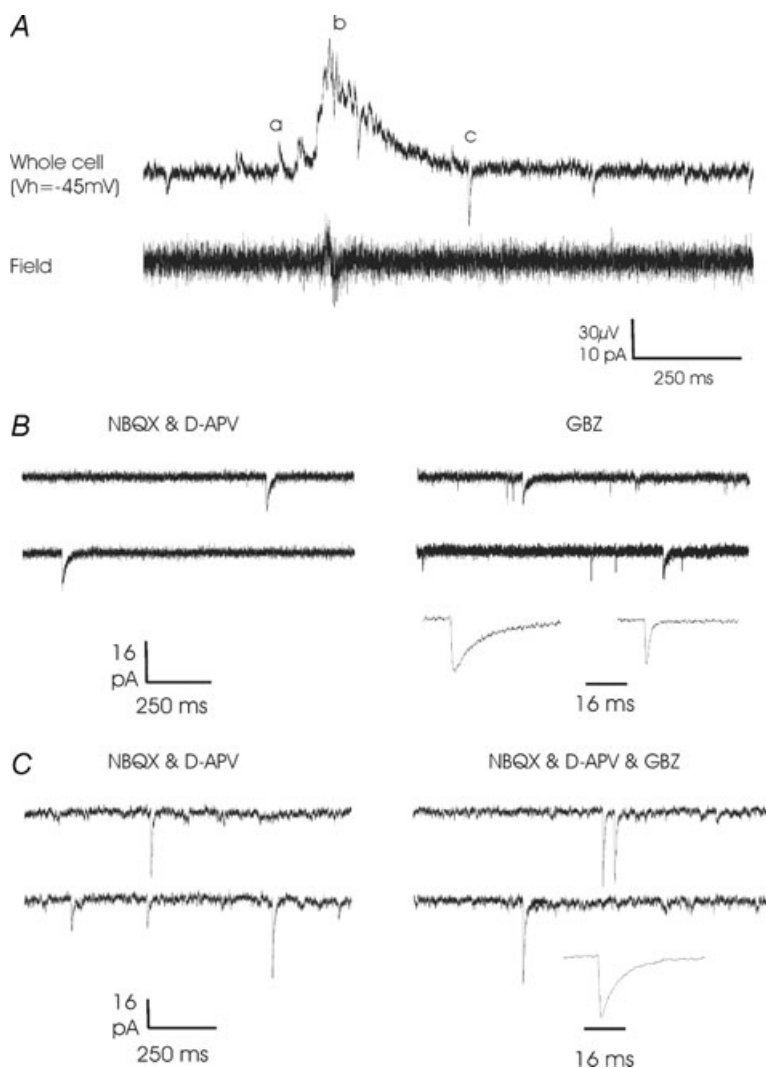


Figure 2. Spontaneous network-driven synaptic activity recovery

A, example of synaptic activity recorded during the washout of NBQX and D-AP5. Simultaneous whole cell (potassium methylsulphate pipette solution, the reversal GABA was set around -55 mV) and field recording in the CA3 rat hippocampal neuron. Spontaneous GABAergic (a, outward current) and glutamatergic (c, inward current) PSCs, as well as GDP (b) are shown. GDP is present in both whole-cell and field recordings. B, example of synaptic activity recorded during the washout of NBQX and D-AP5 in gabazine (GBZ, $0.1 \mu M$) (CsCl pipette solution, the reversal GABA was set around -0 mV). Both fast, likely sGlu-PSCs, and slow, likely sGABA_A-PSCs, events were recorded. Averaged fast and slow synaptic events are shown at an expanded time scale. C, example of synaptic activity recorded in NBQX and D-AP5 and following a further application of gabazine (GBZ, $0.1 \mu M$) (CsCl pipette solution). Only slow sGABA_A-PSCs were recorded. An averaged slow synaptic event is shown at an expanded time scale.

LLP_{GABA} was induced despite the lack of GDP recovery (from 2.7 ± 1.6 to 4.1 ± 2.2 Hz and 39 ± 6 to 54 ± 8 pA, $n=5$, $P < 0.05$ for both, Student's t test, Fig. 3A and D). Similar results were obtained with bicuculline ($10 \mu\text{M}$), which completely blocked the sGABA_A-PSCs (from 3.1 ± 1.3 to 5.2 ± 1.3 Hz and 42 ± 8 to 51 ± 6 pA, $n=5$, $P < 0.05$ for both, Student's t test, Fig. 3B and D). These results therefore show that neither GDPs nor sGABA_A-PSCs are required to trigger LLP_{GABA}, and suggest that sGlu-PSCs play a pivotal role in LLP_{GABA} induction. This conclusion was confirmed by blocking AMPA receptor activation with NBQX ($10 \mu\text{M}$) during activity recovery in control conditions (Fig. 3C) or in the presence of GBZ ($0.1 \mu\text{M}$, Fig. 3D). In these conditions, LLP_{GABA} was not observed (from 5.9 ± 1.5 to 5.6 ± 1.1 Hz and 46 ± 7 to 43 ± 10 pA, $n=6$, $P > 0.05$ for both, Student's t test).

Altogether, these data show that spontaneous glutamatergic synaptic activity is required to trigger LLP_{GABA}.

LLP_{GABA-A} requires endogenous BDNF

In a previous study, we reported that BDNF is required for the induction of Ca^{2+} -dependent GABAergic long-term potentiation in the newborn rat hippocampus (Gubellini *et al.* 2005). We therefore investigated the possible contribution of BDNF in LLP_{GABA-A} induction. k252a (200 nM), a membrane permeant inhibitor of protein tyrosine kinase coupled to Trk receptor family, bath

applied during the entire recording session, prevents the induction of LLP_{GABA-A} (from 4.2 ± 1.1 to 3.9 ± 0.9 Hz and 49 ± 6 to 51 ± 6 pA, $n=13$, $P > 0.05$ for both, Student's t test, Fig. 4A, E). We next investigated the effect of neurotrophin scavengers (Shelton *et al.* 1995), consisting of the extracellular domain of the Trk receptors fused to a human IgG Fc domain (Trk-IgG). In slices preincubated for 5–8 h with TrkB-IgG ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$), to sequester endogenous BDNF, activity recovery failed to induce LLP_{GABA-A} (from 4.1 ± 1.1 to 3.9 ± 0.9 Hz and 43 ± 6 to 45 ± 8 pA, $n=11$, $P > 0.05$ for both, Student's t test, Fig. 4B and E). As control, slices were preincubated with TrkC-IgG, a scavenger of neurotrophin 3 (NT3). In these slices LLP_{GABA-A} was induced (from 4.5 ± 1.2 to 6.5 ± 1.1 Hz and 39 ± 5 to 62 ± 9 pA, $n=11$, $P < 0.05$ for both, Student's t test, Fig. 4B and E). Thus, a release of endogenous TrkB ligands is necessary to trigger LLP_{GABA-A}. LLP_{GABA-A} was also prevented when k252a (200 nM) was included in the patch pipette, showing that a postsynaptic protein tyrosine kinase activity is necessary to trigger LLP_{GABA-A} (from 3.9 ± 0.8 to 4.0 ± 0.9 Hz and 46 ± 6 to 50 ± 5 pA, $n=10$, $P > 0.05$ for both, Student's t test, Fig. 4C and E). Finally, to determine whether neurotrophin signalling is also required to maintain LLP_{GABA-A}, k252a was bath applied 15 min after LLP_{GABA-A} induction (from 1.8 ± 0.9 to 3.2 ± 1.1 Hz and 39 ± 4 to 51 ± 5 pA, $n=4$, $P < 0.05$ for both, Student's t test, Fig. 4D). k252a did not reverse LLP_{GABA-A} (from 3.2 ± 1.3 to 3.1 ± 1.2 Hz and 51 ± 11 to 52 ± 12 pA, $n=4$, $P > 0.05$ for both, Student's t test, Fig. 4D).

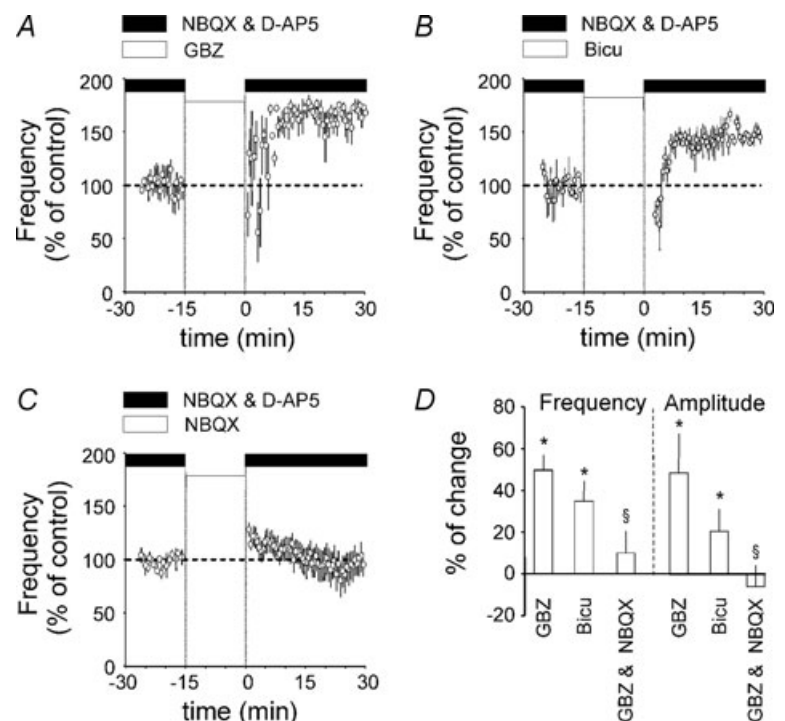


Figure 3. GDPs are not required to trigger LLP_{GABA-A}

A–C, average time course of sGABA_A-PSC frequency before and after activity recovery in the presence of gabazine ($0.1 \mu\text{M}$, $n=5$; A), bicuculline ($10 \mu\text{M}$, $n=5$; B), and NBQX ($10 \mu\text{M}$, $n=10$; C). D, bar plot showing the modification in sGABA_A-PSC frequency and amplitude induced by activity recovery in the different conditions.

Altogether, these data show that the activation of postsynaptic TrkB receptors by endogenous TrkB ligands is required to trigger LLP_{GABA-A}.

Exogenous BDNF induces a Ca²⁺-dependent enhancement of GABAergic activity

We next investigated the relationship between BDNF and Ca²⁺. To determine whether VDCC activation and calcium rise are downstream of TrkB receptors activation, we tested whether activation of these receptors with exogenous BDNF (5 ng ml⁻¹), during the period of activity recovery, bypasses the effect of calcium blockers and rescues LLP_{GABA-A}. As illustrated in Fig. 5A, exogenous

BDNF completely rescued the deficit of LLP_{GABA-A} induced by nifedipine (frequency and amplitude values of sGABA_A-PSCs increased, respectively, by 45 ± 18% (from 2.8 ± 1.1 to 4.4 ± 1.6 Hz) and 39 ± 9% (48 ± 2 to 67 ± 5 pA) 30 min after activity recovery in BDNF, *n* = 5, *P* < 0.05 for both, Student's *t* test), but had no effect on BAPTA loaded cells (frequency and amplitude values of sGABA_A-PSCs changed by 15 ± 7% (from 3.5 ± 0.8 to 4.1 ± 0.9 Hz) and -5 ± 6% (from 54 ± 7 to 48 ± 6 pA) 30 min after activity recovery in BDNF, *n* = 8, *P* > 0.05 for both, Student's *t* test). One possible interpretation of these results is that during the recovery of synaptic activity, the activation of L-type VDCC leads to BDNF secretion, and that once released, BDNF triggers

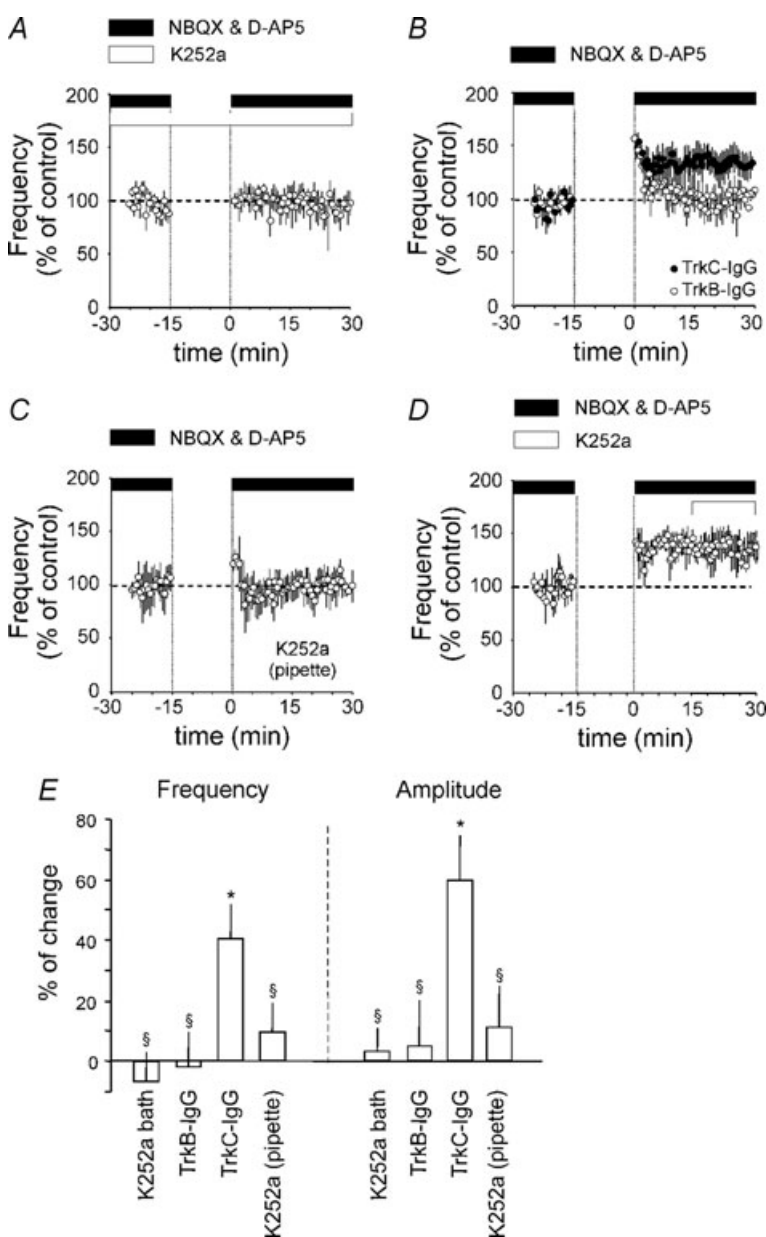
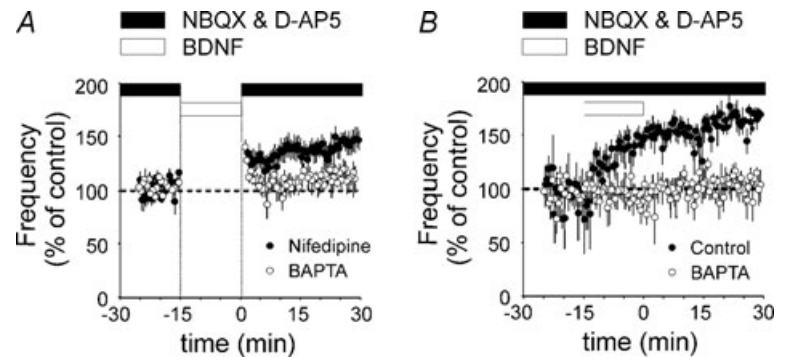


Figure 4. Requirement of postsynaptic BDNF-TrkB signalling activation for LLP_{GABA-A}

A, average time course of sGABA_A-PSC frequency before and after the synaptic activity recovery in the presence k252a (200 nM, *n* = 13). B, average time course of sGABA_A-PSC frequency before and after the activity recovery in TrkB-IgG (5 μg ml⁻¹, ●, *n* = 11) or in TrkB-IgG (5 μg ml⁻¹, ○, *n* = 11) preincubated slices. C, average time course of sGABA_A-PSC frequency before and after the activity recovery in k252a-loaded cells (200 nM, *n* = 10). D, average time course of sGABA_A-PSC frequency before and after the activity recovery. k252a (200 nM, grey bar, *n* = 4) was bath applied 15 min after LLP_{GABA-A} induction. E, bar plot showing the modification in sGABA_A-PSC frequency and amplitude induced by activity recovery in the different conditions.

Figure 5. Requirement of TrkB receptor-mediated postsynaptic $[Ca^{2+}]_i$ rise for LLP_{GABA-A}

A, average time course of sGABA_A-PSC frequency before and after bath applied BDNF during activity recovery in the presence of nifedipine (10 μ M, ●, $n = 5$) and BAPTA-loaded cells (10 mM, ○, $n = 8$). **B**, average time course of sGABA_A-PSC frequency before and after bath applied BDNF in the presence of NBQX (5 μ M) and D-AP5 (40 μ M) in control (●, $n = 5$) and BAPTA-loaded cells (10 mM, ○, $n = 6$).



LLP_{GABA-A} through a Ca^{2+} -dependent, but L-type VDCC independent, postsynaptic signalling cascade. To test this hypothesis we investigate whether BDNF is able to induce LLP_{GABA-A} in the presence of NBQX and D-AP5. As shown in Fig. 5B BDNF (5 ng ml⁻¹) induced a robust and long-lasting increase in both frequency ($52 \pm 10\%$, from 1.7 ± 0.7 to 2.9 ± 1 Hz) and amplitude ($32 \pm 11\%$, from 34 ± 6 to 48 ± 11 pA) of sGABA_A-PSCs that persisted for the duration of the recording session ($n = 5$, $P < 0.05$ for both, Student's t test). We next checked whether BDNF-dependent LLP_{GABA-A} requires postsynaptic Ca^{2+} -dependent signalling cascade by loading the postsynaptic neuron with BAPTA. In this condition the modification of GABAergic synaptic activity induced by BDNF was not observed: frequency and amplitude were, respectively, $-4 \pm 8\%$ (from 2.7 ± 0.9 to 3 ± 1.1 Hz) and $3 \pm 9\%$ (55 ± 6 to 58 ± 9 pA) of control 30 min after BDNF application ($n = 6$, $P > 0.05$ for both, Student's t test, Fig. 5B).

These results suggest that the activation of AMPA receptors trigger a VDCC-dependent secretion of BDNF that, in turn, induces LLP_{GABA-A}. To challenge this hypothesis we determined the amount of BDNF released in the different experimental conditions using an ELISA BDNF immuno-detection assay. Ten hippocampal slices were incubated for 30 min in 30 ml of ACSF supplemented with NBQX and D-AP5. After, incubation, a 6 ml fraction of the medium was collected. The slices were then transferred for 30 min in 30 ml of ACSF alone or supplemented with nifedipine (10 μ M), or GBZ (0.1 μ M), or NBQX (10 μ M), or AP5 (40 μ M), to allow activity recovery. Another 6 ml fraction of the medium was then collected. As illustrated in the Fig. 6, exogenous BDNF level increased upon activity recovery in control ACSF, in the presence of GBZ ($n = 3$, $P < 0.05$, Student's t test) or AP5 ($n = 3$, $P < 0.05$, Student's t test), but not in the presence of nifedipine or NBQX ($n = 3$ for both, $P > 0.05$, Student's t test).

Altogether, these results show that AMPA/KA-PSCs are required to maintain a high level of BDNF secretion through the activation of L-type VDCCs and that a postsynaptic $[Ca^{2+}]_i$ rise downstream of TrkB receptor activation is required to trigger LLP_{GABA-A}.

Discussion

The major finding of this study is that spontaneous AMPA/KA-PSCs trigger a Ca^{2+} -dependent long-lasting potentiation of GABAergic synaptic activity in the newborn rat hippocampus. This potentiation required the release of endogenous BDNF, which plays an instructive role through the activation of postsynaptic TrkB receptors. A Ca^{2+} -dependent long-term increase of GABAergic

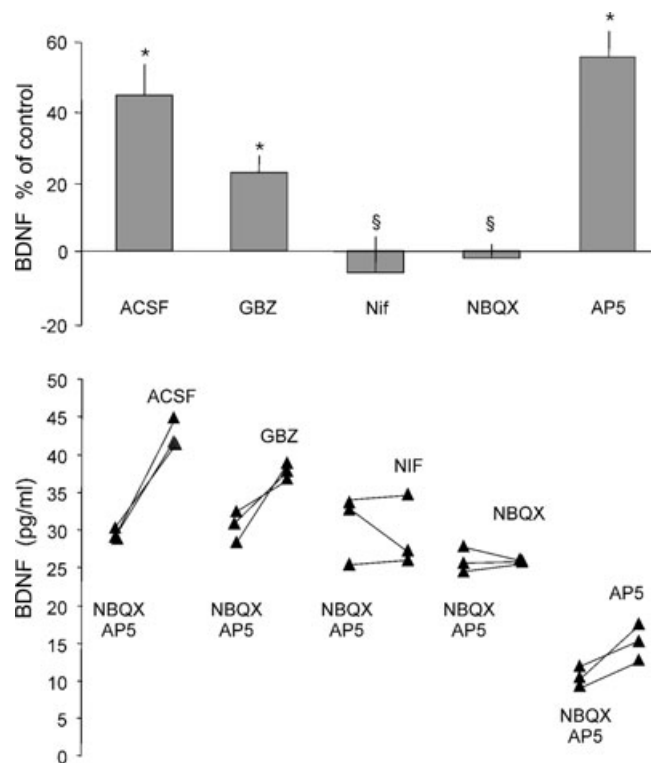


Figure 6. Spontaneous glutamatergic synaptic activity induced BDNF release

Mean percentage changes in the level of native BDNF measured in hippocampal slices during synaptic activity recovery in different conditions. Ten hippocampal slices were incubated for 30 min in NBQX (5 μ M) and D-AP5 (40 μ M) and then transferred in control ACSF (ACSF) or in ACSF containing Nifedipine (Nif, 10 μ M), gabazine (GBZ, 0.1 μ M), NBQX (10 μ M) or AP5 (40 μ M). $n = 3$ for each (* $P < 0.05$ when compared to control (NBQX and D-AP5); § $P < 0.05$ when compared to control recovery in ACSF).

synaptic efficacy can be induced in the developing rat hippocampus following tetanic stimulation of GABAergic fibres (McLean *et al.* 1996), postsynaptic firing of CA3 pyramidal neurons (Caillard *et al.* 1999) or pairing of GDPs with presynaptic stimulation of mossy fibres (Kasyanov *et al.* 2004). The present study shows that ongoing AMPA/KA-PSCs can induce a BDNF- and Ca^{2+} -dependent long-lasting potentiation of GABAergic synaptic transmission ($\text{LLP}_{\text{GABA-A}}$). In the developing rat hippocampus the GABAergic mossy fibres are potentiated by pairing sGDPs with presynaptic stimulation (Kasyanov *et al.* 2004). In the present study, sGDPs were not involved since $\text{LLP}_{\text{GABA-A}}$ was observed in the presence of a low concentration of gabazine, which blocks GDPs but not AMPA/KA-PSCs. Therefore at least two different forms of GABAergic plasticity are produced by spontaneous ongoing activity in the developing hippocampus. The first one relies on the associative activation of mossy fibre and GDPs and might contribute to the fine reorganization of mossy fibre connections. The second one relies on glutamatergic activity and might be important for the development of a correct balance between glutamatergic and GABAergic synaptic transmission in the CA3 circuitry.

Using ELISA BDNF immuno-detection we show that BDNF secretion is up-regulated during the recovery of AMPA/KA-PSCs. Because GABAergic interneurons do not produce neurotrophins themselves (Ernfors *et al.* 1990; Gorba & Wahle, 1999), BDNF is likely to be provided by the CA3 pyramidal neurons (Brigadski *et al.* 2005) or by mossy fibres arising from dentate gyrus granular cells (Danzner & McNamara, 2004). Whether dendritic and/or

axonal release of BDNF (Kohara *et al.* 2001; Brigadski *et al.* 2005; Kuczewski *et al.* 2008) contribute to the induction of $\text{LLP}_{\text{GABA-A}}$ remains to be determined. However, previous studies have reported that dendritic release of BDNF is blocked by the L-type Ca^{2+} channel blocker nifedipine (Kolarow *et al.* 2007) while axonal BDNF release is prevented by N-type Ca^{2+} channel blocker (Balkowiec & Katz, 2002; Wang *et al.* 2002). In the present study, nifedipine prevents $\text{LLP}_{\text{GABA-A}}$ and the increase in BDNF level during activity recovery suggesting a contribution of BDNF dendritic release. Therefore, along with the observation that exogenous BDNF potentiated GABAergic synapses and rescued the inhibitory effect of nifedipine, these results support the notion that BDNF released during AMPA/KA-PSCs acts as a target-derived and instructive messenger for $\text{LLP}_{\text{GABA-A}}$ induction.

A dendritic AMPA- and NMDA-dependent release of BDNF-GFP evoked by presynaptic tetanic stimulation of glutamatergic terminals can be induced in neuronal cultures (Hartmann *et al.* 2001). In agreement with a previous study (Mohajerani *et al.* 2007), we show that during ongoing synaptic activity activation of AMPA/KA receptors, but not NMDA receptors, is required to trigger a BDNF-dependent synaptic plasticity in the developing rat hippocampus. A glutamatergic receptor-independent dendritic release of BDNF can also be triggered by prolonged membrane depolarization of sufficient amplitude (Magby *et al.* 2006; Kuczewski *et al.* 2008). Thus, the stimulation conditions used critically determine the contribution of glutamatergic receptors for BDNF secretion. We previously reported that the depolarization mediated by the activation of ionotropic glutamatergic receptors during ongoing synaptic activity does not directly lead to BDNF secretion in neuronal cultures, but that instead back-propagating action potentials (b-APs) are required (Kuczewski *et al.* 2008). Whether b-APs similarly contribute to dendritic BDNF secretion in hippocampal slices, or whether AMPA/KA receptor mediated depolarization alone is sufficient to trigger VDCC activation and subsequent BDNF secretion remained to be determined.

Exogenous BDNF failed to rescue $\text{LLP}_{\text{GABA-A}}$ in BAPTA-loaded cells. This observation suggests that, in addition to the VDCC-dependent release of BDNF, a postsynaptic Ca^{2+} -dependent signalling cascade downstream to TrkB receptor activation is required to induce $\text{LLP}_{\text{GABA-A}}$. Accordingly, as reported in other studies (Tanaka *et al.* 1997; Cheng & Yeh, 2005a,b), we found that postsynaptic injection of BAPTA also prevents exogenous BDNF-induced $\text{LLP}_{\text{GABA-A}}$. With the observation that postsynaptic injection of k252a prevents $\text{LLP}_{\text{GABA-A}}$, these results support a postsynaptic action of BDNF. This does not, however, exclude the possibility that postsynaptic TrkB receptor activation might trigger the release of a retrograde messenger acting on the

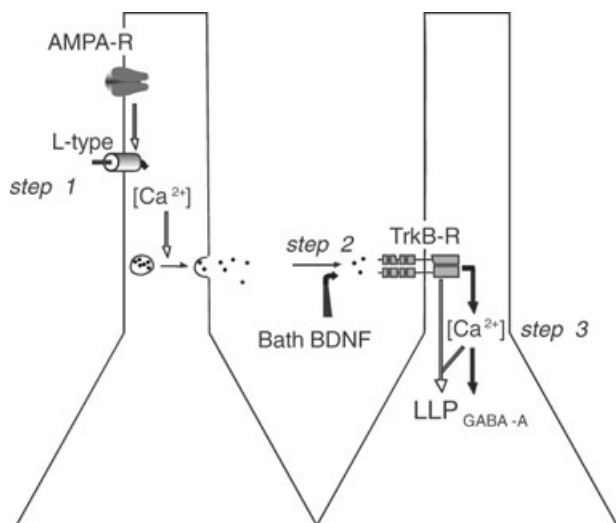


Figure 7. Paracrine action of BDNF triggers $\text{LLP}_{\text{GABA-A}}$

Schematic representation of the steps leading to $\text{LLP}_{\text{GABA-A}}$. Step 1 is prevented by nifedipine and NBQX, step 2 by TrkB-IgG, K252a, and step 3 by postsynaptic injection of BAPTA through the recording electrode. Bath applied BDNF can initiate step 2.

presynaptic site. Thus, a recent study reported that pairing presynaptic Schaffer collaterals with GDPs induced a BDNF-dependent potentiation of hippocampal glutamatergic synapses. Although this potentiation is expressed presynaptically, its induction involved postsynaptic mechanisms including a $[Ca^{2+}]_i$ rise and the phosphorylation of ERK induced by the activation of postsynaptic TrkB receptors (Mohajerani *et al.* 2007).

Based on our present data, the steps leading to LLP_{GABA-A} can be summarized as followed (Fig. 7). CA3 pyramidal cells release BDNF in response to the activation of L-type Ca^{2+} channels during AMPA/KA-PSCs (step 1). Once released, BDNF diffuses to bind on postsynaptic TrkB receptors (step 2), and induces LLP_{GABA-A} through a postsynaptic Ca^{2+} -dependent process (step 3). The relationship between postsynaptic TrkB receptor activation and postsynaptic $[Ca^{2+}]_i$ is presently unknown. Two hypotheses can be put forward: either TrkB receptor activation induces a rise in $[Ca^{2+}]_i$ leading to LLP_{GABA-A} (black arrow) or a basal level of $[Ca^{2+}]_i$ is required to allow TrkB-dependent induction of LLP_{GABA-A} (white arrow). If a $[Ca^{2+}]_i$ rise is required, possible candidates include release of Ca^{2+} from internal stores (Canossa *et al.* 1997; Li *et al.* 1998) or activation of transient receptor potential canonical (TRPC) channels (Li *et al.* 1999), which have been reported to mediate several biological effects induced by BDNF (Jia *et al.* 2007; Amaral *et al.* 2007).

In conclusion, we have shown that BDNF, released during spontaneous AMPA/KA-PSCs, trigger a long-lasting potentiation of GABAergic synaptic transmission in the newborn rat hippocampus. Impairing synaptic activity has been reported to produce structural and functional alterations that can be reverted by application of exogenous BDNF (McAllister *et al.* 1996; Rutherford *et al.* 1997; Marty *et al.* 2000; Seil & Drake-Baumann, 2000). Together with previous data showing that GDPs induce a BDNF-dependent LTP of glutamatergic synapses in the developing hippocampus (Mohajerani *et al.* 2007), these results point to a complex scenario in which synaptic activity and BDNF can modulate all aspects of hippocampal circuit formation.

References

- Aguado F, Carmona MA, Pozas E, Aguilo A, Martinez-Guijarro FJ, Alcantara S, Borrell V, Yuste R, Ibanez CF & Soriano E (2003). BDNF regulates spontaneous correlated activity at early developmental stages by increasing synaptogenesis and expression of K^+/Cl^- co-transport. *Development* **130**, 1287–1280.
- Amaral MD, Chapleau CA & Pozzo-Miller L (2007). Transient receptor potential channels as novel effectors of brain-derived neurotrophic factor signaling: potential implications for Rett syndrome. *Pharmacol Ther* **113**, 394–409.
- Balkowiec A & Katz DM (2002). Cellular mechanisms regulating activity-dependent release of native brain-derived neurotrophic factor from hippocampal neurons. *J Neurosci* **22**, 10399–10407.
- Ben-Ari Y, Cherubini E, Corradetti R & Gaiarsa J-L (1989). Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J Physiol* **416**, 303–325.
- Benevento LA, Bakkum BW & Cohen RS (1995). γ -Aminobutyric acid and somatostatin immunoreactivity in the visual cortex of normal and dark-reared rats. *Brain Res* **689**, 172–182.
- Brigadski T, Hartmann M & Lessmann V (2005). Differential vesicular targeting and time course of synaptic secretion of the mammalian neurotrophins. *J Neurosci* **25**, 7601–7614.
- Caillard O, Ben-Ari Y & Gaiarsa J-L (1999). Long-term potentiation of GABAergic synaptic transmission in neonatal rat hippocampus. *J Physiol* **518**, 109–119.
- Canossa M, Griesbeck O, Berninger B, Campana G, Kolbeck R & Thoenen H (1997). Neurotrophin release by neurotrophins: implications for activity-dependent neuronal plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13279–13286.
- Carmona MA, Pozas E, Martinez A, Espinosa-Parrilla JF, Soriano E & Aguado F (2006). Age-dependent spontaneous hyperexcitability and impairment of GABAergic function in the hippocampus of mice lacking trkB. *Cereb Cortex* **16**, 47–63.
- Chattopadhyaya B, Di Cristo G, Higashiyama H, Knott GW, Kuhlman SJ, Welker E & Huang ZJ (2004). Experience and activity-dependent maturation of perisomatic GABAergic innervation in primary visual cortex during a postnatal critical period. *J Neurosci* **24**, 9598–9611.
- Cheng Q & Yeh HH (2005a). $PLC\gamma$ signaling underlies BDNF potentiation of Purkinje cell responses to GABA. *J Neurosci Res* **79**, 616–627.
- Cheng Q & Yeh HH (2005b). $PLC\gamma$ signaling underlies BDNF potentiation of Purkinje cell responses to GABA. *J Neurosci Res* **79**, 616–627.
- Colin-Le Brun I, Ferrand N, Caillard O, Tosetti P, Ben Ari Y & Gaiarsa JL (2004). Spontaneous synaptic activity is required for the formation of functional GABAergic synapses in the developing rat hippocampus. *J Physiol* **559**, 129–139.
- Danzer SC & McNamara JO (2004). Localization of brain-derived neurotrophic factor to distinct terminals of mossy fiber axons implies regulation of both excitation and feedforward inhibition of CA3 pyramidal cells. *J Neurosci* **24**, 11346–11355.
- Ernfors P, Wetmore C, Olson L & Persson H (1990). Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron* **5**, 511–526.
- 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.
- Gorba T & Wahle P (1999). Expression of TrkB and TrkC but not BDNF mRNA in neurochemically identified interneurons in rat visual cortex in vivo and in organotypic cultures. *Eur J Neurosci* **11**, 1179–1190.
- Gubellini P, Ben Ari Y & Gaiarsa JL (2005). Endogenous neurotrophins are required for the induction of GABAergic long-term potentiation in the neonatal rat hippocampus. *J Neurosci* **25**, 5796–5802.

- Hartmann M, Heumann R & Lessmann V (2001). Synaptic secretion of BDNF after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses. *EMBO J* **20**, 5887–5897.
- Jia Y, Zhou J, Tai Y & Wang Y (2007). TRPC channels promote cerebellar granule neuron survival. *Nat Neurosci* **10**, 559–567.
- Jin X, Hu H, Mathers PH & Agmon A (2003). Brain-derived neurotrophic factor mediates activity-dependent dendritic growth in nonpyramidal neocortical interneurons in developing organotypic cultures. *J Neurosci* **23**, 5662–5673.
- Kasyanov AM, Safiulina VF, Voronin LL & Cherubini E (2004). GABA-mediated giant depolarizing potentials as coincidence detectors for enhancing synaptic efficacy in the developing hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3967–3972.
- Kilman V, van Rossum MCW & Turrigiano GG (2002). Activity deprivation reduces miniature IPSC amplitude by decreasing the number of postsynaptic GABA_A receptors clustered at neocortical synapses. *J Neurosci* **22**, 1328–1337.
- Kohara K, Kitamura A, Morishima M & Tsumoto T (2001). Activity-dependent transfer of brain-derived neurotrophic factor to postsynaptic neurons. *Science* **291**, 2419–2423.
- Kolarow R, Brigadski T & Lessmann V (2007). Postsynaptic secretion of BDNF and NT-3 from hippocampal neurons depends on calcium calmodulin kinase II signaling and proceeds via delayed fusion pore opening. *J Neurosci* **27**, 10350–10364.
- Kuczewski N, Porcher C, Ferrand N, Fiorentino H, Pellegrino C, Kolarow R, Lessmann V, Medina I & Gaiarsa JL (2008). Back propagating action potentials trigger dendritic release of BDNF during spontaneous network activity. *J Neurosci* **28**, 7013–7023.
- Lessmann V, Gottmann K & Malcangio M (2003). Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog Neurobiol* **69**, 341–374.
- Li HS, Xu XZ & Montell C (1999). Activation of a TRPC3-dependent cation current through the neurotrophin BDNF. *Neuron* **24**, 261–273.
- Li YX, Zhang Y, Lester HA, Schuman EM & Davidson N (1998). Enhancement of neurotransmitter release induced by brain-derived neurotrophic factor in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* **18**, 10231–10240.
- MacLean Bolton M, Pittman AJ & Lo DC (2000). Brain-derived neurotrophic factor differentially regulates excitatory and inhibitory synaptic transmission in hippocampal neurons. *J Neurosci* **20**, 3221–3232.
- Magby JP, Bi C, Chen ZY, Lee FS & Plummer MR (2006). Single-cell characterization of retrograde signaling by brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* **26**, 13531–13536.
- Marty S, Berninger B, Carroll P & Thoenen H (1996). GABAergic stimulation regulates the phenotype of hippocampal interneurons through the regulation of brain-derived neurotrophic factor. *Neuron* **16**, 565–570.
- Marty S, Wehrle R & Sotelo C (2000). Neuronal activity and brain-derived neurotrophic factor regulate the density of inhibitory synapses in organotypic slice cultures of postnatal hippocampus. *J Neurosci* **20**, 8087–8095.
- McAllister AK, Katz LC & Lo DC (1996). Neurotrophic regulation of cortical dendritic growth requires activity. *Neuron* **17**, 1057–1064.
- McLean HA, Caillard O, Ben-Ari Y & Gaiarsa J-L (1996). Bidirectional plasticity expressed by GABAergic synapses in the neonatal rat hippocampus. *J Physiol* **496**, 471–477.
- Mohajerani MH, Sivakumaran S, Zacchi P, Aguilera P & Cherubini E (2007). Correlated network activity enhances synaptic efficacy via BDNF and the ERK pathway at immature CA3–CA1 connections in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 13176–13181.
- Ohba S, Ikeda T, Ikegaya Y, Nishiyama N, Matsuki N & Yamada MK (2005). BDNF locally potentiates GABAergic presynaptic machineries: target-selective circuit inhibition. *Cereb Cortex* **15**, 291–298.
- Rutherford LC, DeWan A, Lauer HM & Turrigiano GG (1997). Brain-derived neurotrophic factor mediates the activity-dependent regulation of inhibition in neocortical cultures. *J Neurosci* **17**, 4527–4535.
- Seil FJ & Drake-Baumann R (2000). TrkB receptor ligands promote activity-dependent inhibitory synaptogenesis. *J Neurosci* **20**, 5367–5373.
- Shelton DL, Sutherland J, Gripp J, Camerato T, Armanini MP, Phillips HS, Carroll K, Spencer SD & Levinson AD (1995). Human trks: molecular cloning, tissue distribution, and expression of extracellular domain immunoadhesins. *J Neurosci* **15**, 477–491.
- Tanaka T, Saito H & Matsuki N (1997). Inhibition of GABA_A synaptic responses by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in rat hippocampus. *J Neurosci* **17**, 2959–2966.
- Wang X, Butowt R, Vasko MR & von Bartheld CS (2002). Mechanisms of the release of anterogradely transported neurotrophin-3 from axon terminals. *J Neurosci* **22**, 931–945.
- Zhang LI & Poo MM (2001). Electrical activity and development of neural circuits. *Nat Neurosci* **4**, 1207–1214.

Acknowledgements

This work was supported by INSERM, CNRS and ANR (Agence Nationale pour la Recherche). N.K. was the recipient of a FRM (Fondation pour la Recherche Médicale) fellowship and ANR grant (ANR-06-Neuro-017-01). We wish to thank Drs I. Medina, R. Khazipov and M. Colonnese for helpful comments and critical reading of the manuscript.

Article 2

NMDA-Dependent Switch of proBDNF Actions on Developing GABAergic Synapses

Anais Langlois^{1,2,3}, Diabe Diabira^{1,2,3}, Nadine Ferrand^{1,2,3}, Christophe Porcher^{1,2,3} and Jean-Luc Gaiarsa^{1,2,3}

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 901, Marseille 13009, France, ²Université de la Méditerranée, UMR S901 Aix-Marseille 2, Marseille 13009, France and ³Institut de Neurobiologie de la Méditerranée, Marseille 13009, France.

The authors Christophe Porcher and Jean-Luc Gaiarsa contributed equally to this work

Address correspondence to Jean-Luc Gaiarsa, Institut de Neurobiologie de la Méditerranée, Parc scientifique de Luminy, BP 13, 13273 Marseille Cedex 09, France. Email: gaiarsa@inmed.univ-mrs.fr.

The brain-derived neurotrophic factor (BDNF) has emerged as an important messenger for activity-dependent development of neuronal network. Recent findings have suggested that a significant proportion of BDNF can be secreted as a precursor (proBDNF) and cleaved by extracellular proteases to yield the mature form. While the actions of proBDNF on maturation and plasticity of excitatory synapses have been studied, the effect of the precursor on developing GABAergic synapses remains largely unknown. Here, we show that regulated secretion of proBDNF exerts a bidirectional control of GABAergic synaptic activity with NMDA receptors driving the polarity of the plasticity. When NMDA receptors are activated during ongoing synaptic activity, regulated Ca^{2+} -dependent secretion of proBDNF signals via p75^{NTR} to depress GABAergic synaptic activity, while in the absence of NMDA receptors activation, secreted proBDNF induces a p75^{NTR} -dependent potentiation of GABAergic synaptic activity. These results revealed a new function for proBDNF- p75^{NTR} signaling in synaptic plasticity and a novel mechanism by which synaptic activity can modulate the development of GABAergic synaptic connections.

Keywords: BDNF, GABA, proneurotrophin, p75^{NTR} , synaptic plasticity

Introduction

Appropriate wiring of neuronal networks depends on a tightly regulated sequence of events whereby neurogenesis and synaptogenesis are balanced by apoptosis and axonal pruning. Among the many factors essential in these developmental processes is the brain-derived neurotrophic factor (BDNF). BDNF is an activity-dependent secreted neurotrophin that mediates many aspects of brain development (Lu et al. 2005; Gottmann et al. 2009; Kuczewski et al. 2010). Studies of BDNF outcomes are challenging because of the complex interactions that take place between the different ligands and their receptors. Thus, like many peptide hormones or growth factors, BDNF is synthesized as a precursor (proBDNF) that is either converted intracellularly to mature BDNF (mBDNF) or secreted in an unprocessed form (Lee et al. 2001; Teng et al. 2005; Bergami et al. 2008; Nagappan et al. 2009; Yang, Siao, et al. 2009; but see Matsumoto et al. 2008). ProBDNF and mBDNF are assumed to elicit biological functions that often vary in diverse directions (Lu et al. 2005). For instance, mBDNF signals via the tropomyosin-related kinase receptor B (TrkB-R) to induce cell survival (Teng et al. 2005) or promote long-term potentiation (Korte et al. 1996; Patterson et al. 1996, 2001; Yang, Je, et al. 2009), while proBDNF binds to the p75 pan-neurotrophin receptor (p75^{NTR}) to induce apoptosis (Teng et al. 2005) or facilitate long-term depression (Woo et al. 2005; Rosch et al. 2005; Yang, Je, et al. 2009).

The contribution of mBDNF-TrkB signaling pathway to the development and maturation of GABAergic synapses is well established and documented (Lessmann and Brigadski 2009; Kuczewski et al. 2010). p75^{NTR} and proBDNF expression are developmentally regulated with the highest levels in the first postnatal weeks of life, at a time of synapse formation and elimination (Yang, Siao, et al. 2009; Bartkowska et al. 2010). Whether and how proBDNF- p75^{NTR} signaling affects developing GABAergic synapses is not known. The present study was aimed at determining the effects of proBDNF on developing GABAergic synapses. We show that regulated secretion of proBDNF can lead to either a long-lasting increase or decrease in GABAergic synaptic activity with NMDA receptors driving the switch from potentiation to depression. These results add new insights to the contribution of neurotrophins in activity-dependent refinement of synaptic connections.

Materials and Methods

Slices Preparation

Experiments were performed on hippocampal slices obtained from postnatal day-0 to -5 Wistar rats, as previously described (Kuczewski et al. 2008). All animal experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC). Brains were removed and immersed into ice-cold (2–4 °C) artificial cerebrospinal fluid (ACSF) of the following composition (millimolar): NaCl, 126; KCl, 3.5; CaCl_2 , 2; MgCl_2 , 1.3; NaH_2PO_4 , 1.2; NaHCO_3 , 25; and glucose, 11; pH 7.4, when equilibrated with 95% O_2 and 5% CO_2 . Hippocampal slices (400 μm thick) were cut with a McIlwain tissue chopper and submerged in ACSF supplemented with NBQX (5 μM) and D-AP5 (40 μM) to reduce network-driven synaptic activity. In some experiments, slices were incubated with aprotinin, TrkB-IgG, TrkA-IgG, p75^{NTR} function-blocking antibody, or TAT-pep5 for at least 3 h before recording. Slices were then transferred to a submerged recording chamber and perfused with ACSF (3 mL/min) at 34 °C.

Electrophysiological Recordings

Whole cell patch-clamp recordings of CA3 pyramidal neurons were performed with an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments). Microelectrodes (4–8 M Ω) were filled with the following solution (mM): CsCl (110), K-gluconate (30), *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES) (10); ethylene glycol-bis (β -aminoethyl ether)-*N,N,N',N'*-tetra-acetic acid (EGTA) (1.1), CaCl_2 (0.1), MgATP (4), and NaGTP (0.3). In some experiments, MK801 (1 mM) was added to the pipette solution. Spontaneous synaptic activity was monitored and stored with Axoscope 8.1 (Axon Instruments). Series resistance was monitored in response to a 5 mV pulse during the recordings. Spontaneous GABA_A receptor-mediated postsynaptic currents (sGABA_A-PSCs) were recorded in NBQX and D-AP5. The protocol to induce GABAergic synaptic plasticity consists in the washing out of the glutamatergic antagonist during 15 min (Kuczewski et al. 2008). In some experiments, the extracellular potassium concentration was increased to 5 mM only during the washout period, to increase the secretion of BDNF, which is required for the induction of the

GABAergic plasticity (Kuczewski et al. 2008). Because, activity recovery in 3.5 or 5 mM led to similar results (respectively, $38 \pm 10\%$ ($n = 18$) and $30 \pm 12\%$ ($n = 8$) increase in sGABA_A-PSCs frequency), the data were pooled. On average, the frequency and amplitude of sGABA_A-PSCs increased from 4.5 ± 0.4 to 5.7 ± 0.5 Hz ($P = 0.0001$) and 82 ± 12 to 100 ± 9 pA ($P = 0.002$) ($n = 26$, Fig. 1*A,C*). In some experiments, the identity of the spontaneous PSCs was confirmed by exogenous application of gabazine ($5 \mu\text{M}$) at the end of the recording session. sGABA_A-PSCs and series resistance (Rs) were analyzed off-line with Mini Analysis 6.0 software (Synaptosoft). To generate the average sGABA-PSCs, multiple overlapping events were discarded, and the remaining events were aligned on their rising phase. The effective plasticity was quantified as the mean frequency or amplitude sGABA-PSCs between the 10-min preceding activity recovery and the 20–30 min after activity recovery using the Kolmogorov-Smirnov (K-S test). We used paired Student's *t*-test to evaluate difference between groups.

Immunohistochemistry

Transverse hippocampal cryosections of paraformaldehyde-fixed brain from P4 rats were processed as previously described (Fiorentino et al.

2009), using primary antibodies: chicken anti-proBDNF (1:000, Chemicon MAB351) and rabbit anti-p75NTR (1:500; Abcam 8874). Cy3-conjugated secondary antibodies against chicken and rabbit IgG (1:1000; Chemicon) were used. Hippocampal sections were counterstained using the NeuroTrace green fluorescent Nissl stain (1:1000; Invitrogen). Sections were washed and coverslips mounted using Vectashield (Vector). Immunoreactivity was visualized using laser scanning confocal microscope (Zeiss LSM 510 Meta) with 10× objective.

Phospho-CREB Activation

Immunostaining against the nonphosphorylated and phosphorylated forms of CREB was performed on hippocampal slices, which underwent a procedure similar to that used for the electrophysiological study. Hippocampal slices were transferred to the submerged recording chamber and perfused with NBQX and D-AP5 (3 mL/min, at 34°C) for 10 min. In a first series of experiments, NBQX and D-AP5 were washed out for 15 min in the presence or absence of aprotinin. In another series, mBDNF (10 ng/mL) or CR-proBDNF (10 ng/mL) was applied for 15 min in the presence of NBQX and D-AP5. Control

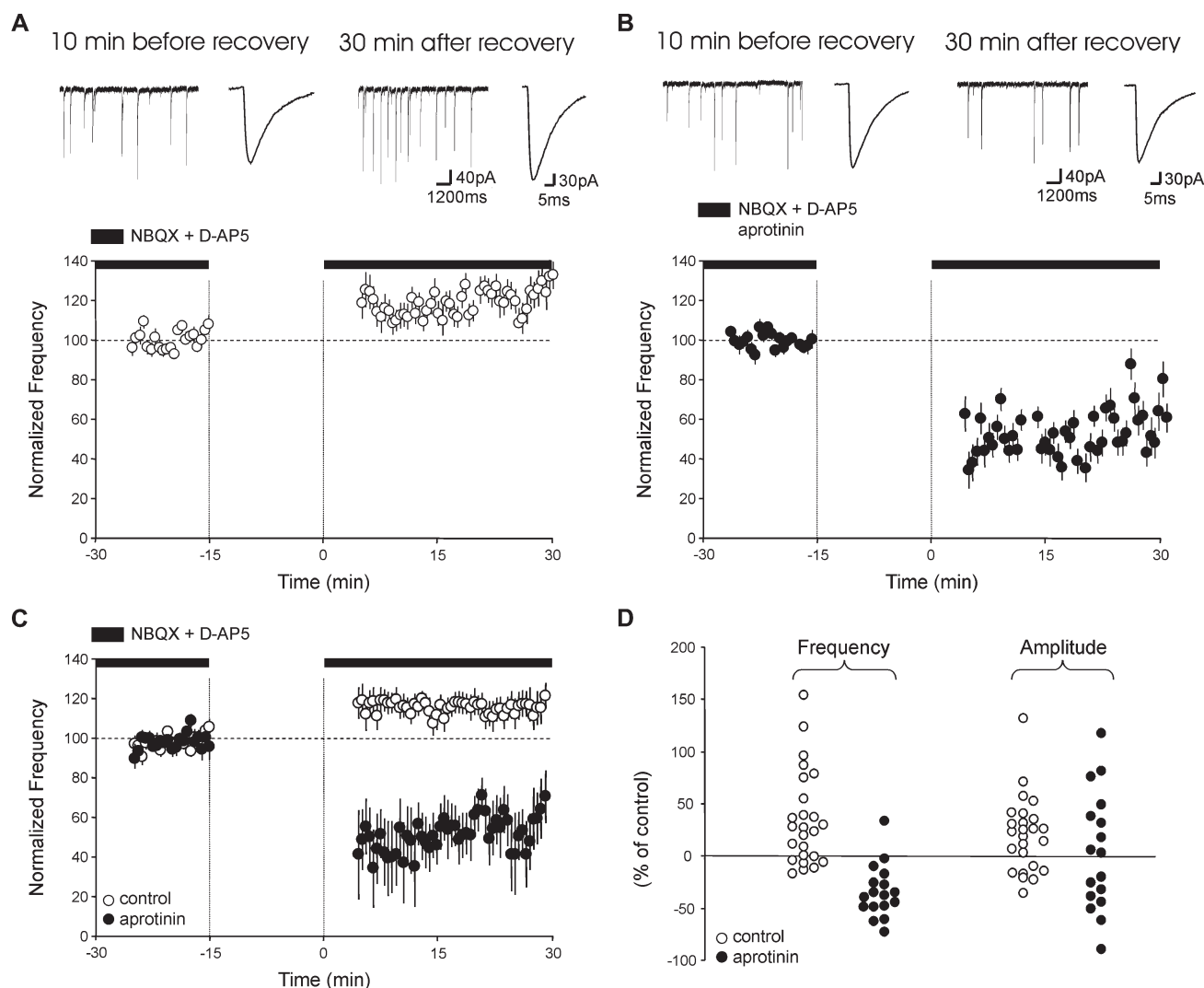


Figure 1. Aprotinin uncovers activity-dependent long-lasting depression in GABAergic synaptic activity. (A) Upper traces: representative recordings of sGABA-PSCs illustrating the increase in events frequency after activity recovery in control ACSF. Average sGABA-PSCs are shown at a higher time scale. The graph illustrates the time course of sGABA-PSCs frequency modification in the same neuron. In this and following figures the frequency of sGABA_A-PSCs is expressed as percentage of control prerecovery value and plotted against time (bin = 30 s). (B) Upper traces: representative recordings illustrating the increase in sGABA-PSCs frequency after activity recovery in ACSF supplemented with aprotinin ($3 \mu\text{g/mL}$). The graph illustrates the time course of sGABA-PSCs frequency modification in the same neuron (bins = 30 s). (C) Average time course of sGABA-PSCs frequency before and after activity recovery in control ACSF (open symbol, $n = 26$) or with aprotinin ($3 \mu\text{g/mL}$, filled symbol, $n = 17$). (D) Percentage of frequency and amplitude changes 30 min after activity recovery in control ACSF (open symbol) or with aprotinin (filled symbol). Each symbol represents the result from one single cell.

experiments consist of slices maintained in NBQX and D-AP5 for 30 min. The slices were fixed overnight in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer immediately after treatment. Cryostat-cut hippocampal sections (30 μ m) were preincubated (1 h) in PBS-TritonX-100 (0.3%-goat serum (3%) and co-incubated overnight at 4 °C with mouse anti-CREB (1:1000) and rabbit anti-phospho-CREB (pCREB, 1:1000) antibodies (Cell Signalling Technology Inc). Immunoreactivity for pCREB and CREB were detected with an Alexa 488-coupled (A488) rabbit secondary antibody (1:500; FluorProbes) and a Cy3-coupled mouse secondary antibody (1:500; Jackson ImmunoResearch Laboratories), respectively. Sections were washed and coverslips mounted using Vectashield (Vector) with the counterstained 4',6'-diamidino-2-phenylindole. Slices were imaged with a LSM 510 (Zeiss) confocal microscope using sequential dual channel recordings of A488 (pCREB) and Cy3 (CREB) fluorescence. The optical sections were digitized (1024 $\times$ 1024 pixels) and processed using Image J software. The pCREB to CREB intensity ratio was expressed as means value ratio of the pCREB-A488 staining intensity versus the CREB-Cy3 staining intensity. Average data are presented as percentage of control slices. We used unpaired Student's *t*-test to evaluate difference between groups.

Elisa BDNF Immunodetection Assay

The BDNF sandwich ELISA Kit (Chemicon International, Temecula, CA, USA) was used to quantify the amount of BDNF in hippocampal slices which underwent a procedure similar to that used for the electrophysiological study. Immediately after the treatment, the slices were weighed, and snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. For extraction of BDNF, 20–30 vol/wt of extraction buffer consisting of 100 mM Tris/HCl, pH 7.0, containing 1 M NaCl, 4 mM EDTA, 2% Triton X-100 and the protease inhibitors 10 μ g/mL aprotinin, 10 μ g/mL leupeptin and 17 μ g/mL phenyl-methylsulfonyl fluoride (PMSF). The homogenates were centrifuged (14,000 $\times$ *g* for 20 s). Supernatants were collected and analyzed with a commercial two-antibody sandwich ELISA (BDNF E_{max} immunoassay system; Chemicon) according to the protocol of the manufacturer. The total protein content of each supernatant was measured with a Bradford protein assay. The BDNF level was expressed as the ratio of BDNF to the total soluble protein concentration. Final values were compared using an unpaired Student's *t*-test.

Relative Quantitative Expression of BDNF Transcripts

The level of BDNF mRNA was quantified using Q-PCR (Roche LC 4PO) in intact hippocampi. Analysis of the hippocampi was done for BDNF paired with GAPDH mRNA as housekeeping gene. Standard curves for each gene were produced using mRNA extracted from hippocampi and diluted more than 300 times, demonstrating the linearity of the response over the range of values studied ($r^2 = 0.998$ for BDNF and $r^2 = 0.999$ for GAPDH). PCR was performed in replicates of 3 and resulting mean C_p values were plotted against standard curves to convert C_p data from the samples into concentrations. The relative concentration of BDNF mRNA was normalized to the concentration of GAPDH mRNA. The results are expressed as means $\pm$ standard error of mean. Final values were compared using an unpaired Student's *t*-test.

Drugs

1,2,3,4-Tetrahydro-6-nitro-2,3-dioxo-benzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide (NBQX), Gabazine, (+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d] cyclohepten-5,10-imine maleate (MK801) and D-2-amino-5-phosphoaleric acid (D-AP5) (Tocris Cookson); k252a, TAT-pep5 (Calbiochem); Nifedipine, aprotinin (Sigma); p75^{NTR} antibody (ab1554, Millipore); cleavage-resistant (CR) proBDNF, mBDNF (Alomone labs); TrkB-IgG, TrkB-IgG (R&D system).

Results

Activity-Recovery Induces Plasticity of GABAergic Synaptic Activity

Spontaneous GABA_A receptor-mediated postsynaptic currents (sGABA_A-PSCs) were recorded from newborn rats CA3

pyramidal neurons in 5 μ M NBQX and 40 μ M D-AP5. After 10 min of stable GABAergic transmission, NBQX and D-AP5 were washed out for 15 min to recover global network activity. As already reported (Kuczewski et al. 2008), a transient activity recovery resulted in a long-lasting potentiation of GABAergic synaptic activity (LLP_{GABA-A}) consisting in a persistent increase in both frequency and amplitude of sGABA_A-PSCs (Fig. 1A). A summary of 26 experiments showed that the frequency and amplitude of sGABA_A-PSCs increased from 4.5 ± 0.4 to 5.7 ± 0.5 Hz ($P = 0.0001$) and 82 ± 12 to 100 ± 9 pA ($P = 0.002$), respectively (Fig. 1C,D). Recordings in the continuous presence of NBQX and D-AP5 showed no significant changes in sGABA_A-PSCs frequency or amplitude (from 3.7 ± 1.6 to 3.9 ± 1.8 Hz and 74 ± 11 to 68 ± 8 pA, $n = 5$, $P = 0.1$, for both). Consistent with our previous study demonstrating the contribution of the mBDNF-TrkB receptor signaling pathway in LLP_{GABA-A} induction (Kuczewski et al. 2008), LLP_{GABA-A} was mimicked by bath applied mBDNF (see below and Fig. 4C) and prevented by k252a (200 nM) added to the patch pipette solution (from 5.1 ± 0.9 to 5.4 ± 0.9 Hz and 90 ± 10 to 97 ± 9 pA, $n = 10$, $P = 0.1$ for both, data not shown).

To determine whether proBDNF is secreted in the developing hippocampus and to investigate its effect on developing GABAergic synapses, we repeated the same protocol in the continuous presence of the cell-impermeable serine protease inhibitor aprotinin (3 μ g/mL), to prevent the extracellular conversion of proBDNF into mBDNF (Teng et al. 2005). In aprotinin, synaptic activity recovery uncovered a long-lasting depression of sGABA_A-PSCs frequency (LLD_{GABA-A}). A typical experiment is illustrated in Figure 1B. A summary of 17 similar experiments showed that sGABA_A-PSCs frequency was decreased by $31 \pm 6\%$ on average after activity-recovery in aprotinin (from 5.6 ± 0.4 to 4.1 ± 0.6 Hz, $P = 0.0002$, Fig. 1C,D). The kinetic properties of sGABA_A-PSCs were not affected (the rise time change from 1.29 ± 0.09 to 1.21 ± 0.07 ($P = 0.2$) and the decay time from 8.6 ± 0.9 to 9.1 ± 0.7 ($P = 0.4$)). The effect on sGABA_A-PSCs amplitude was however more complex. An increase ($n = 6$), a decrease ($n = 7$), or no significant effect ($n = 3$) on sGABA_A-PSCs amplitude were observed (Fig. 1D). On average, a nonsignificant change of $4 \pm 13\%$ in sGABA_A-PSCs amplitude was observed 30 min after activity recovery ($n = 17$, $P = 0.2$). It is worth noting that aprotinin had no effect per se on the frequency and amplitude of sGABA_A-PSCs (from 2.2 ± 0.9 to 2.3 ± 0.9 Hz ($P = 0.4$) and 56 ± 6 to 72 ± 19 pA ($P = 0.1$, $n = 5$), 30 min after aprotinin application). Thus, a transient recovery from activity deprivation with the cell-impermeable serine protease inhibitor aprotinin results in a long-lasting depression of sGABA_A-PSCs frequency (LLD_{GABA-A}).

Activation of p75^{NTR} and Intracellular Ca²⁺ Rise Are Required for LLP_{GABA-A} Induction

We next asked whether p75^{NTR} activation contributes to LLP_{GABA-A} induction. We first performed immunostaining against proBDNF and p75^{NTR}. Both proBDNF and p75^{NTR} were distinguished in the CA1 and CA3 regions of the hippocampus and in the dentate gyrus of the newborn rats (Fig. 2A). The staining was prominent in pyramidal cell bodies and mild short processes extending from the somata to the stratum radiatum. The staining pattern was the same as that obtained by others (Yang, Siao, et al. 2009). To test the contribution of p75^{NTR} in LLP_{GABA-A} induction, hippocampal slices were incubated with

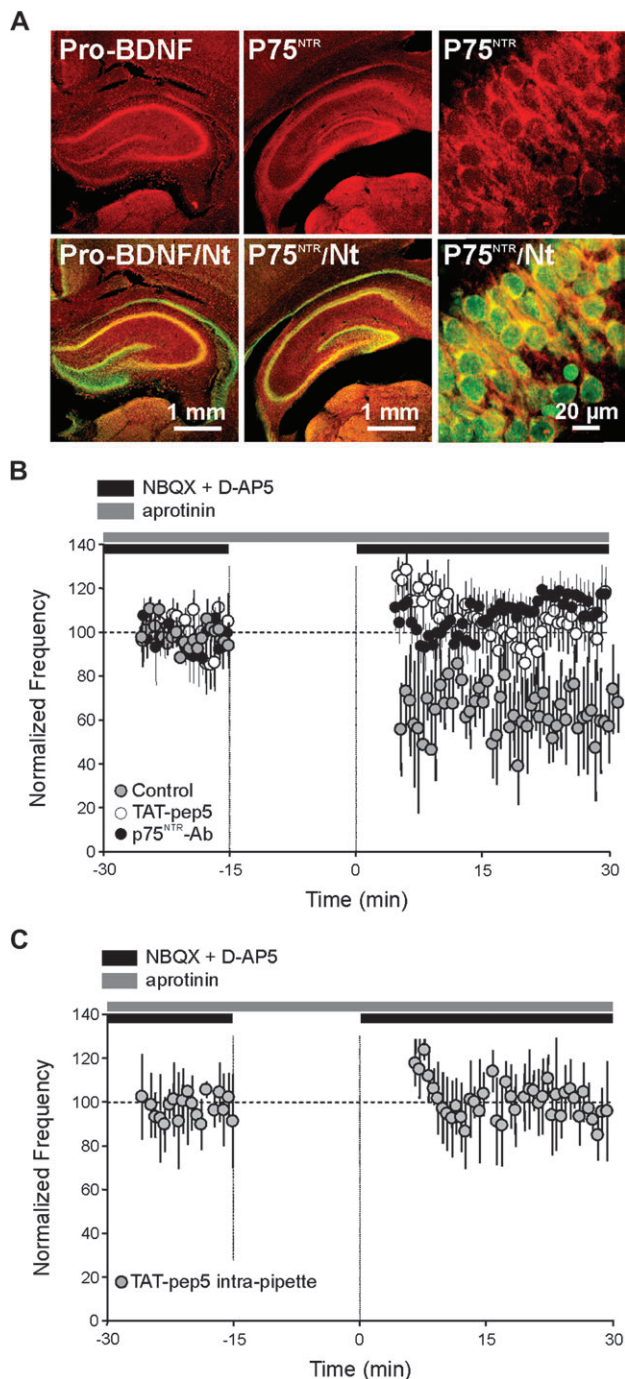


Figure 2. Endogenous activation of p75^{NTR} is required for LLD_{GABA-A} induction. (A) Immunofluorescence detection of proBDNF and p75^{NTR} in a 4-days-old rat hippocampus (red signal, upper images), superimposed on neuro-tracer immunofluorescence (Nt, green signal, lower images). The p75^{NTR} immunofluorescent signal in the CA3 pyramidal layer is shown at a higher magnification (right column). (B) Average time course of sGABA_A-PSCs frequency before and after activity recovery in control (gray symbol, $n = 6$), TAT-pep5 treated slices (open symbol, $n = 9$) and in p75^{NTR} function-blocking antibody treated slices (filled symbol, $n = 7$). (C) Average time course of sGABA_A-PSCs frequency before and after activity recovery in TAT-pep5 loaded neurons ($n = 7$).

a p75^{NTR} function-blocking antibody (1/100) or with TAT-pep5 (2 μ M), a cell-permeable inhibitor of p75^{NTR} signaling (Yamashita and Tohyama 2003). In both cases, activity recovery failed to induce LLD_{GABA-A} (Fig. 2B). The frequency and amplitude of sGABA_A-PSCs changed, respectively, from $3.7 \pm$

0.7 to 4.5 ± 1.2 Hz ($n = 9$, $P = 0.2$) and from 83 ± 8 to 101 ± 17 pA ($n = 9$, $P = 0.06$) in TAT-pep5-treated slices, and from 3.7 ± 0.8 to 4.9 ± 1.1 Hz ($n = 7$, $P = 0.07$) and from 87 ± 7 to 101 ± 14 pA ($n = 7$, $P = 0.1$) in p75^{NTR} function-blocking antibody-treated slices. To determine the location of the p75^{NTR}, TAT-pep5 (2 μ M) was added in the pipette solution. LLD_{GABA-A} was not observed in TAT-pep5 loaded neurons (Fig. 2C, from 2.1 ± 0.7 to 2.5 ± 1 Hz ($n = 7$, $P = 0.12$) and from 75 ± 7 to 90 ± 12 pA ($n = 7$, $P = 0.2$)). Although we cannot completely exclude a diffusion of TAT-pep5 from postsynaptic neuron to pre-synaptic terminals, these observations suggest that the activation of postsynaptic p75^{NTR} is required for LLD_{GABA-A}.

We next challenged this conclusion and tested the hypothesis that regulated secretion of BDNF may contribute to LLD_{GABA-A}. Because, L-type Ca²⁺ channels are required for postsynaptic secretion of BDNF and are instrumental for the induction of BDNF-dependent forms of GABAergic synaptic plasticity (Gubellini et al. 2005; Mohajerani et al. 2007; Kuczewski et al. 2008; Sivakumaran et al. 2009), we investigated the effect of the L-type Ca²⁺ channel blocker nifedipine. Nifedipine (10 μ M) prevented the induction of LLD_{GABA-A} (from 2.1 ± 0.4 to 2.2 ± 0.5 Hz, $P = 0.2$, Fig. 3A; from 69 ± 17 to 87 ± 10 pA, $P = 0.09$, $n = 5$, not shown). To determine whether L-type Ca²⁺ channels activation is responsible for proBDNF secretion, we tested whether the cleavable-resistant form of proBDNF (CR-proBDNF, 10 ng/mL) could bypass the effect of nifedipine. CR-proBDNF applied during activity recovery rescued LLD_{GABA-A} in nifedipine (Fig. 3A, from 4.3 ± 0.9 to 3.4 ± 0.7 Hz, $P = 0.04$; from 90 ± 27 to 110 ± 24 pA, $P = 0.2$, $n = 6$, not shown). The rescue of LLD_{GABA-A} by bath applied CR-proBDNF was not observed in p75^{NTR} function-blocking antibody-treated slices. The frequency and amplitude of sGABA_A-PSCs changed, respectively, from 1.8 ± 0.3 to 2.1 ± 0.4 Hz ($P = 0.3$) and 90 ± 10 to 110 ± 20 pA ($P = 0.2$, $n = 5$, not shown) after the application of CR-proBDNF in p75^{NTR} antibody-treated slices. These results therefore show that a Ca²⁺-dependent secretion of proBDNF is required to trigger p75^{NTR}-LLD_{GABA-A}.

To deepen the relationship between Ca²⁺ and LLD_{GABA-A} induction, the Ca²⁺ chelator BAPTA was added into the pipette solution. LLD_{GABA-A} induction was prevented in BAPTA-loaded neurons (Fig. 3B, from 5.3 ± 0.5 to 5.9 ± 1.2 Hz, $P = 0.2$ and from 79 ± 9 to 82 ± 13 pA, $P = 0.4$, $n = 9$). Although the average change does not reach significance, a long lasting potentiation of sGABA_A-PSCs frequency was observed in 4 of the 9 BAPTA-loaded neurons recorded (from 4.1 ± 1.3 to 7.4 ± 2.9 Hz). This observation suggests that blocking intracellular Ca²⁺-dependent process may uncover a potentiation of GABAergic synaptic activity (see below).

One possible interpretation of this result is that BAPTA prevents the Ca²⁺-dependent secretion of proBDNF leading to LLD_{GABA-A}. Another interpretation is that LLD_{GABA-A} induction requires a Ca²⁺-dependent, but L-type Ca²⁺ channel-independent, postsynaptic signaling cascade. To address this issue, we examine whether bath applied CR-proBDNF could rescue LLD_{GABA-A} in BAPTA-loaded neurons. CR-proBDNF applied during the washout period had no significant effect on the frequency (Fig. 3B, from 4.5 ± 0.7 to 4.6 ± 0.8 Hz, $P = 0.4$, $n = 6$) and amplitude (from 58 ± 8 to 62 ± 8 pA, $P = 0.2$, $n = 6$, not shown) of sGABA_A-PSCs. Thus, in addition to the activation of downstream to p75^{NTR}, a postsynaptic Ca²⁺-dependent signaling cascade is required to induce LLD_{GABA-A}.

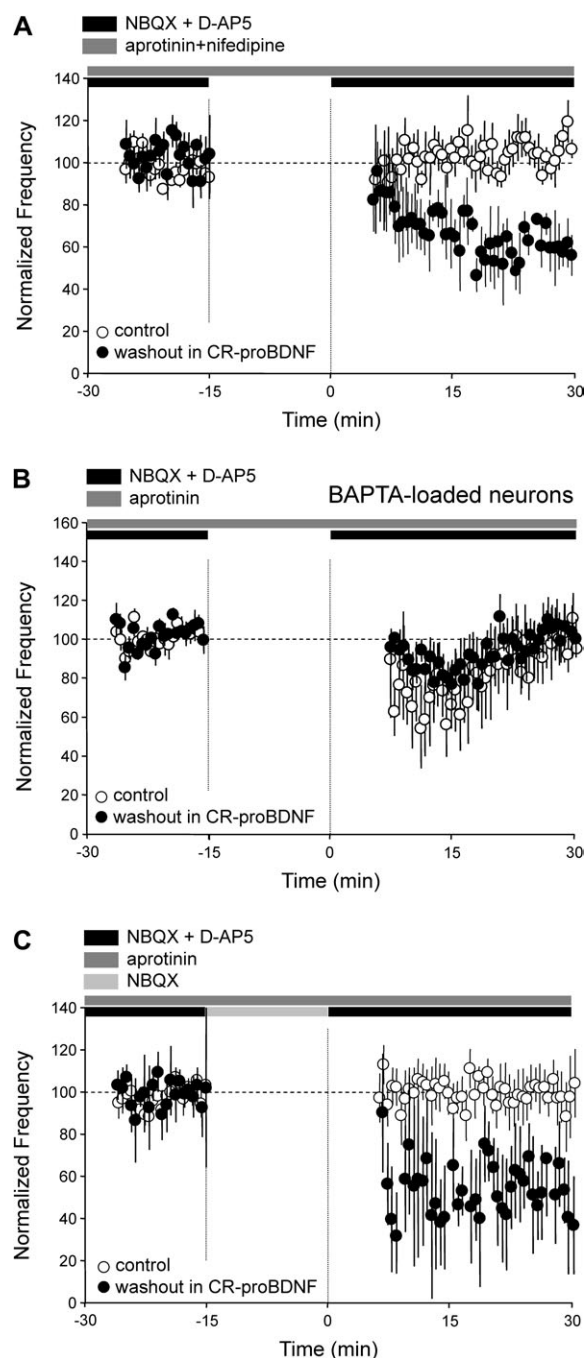


Figure 3. Regulated secretion of proBDNF is required for LLD_{GABA-A} induction. (A) Average time course of sGABA_A-PSCs frequency before and after activity recovery with aprotinin and nifedipine (10 μ M) in the absence (control, open symbol, $n = 6$) or the presence of CR-proBDNF (washout in CR-proBDNF, filled symbol, $n = 6$) during the recovery period. (B) Average time course of sGABA_A-PSCs frequency before and after activity recovery in the absence (control, open symbol, $n = 9$) or the presence of CR-proBDNF (washout in CR-proBDNF, filled symbol, $n = 6$) during the recovery period in BAPTA-loaded neurons. (C) Average time course of sGABA_A-PSCs frequency before and after activity recovery with aprotinin and NBQX (5 μ M) in the absence (control, open symbol, $n = 8$) or the presence of CR-proBDNF (washout in CR-proBDNF, filled symbol, $n = 6$).

In a previous study, we showed that AMPA receptors activation is required to maintain a high level of BDNF secretion through the activation of L-type Ca²⁺ channels during the washout period (Kuczewski et al. 2008). To determine

whether the activation of AMPA receptors is also required for the induction of LLD_{GABA-A}, the AMPA receptor antagonist NBQX was applied during the washout period. LLD_{GABA-A} was not observed in the presence of NBQX (5 μ M) (Fig. 3C, from 3.3 ± 0.5 to 3.7 ± 0.7 Hz, $P = 0.1$, $n = 8$). However, CR-proBDNF (10 ng/mL) applied during activity recovery rescued LLD_{GABA-A} in NBQX (Fig. 3C, from 3.1 ± 0.4 to 2.5 ± 0.5 Hz, $P = 0.007$, from 103 ± 9 to 109 ± 13 pA, $P = 0.3$, $n = 6$).

Overall, these experiments show that a transient recovery from activity deprivation in aprotinin induces a persistent depression of GABAergic synaptic activity by means of a cascade involving the activation of AMPA receptors, the secretion of proBDNF under the control of L-type Ca²⁺ channels and a postsynaptic Ca²⁺-dependent and p75^{NTR}-dependent signaling cascade.

Suppression of the mBDNF-TrkB Signaling Does Not Account for LLD_{GABA-A} Induction

Activation of p75^{NTR} has been reported to cause axonal degeneration (Singh et al. 2008) or cell death (Song et al. 2010), at least in part by suppressing Trk receptor-dependent signaling pathways. Because, LLP_{GABA-A} induction requires the activation of TrkB receptors by endogenous BDNF (Kuczewski et al. 2008), we thought to address whether the mBDNF-TrkB receptor signaling is impaired in the presence of aprotinin. We first investigated whether aprotinin may have affected the production of BDNF using qRT-PCR and ELISA analysis. We found no significant differences in the BDNF mRNA ($n = 4$ intact hippocampi for each condition, $P = 0.3$) and protein levels ($n = 4$ slices for each condition, $P = 0.7$) between control and aprotinin-treated slices (Fig. 4A,B).

We next tested the effect of mBDNF on sGABA_A-PSCs. Bath applied mBDNF (10 ng/mL) induced a persistent enhancement of sGABA_A-PSCs frequency and amplitude in the absence (from 3.4 ± 0.9 to 4.3 ± 1.1 Hz, $P = 0.005$ and from 68 ± 5 to 90 ± 8 pA, $n = 8$, $P = 0.04$) and the presence (from 3.4 ± 1.2 to 4.4 ± 1.5 Hz, 66 ± 9 to 85 ± 8 pA, $n = 7$, $P = 0.04$) of aprotinin (Fig. 4C). We also tested whether exogenous mBDNF (10 ng/mL) could rescue the deficit of LLP_{GABA-A} in aprotinin. In control experiments, sGABA_A-PSCs frequency and amplitude decreased by, respectively, $25 \pm 5\%$ and $10 \pm 12\%$ ($n = 5$), 30 min after activity recovery in aprotinin (Fig. 4D). When, mBDNF was applied during the recovery period in aprotinin, the frequency and amplitude of sGABA_A-PSCs increased by, respectively, $13 \pm 17\%$ and $35 \pm 14\%$ ($n = 6$, Fig. 4D). Thus, mBDNF applied during the recovery period in aprotinin led to a significant enhancement of sGABA_A-PSCs frequency and amplitude when compared with activity recovery in aprotinin alone ($P = 0.001$, unpaired t -test). These results therefore show that the mBDNF-TrkB signaling is not affected by aprotinin.

To confirm this observation, we used the phosphorylated form of the cAMP response element-binding protein (CREB) to monitor TrkB receptor activation by endogenous BDNF (Fiorentino et al. 2009). To normalize the results obtained from different slices, the pCREB to CREB ratio was quantified. Recovery of synaptic activity in control ACSF significantly increased the pCREB/CREB ratio, an effect prevented by TrkB-IgG, but not by TrkA-IgG (Fig. 5). The increase in pCREB/CREB ratio was not observed when activity recovered with aprotinin (Fig. 5). Aprotinin, however, did not abolish the response to exogenous mBDNF (Fig. 5), thus supporting the

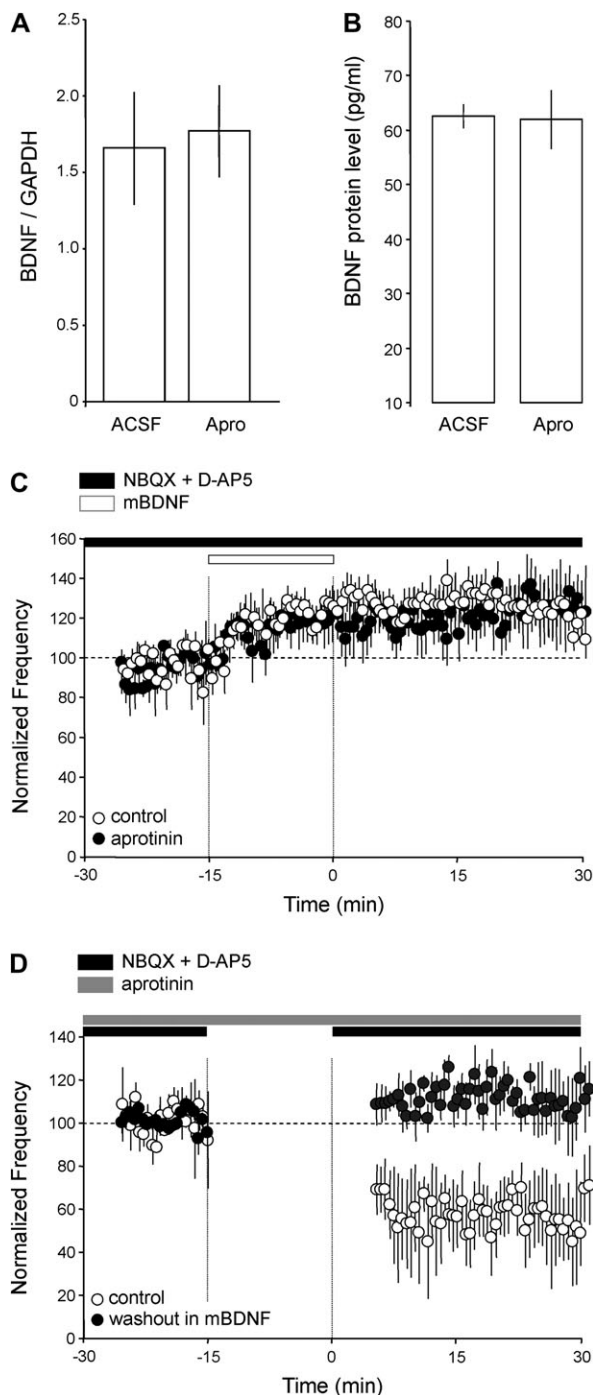


Figure 4. The mBDNF-TrkB receptor signaling is not impaired in the presence of aprotinin. (A,B) Mean native BDNF mRNA (A, 4 intact hippocampi for each condition) and protein (B, 4 slices for each condition) levels in control ACSF or aprotinin-treated tissue. (C) Average time course of the effect of mBDNF (10 ng/mL) on sGABA_A-PSCs frequency in the absence (control, open symbol, $n = 8$) or the presence (aprotinin, filled symbol, $n = 7$) of aprotinin. (D) Average time course of sGABA_A-PSCs frequency before and after activity recovery in aprotinin in the absence (control, open symbol, $n = 5$) or the presence of mBDNF (washout in mBDNF, filled symbol, $n = 6$) during the recovery period.

conclusion that the mBDNF-TrkB signaling is not affected by aprotinin.

Overall, with the observation that the membrane permeable inhibitor of protein tyrosine kinase coupled to Trk receptor

family, k252a, does not uncover LLD_{GABA-A} (Kuczewski et al. 2008), these data show that the activation of p75^{NTR}, but not the inactivation of the mBDNF-TrkB signaling, is required for LLD_{GABA-A} induction in aprotinin.

ProBDNF-p75^{NTR} Signaling Potentiates GABAergic Synaptic Activity in the Absence of NMDA Receptor Activation

Since most forms of synaptic plasticity require the activation of NMDA receptors, we investigated the effect of D-AP5 on LLD_{GABA-A} induction. We found that activity recovery in D-AP5 and aprotinin led to a long-lasting increase in sGABA_A-PSCs frequency and amplitude. The Figure 6A illustrates a typical experiment. A summary of 17 similar experiments showed a significant increase in both frequency (from 2.8 ± 0.9 to 4.3 ± 1.5 Hz, $n = 17$, $P = 0.01$) and amplitude (from 83 ± 10 to 120 ± 21 pA, $n = 17$, $P = 0.02$) of sGABA_A-PSCs (Fig. 6B,C), with no changes in rise time (from 1.32 ± 0.09 to 1.35 ± 0.1 , $P = 0.4$) and decay time (from 8.5 ± 0.4 to 9.2 ± 0.6 , $P = 0.2$). To determine whether postsynaptic NMDA receptors are involved, the NMDA channel blockers MK801 was added into the pipette solution. On average, the frequency and amplitude of sGABA_A-PSCs increased respectively from 4.9 ± 1.2 to 5.4 ± 1.1 Hz ($P = 0.3$) and from 69 ± 18 to 79 ± 20 pA ($P = 0.4$, $n = 9$, data not shown). However, even though the modification was not significant on average, a long lasting potentiation of sGABA_A-PSCs frequency in 5 of the 9 MK801-loaded neurons (from 3.5 ± 1.3 to 5.3 ± 1.6 Hz, $P = 0.01$, $n = 5$). This result shows that the activation of postsynaptic NMDA receptors is required to induce LLD_{GABA-A} and suggests that blockade of these receptors could uncover a long lasting potentiation of GABAergic synaptic activity.

The enhancement of GABAergic activity induced by activity-recovery in the presence of D-AP5 was not observed in slices preincubated with TAT-pep5 (Fig. 6D, from 3.3 ± 0.7 to 3.3 ± 0.8 Hz and 85 ± 11 to 96 ± 16 pA, $n = 7$, $P = 0.1$) or with the p75^{NTR} function-blocking antibody (Fig. 6D, from 2.8 ± 0.6 to 3.1 ± 0.6 Hz, $P = 0.06$ and 85 ± 14 to 87 ± 10 pA, $P = 0.2$, $n = 6$). The induction of GABAergic synaptic potentiation was also prevented by intracellular infusion of TAT-pep5 (2 μ M) (Fig. 6E, from 2.4 ± 0.8 to 2.2 ± 0.6 Hz, $P = 0.3$ and 81 ± 9 to 85 ± 8 pA, $P = 0.2$, $n = 10$). This form of plasticity will be referred to hereafter as p75^{NTR}-LLP_{GABA-A}.

To determine whether regulated secretion of BDNF is required for p75^{NTR}-LLP_{GABA-A} induction, we investigated the effect of the L-type Ca²⁺ channel blocker nifedipine. Nifedipine prevented the induction of p75^{NTR}-LLP_{GABA-A} (Fig. 7A, from 3.1 ± 0.8 to 3.2 ± 0.9 Hz, $P = 0.3$, from 77 ± 14 to 84 ± 14 pA, $P = 0.4$, $n = 7$). Moreover, CR-proBDNF applied during activity recovery in D-AP5 and nifedipine rescued the long-lasting potentiation of sGABA_A-PSCs (Fig. 7A, from 1.9 ± 0.5 to 2.4 ± 0.4 Hz, from 73 ± 5 to 94 ± 9 pA, $P = 0.04$, $n = 8$), an effect prevented by the p75^{NTR} function-blocking antibody (from 2.6 ± 0.1 to 2.3 ± 0.6 Hz, from 94 ± 14 to 115 ± 20 pA, $P = 0.1$, $n = 8$, data not shown). Thus, regulated secretion of proBDNF is required to induce p75^{NTR}-LLP_{GABA-A}. Next, we investigated whether the induction of p75^{NTR}-LLP_{GABA-A} requires a postsynaptic Ca²⁺-dependent signaling cascade by loading the postsynaptic neuron with BAPTA. A long-lasting potentiation of sGABA_A-PSCs frequency (Fig. 7B, from 2.0 ± 0.7 to

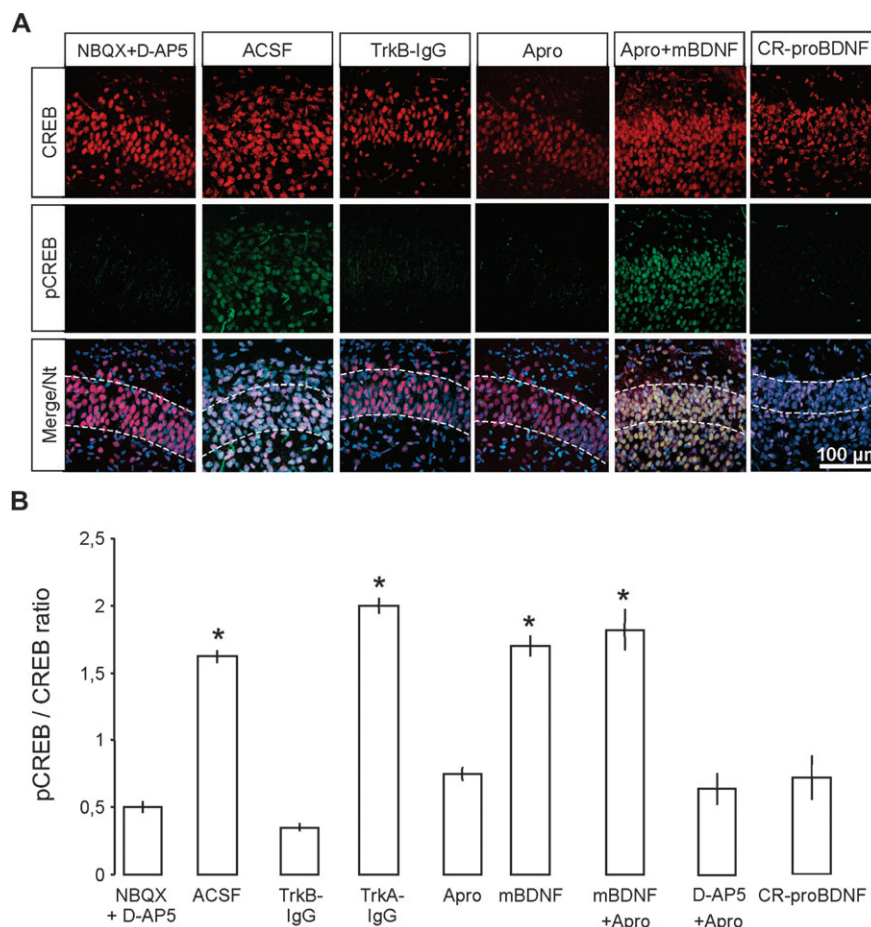


Figure 5. Endogenous BDNF induces phosphorylation of CREB. (A) Immunofluorescence signal of CREB (red, upper panels), phosphorylated CREB (pCREB, green, middle panels) and merged CREB and pCREB signals superimposed on neuro-tracer immunofluorescence (Nt, blue signal, lower panels). White dashed lines delimitate the pyramidal layer. (B) Average ratio pCREB/CREB in the different conditions (3 slices, between 10 and 15 neurons per slices for each condition).

2.5 ± 0.6 Hz, $P = 0.05$, $n = 6$) and amplitude (from 41 ± 4 to 56 ± 7 pA, $P = 0.02$, $n = 6$, data not shown) were however observed in BAPTA-loaded neurons following activity recovery in aprotinin and D-AP5.

As stated above, aprotinin had no effect per se on the frequency and amplitude of sGABA_A-PSCs recorded in the presence of D-AP5 and NBQX (from 2.2 ± 0.9 to 2.3 ± 0.9 Hz, $P = 0.4$ and 56 ± 6 to 72 ± 19 pA, $P = 0.1$, $n = 5$), indicating that p75^{NTR}-LLP_{GABA-A} induction required the activation of AMPA receptors during the recovery of synaptic activity. We therefore asked whether bath applied CR-proBDNF could induce p75^{NTR}-LLP_{GABA-A} in the presence of NBQX and D-AP5. Bath applied CR-proBDNF (10 ng/mL) induced a long-lasting potentiation of GABAergic synaptic activity (Fig. 7C, from 3.1 ± 0.7 to 4.2 ± 0.8 Hz, $P = 0.004$, from 83 ± 13 to 109 ± 81 pA, $P = 0.001$, $n = 14$). We used pCREB to determine whether TrkB-Rs were activated in these conditions and found that neither activity recovery in aprotinin and D-AP5 nor bath applied CR-proBDNF in NBQX and D-AP5 increases the pCREB/CREB ratio (Fig. 5).

Overall, these data show that regulated secretion of proBDNF can signal through p75^{NTR} to either depress or enhance GABAergic synaptic activity (p75^{NTR}-LLD_{GABA-A} and p75^{NTR}-LLP_{GABA-A}), with NMDA receptors driving the polarity of the plasticity.

Discussion

The major conclusion of the present study is that, in the presence of the serine protease inhibitor aprotinin, spontaneous glutamatergic activity can lead to a p75^{NTR}-dependent long-lasting potentiation or depression of GABAergic synaptic activity in the newborn rat hippocampus. Both forms of synaptic plasticity required a Ca²⁺-dependent secretion of proBDNF that plays an instructive role through the activation of postsynaptic p75^{NTR}. The present study also shows that the NMDA receptors drive the switch from potentiation to depression in GABAergic activity (Fig. 8).

ProBDNF-p75 Signaling Induces a Bidirectional Control of GABAergic Synaptic Activity in the Developing Rat Hippocampus

BDNF is synthesized as precursor that undergoes proteolytic cleavage to generate the mature form. Whether proBDNF is secreted has been debated (Matsumoto et al. 2008; Yang, Siao, et al. 2009). In the present study, we provided evidences suggesting that a significant proportion of BDNF is secreted as a precursor in the newborn rat hippocampus and signals via p75^{NTR} to induce a bidirectional control of GABAergic synaptic activity. Thus, we found that activity recovery with the cell-impermeable serine-protease inhibitor aprotinin—which among different protease inhibitors inhibits plasmin activity (Teng et al.

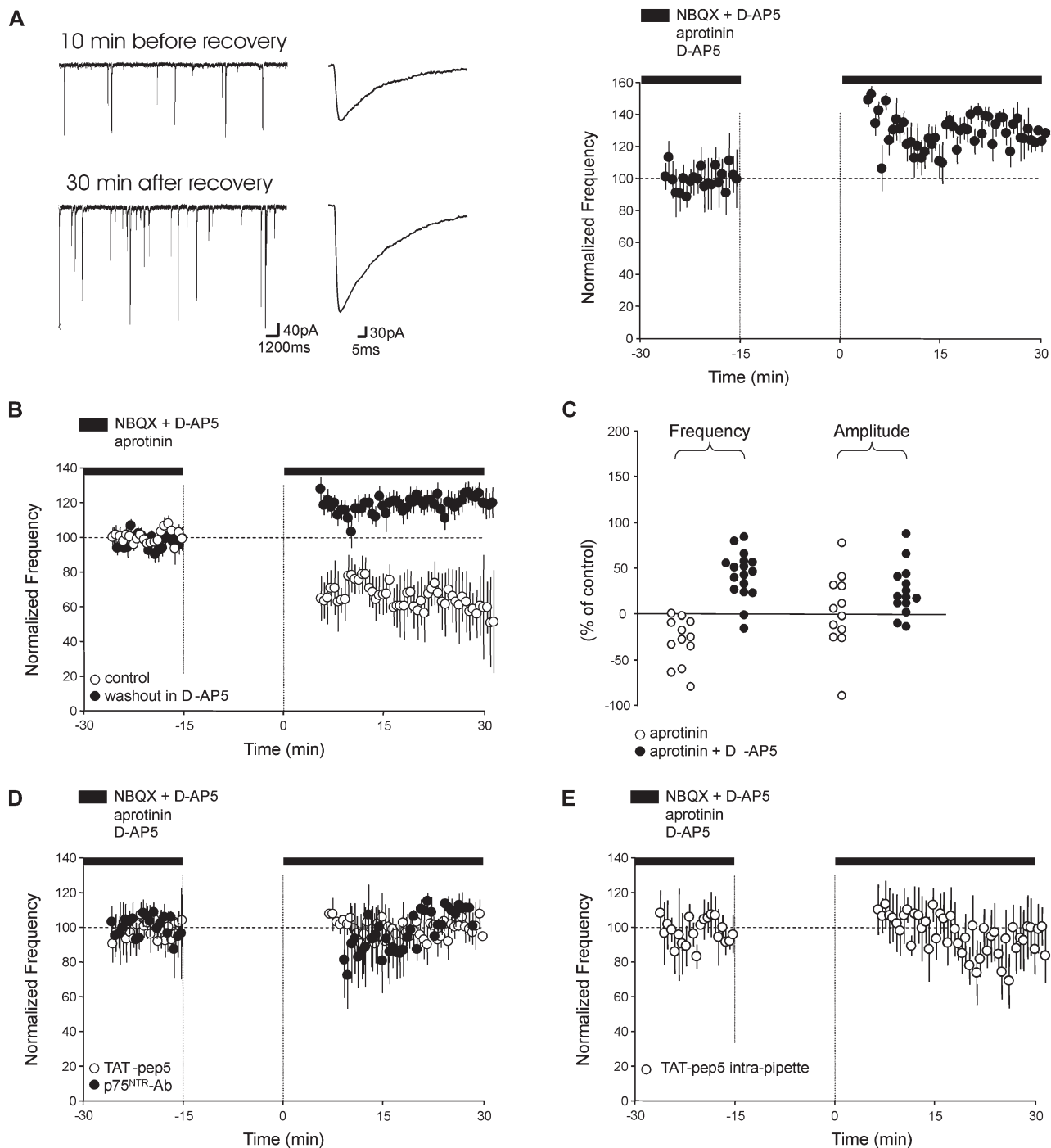


Figure 6. Blockade of NMDA receptors reverse the polarity of GABAergic synaptic plasticity. (A) Right traces show representative recordings illustrating the increase in sGABA-PSCs frequency after activity recovery in aprotinin and D-AP5. Average sGABA-PSCs are shown at a higher time scale. The graph illustrates the time course of sGABA-PSCs frequency modification in the same neuron. (B) Average time course of sGABA_A-PSCs frequency before and after activity recovery in aprotinin (control, open symbol, $n = 6$) or aprotinin and D-AP5 (40 μ M, filled symbol, $n = 17$) during the recovery period. (C) Percentage of frequency and amplitude changes 30 min after activity recovery in aprotinin (open symbol) or aprotinin and D-AP5 (filled symbol). (D) Average time course of sGABA_A-PSCs frequency before and after activity recovery in the presence of aprotinin and D-AP5 in TAT-pep5 (open symbol, $n = 7$) or p75^{NTR} antibody (filled symbol, $n = 6$) treated slices. (E) Average time course of sGABA_A-PSCs frequency before and after activity recovery in TAT-pep5 loaded neurons ($n = 10$).

2005)—can either depress or enhance the level of GABAergic synaptic activity. Both forms of plasticity rely on proBDNF-p75^{NTR} signaling because they were prevented by blockers of the p75^{NTR} signaling and rescued by bath applied CR-proBDNF, under conditions that prevented the regulated postsynaptic secretion of BDNF (i.e., with nifedipine or NBQX; Lessmann

et al. 2003; Kuczewski et al. 2008; Matsuda et al. 2009). Furthermore, the experiments showing that bath applied CR-proBDNF leads to a p75^{NTR}-potentiation or -depression of GABAergic synaptic activity when applied, respectively, in the absence (Fig. 3A,C) or the presence (Fig. 7A,C) of the NMDA receptor antagonist D-AP5, clearly exemplified the

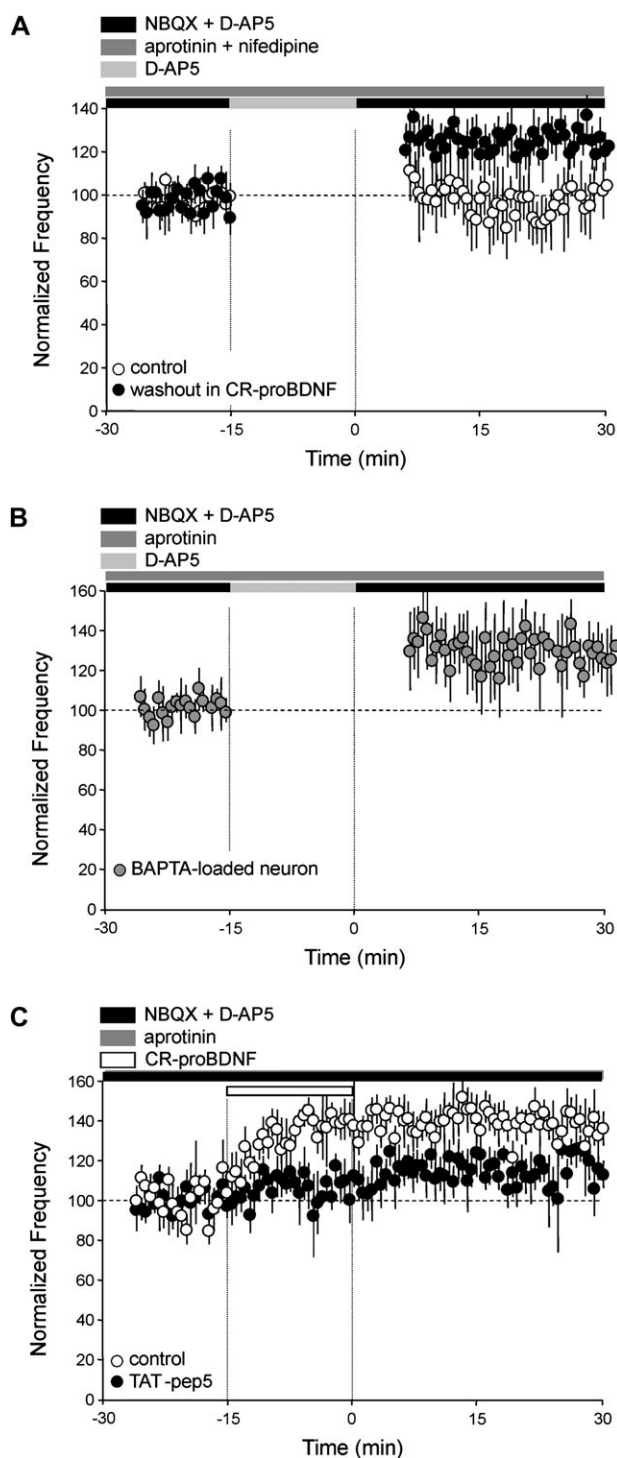


Figure 7. Activity recovery in aprotinin and D-AP5 leads to a 75^{NTR}-dependent enhancement of GABAergic synaptic activity. (A) Average time course of sGABA_A-PSCs frequency before and after activity recovery with aprotinin, D-AP5 and nifedipine in the absence (control, open symbol, $n = 6$) or the presence CR-proBDNF (washout in CR-proBDNF, filled symbol, $n = 8$) during the recovery period. (B) Average time course of sGABA_A-PSCs frequency before and after activity recovery in the presence of aprotinin and D-AP5 in BAPTA-loaded neurons ($n = 6$). (C) Average time course of the effect of CR-proBDNF (10 ng/mL) on sGABA-PSCs frequency.

bidirectional action of proBDNF-p75^{NTR} signaling on GABAergic synaptic activity. Thus, activity-dependent activation of NMDA receptors can switch the action of the proBDNF-p75^{NTR}

pathway on GABAergic synaptic activity from potentiation (p75^{NTR}-LLD_{GABA-A}) to depression (p75^{NTR}-LLD_{GABA-A}).

Regulated Secretion of BDNF Is Required to Induce GABAergic Synaptic Plasticity

BDNF can be secreted from both the axon and dendrite in a regulated (Ca²⁺-dependent) and constitutive (Ca²⁺-independent) manner (Lessmann and Brigadski 2009). Previous studies have reported that dendritic release of BDNF is prevented by L-type Ca²⁺ channel blockers (Kolarow et al. 2007; Matsuda et al. 2009), while axonal BDNF release is prevented by N-type Ca²⁺ channel blockers (Balkowiec and Katz 2002; Wang et al. 2002; Matsuda et al. 2009). In the present study, the L-type Ca²⁺ channel blocker nifedipine prevents the induction of both p75^{NTR}-LLD_{GABA-A} and p75^{NTR}-LLP_{GABA-A}, an effect rescued by exogenous application of CR-proBDNF. Along with the finding that GABAergic interneurons do not produce neurotrophins themselves (Ernfors et al. 1990; Gorba and Wahle 1999), this result suggest that a dendritic secretion of proBDNF from the CA3 pyramidal neurons is required to induce p75^{NTR}-LLD_{GABA-A} and p75^{NTR}-LLP_{GABA-A} (Fig. 8). Even if L-type Ca²⁺ channels are unlikely to be activated in the recorded neuron (the potential was clamped at -70 mV), L-type Ca²⁺ channel located on the neighboring cells are activated during activity recovery and will contribute to the secretion of BDNF leading to GABAergic synaptic plasticity (Kuczewski et al. 2008). We further show that the AMPA receptor antagonist NBQX prevents the induction of both forms of plasticity and that exogenous application of CR-proBDNF rescued the inhibitory effect of NBQX. These observations suggest that the activation of AMPA receptors during activity recovery is required to trigger the secretion of proBDNF and subsequent GABAergic synaptic plasticity. In agreement with this hypothesis, using ELISA BDNF immunodetection, we have previously shown that BDNF secretion is up regulated during the recovery of AMPA receptors mediated synaptic activity in the developing rat hippocampus (Kuczewski et al. 2008). Moreover, a dendritic AMPA receptor-dependent secretion of BDNF-GFP has been observed following presynaptic tetanic stimulation of glutamatergic terminals in neuronal cultures (Hartmann et al. 2001). Overall, these observations support the notion that a regulated dendritic secretion of proBDNF plays an instructive role in the induction of p75^{NTR}-LLD_{GABA-A} and p75^{NTR}-LLP_{GABA-A} in the developing rat hippocampus (Fig. 8).

Receptors Location and Underlying Mechanisms

Pre- and or postsynaptic TrkB receptor activation has been reported to up or down regulate the function of GABA receptors, to increase or decrease the number or activity of GABAergic terminals and to modulate the excitability of GABAergic interneurons (Gottmann et al. 2009). The effects of p75^{NTR} activation on the GABAergic circuitry have been less documented (Gascon et al. 2005; Salama-Cohen et al. 2006; Lin et al. 2007). In the present study, TAT-pep5 added in the recording solution prevents the induction of both p75^{NTR}-LLD_{GABA-A} and p75^{NTR}-LLP_{GABA-A}. Although we cannot completely exclude retrograde diffusion of TAT-pep5 from the postsynaptic neuron to the presynaptic terminals, this result suggests that the p75^{NTR} are located on the CA3 pyramidal neurons. This conclusion is supported by previous studies showing that GABAergic interneurons are not equipped with

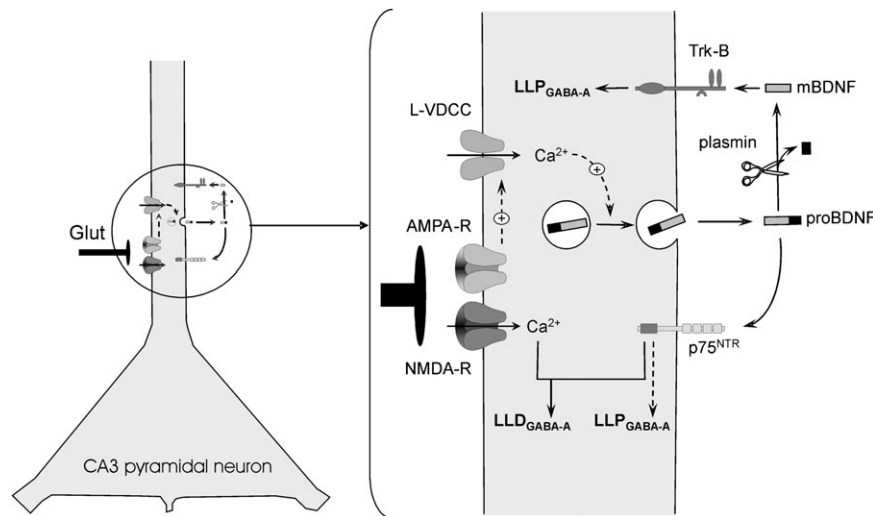


Figure 8. Paracrine actions of proBDNF on GABAergic synaptic activity. Schematic representation of the steps leading to the p75^{NTR}-dependent LLP_{GABA-A} and LLD_{GABA-A}. CA3 pyramidal cells release proBDNF in response to the activation of L-type Ca²⁺ channel during ongoing activation of AMPA receptors. Under control conditions, proBDNF is cleaved by extracellular protease (plasmin) to yield mBDNF leading to TrkB-dependent LLP_{GABA-A} (Kuczewski et al. 2008). When the extracellular protease is inhibited, proBDNF accumulates in the extracellular space, activates postsynaptic p75^{NTR} and leads to NMDA-dependent LLD_{GABA-A} or NMDA-independent LLP_{GABA-A}. It is worth noting that our results do not exclude the possibility that a fraction of mBDNF can be secreted during synaptic activity.

postsynaptic p75^{NTR} in the adult hippocampus (Dougherty and Milner 1999; Holm et al. 2009). We also showed that both activity recovery and exogenous application of CR-proBDNF failed to induce LLD_{GABA-A} in BAPTA-loaded cells. This observation suggests that, in addition to the L type-dependent secretion of proBDNF, a postsynaptic Ca²⁺-dependent signaling is required to induce LLD_{GABA-A}. We can only speculate on 3 possible relationships between postsynaptic p75^{NTR} activation and postsynaptic [Ca²⁺]_i: either p75^{NTR} activation induces a rise in [Ca²⁺]_i leading to LLD_{GABA-A}, or a basal level of [Ca²⁺]_i is required to allow p75^{NTR}-dependent induction of LLD_{GABA-A}, or a concomitant activation of postsynaptic p75^{NTR} and Ca²⁺ influx through NMDA channels triggers LLD_{GABA-A}. Based on the observation that postsynaptic loading of BAPTA and MK801 led to same outcomes on GABAergic synaptic activity, we may suggest that Ca²⁺ entering through postsynaptic NMDA receptors is required for the induction of LLD_{GABA-A} (Fig. 8). Moreover, a potentiation of GABAergic synaptic activity was observed in about 50% of the BAPTA- or MK801-loaded neurons, an effect consistent with the action of D-AP5. This observation may suggest that postsynaptic NMDA receptors and subsequent Ca²⁺ influx through these channels may regulate the direction of the GABAergic plasticity, although we cannot completely exclude the contribution of NMDA receptors located on other sites (either presynaptic or postsynaptic on neighboring pyramidal cells) in this process.

The downstream signaling pathways involved as well as the mechanisms underlying the expression of GABAergic synaptic plasticity are at present still to be determined. Activation of p75^{NTR} has been reported to cause axonal degeneration (Singh et al. 2008) or cell death (Song et al. 2010), at least in part by suppressing Trk receptor-dependent signaling pathways. However the observations that mBDNF, applied during the recovery period, could potentiate GABAergic synaptic activity (Fig. 4D), and phosphorylate CREB (Fig. 5) in aprotinin shows that antagonistic interactions between p75^{NTR} and TrkB-Rs are not required for LLD_{GABA-A} induction. p75^{NTR} form multimeric complexes with different proteins and coreceptors providing

a wide range of biological actions depending on the cellular context (Lu et al. 2005). For instance, both promoting (Brann et al. 1999; Gascon et al. 2005) and inhibiting (Yamashita et al. 2002; Zagrebelsky et al. 2005) effects of p75^{NTR} activation have been reported on neurite outgrowth. The modifications of GABAergic synaptic activity observed in the present study could have resulted from modifications in the firing rate of GABAergic interneurons, in the number of functional synaptic connections, or in the probability of GABA release. To date, p75^{NTR} activation has been reported to enhance the dendritic complexity of cultured GABAergic neurons derived from the subventricular zone (Gascon et al. 2005), to increase the number of GABAergic terminals in hippocampal cultures (Salama-Cohen et al. 2006) and to promote the expression of GABAergic neuronal phenotype in the basal forebrain (Lin et al. 2007). Interestingly, in the former study, p75^{NTR} were not located on GABAergic interneurons but on cholinergic neurons, suggesting a noncell autonomous regulation of GABAergic neuron development (Lin et al. 2007). p75^{NTR} activation has also been reported to result in long-lasting depression of synaptic strength coupled with synapse elimination at the neuromuscular junction (Yang, Je, et al. 2009) and CA1-Schaffer collaterals junction (Egashira et al. 2010). Further studies will be required to determine whether similar phenomenon occurs at the GABAergic terminals in the developing rat hippocampus.

Conclusion

The present study shows that regulated secretion of proBDNF can exert a bidirectional control of GABAergic synaptic activity in the developing hippocampus. The formation of neuronal circuit is dependent upon spontaneous or sensory-driven synaptic activities determining, for instance, which connections are maintained and which are eliminated. Regulated secretion of BDNF contributes to activity-dependent neuronal network wiring. The general thought is that BDNF signals via TrkB receptors to strengthen synaptic connections and

promote network development. Because, the extracellular conversion of proBDNF can be modulated physiological conditions depending on the level and/or pattern of synaptic activity generated by the neuronal network (Nagappan et al. 2009), our results suggest that p75^{NTR} activation may also fine-tune GABAergic connectivity under physiological conditions, underscoring the importance of determining the mBDNF to proBDNF ratio in different in vivo situations.

Funding

The National Institute of Health and Medical Research (INSERM); the National Center for Scientific Research (CNRS); and the National Agency for Research (ANR; grants R0690AS 2066-2010 and R07066AS 2008-2011).

Notes

We wish to thank Drs L. Aniksztejn, C. Rivera, and I. Medina for critical reading of an earlier version of the manuscript. *Conflict of Interest*: None declared.

References

- Balkowiec A, Katz DM. 2002. Cellular mechanisms regulating activity-dependent release of native brain-derived neurotrophic factor from hippocampal neurons. *J Neurosci*. 22:10399-10407.
- Bartkowska KB, Turlejski K, Djavadian RL. 2010. Neurotrophins and their receptors in early development of the mammalian nervous system. *Acta Neurobiol Exp*. 70:454-467.
- Bergami M, Santi S, Formaggio E, Cagnoli C, Verderio C, Blum R, Berninger B, Matteoli M, Canossa M. 2008. Uptake and recycling of pro-BDNF for transmitter-induced secretion by cortical astrocytes. *J Cell Biol*. 183:213-221.
- Brann AB, Scott R, Neuberger Y, Abulafia D, Boldin S, Fainzilber M, Futerman AH. 1999. Ceramide signaling downstream of the p75 neurotrophin receptor mediates the effects of nerve growth factor on outgrowth of cultured hippocampal neurons. *J Neurosci*. 19:8199-8206.
- Dougherty KD, Milner TA. 1999. p75(NTR) immunoreactivity in the rat dentate gyrus is mostly within presynaptic profiles but is also found in some astrocytic and postsynaptic profiles. *J Comp Neurol*. 407:77-91.
- Egashira Y, Tanaka T, Soni P, Sakuragi S, Tominaga-Yoshino K, Ogura A. 2010. Involvement of the p75(NTR) signaling pathway in persistent synaptic suppression coupled with synapse elimination following repeated long-term depression induction. *J Neurosci Res*. 88:3433-3446.
- Ernfors P, Wetmore C, Olson L, Persson H. 1990. Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron*. 5:511-526.
- Fiorentino H, Kuczewski N, Diabira D, Ferrand N, Pangalos MN, Porcher C, Gaiarsa JL. 2009. GABA(B) receptor activation triggers BDNF release and promotes the maturation of GABAergic synapses. *J Neurosci*. 29:11650-11661.
- Gascon E, Vutsits L, Zhang H, Barral-Moran MJ, Kiss PJ, Mas C, Kiss JZ. 2005. Sequential activation of p75 and TrkB is involved in dendritic development of subventricular zone-derived neuronal progenitors in vitro. *Eur J Neurosci*. 21:69-80.
- Gorba T, Wahle P. 1999. Expression of TrkB and TrkC but not BDNF mRNA in neurochemically identified interneurons in rat visual cortex in vivo and in organotypic cultures. *Eur J Neurosci*. 11:1179-1190.
- Gottmann K, Mittmann T, Lessmann V. 2009. BDNF signaling in the formation, maturation and plasticity of glutamatergic and GABAergic synapses. *Exp Brain Res*. 199:203-234.
- Gubellini P, Ben Ari Y, Gaiarsa JL. 2005. Endogenous neurotrophins are required for the induction of GABAergic long-term potentiation in the neonatal rat hippocampus. *J Neurosci*. 25:5796-5802.
- Hartmann M, Heumann R, Lessmann V. 2001. Synaptic secretion of BDNF after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses. *EMBO J*. 20:5887-5897.
- Holm MM, Nieto-Gonzalez JL, Vardya I, Vaegter CB, Nykjaer A, Jensen K. 2009. Mature BDNF, but not proBDNF, reduces excitability of fast-spiking interneurons in mouse dentate gyrus. *J Neurosci*. 29:12412-12418.
- Kolarow R, Brigadski T, Lessmann V. 2007. Postsynaptic secretion of BDNF and NT-3 from hippocampal neurons depends on calcium calmodulin kinase II signaling and proceeds via delayed fusion pore opening. *J Neurosci*. 27:10350-10364.
- Korte M, Staiger V, Griesbeck O, Thoenen H, Bonhoeffer T. 1996. The involvement of brain-derived neurotrophic factor in hippocampal long-term potentiation revealed by gene targeting experiments. *J Physiol Paris*. 90:157-164.
- Kuczewski N, Langlois A, Fiorentino H, Bonnet S, Marissal T, Diabira D, Ferrand N, Porcher C, Gaiarsa JL. 2008. Spontaneous glutamatergic activity induces a BDNF-dependent potentiation of GABAergic synapses in the newborn rat hippocampus. *J Physiol*. 586:5119-5128.
- Kuczewski N, Porcher C, Gaiarsa JL. 2010. Activity-dependent dendritic secretion of brain-derived neurotrophic factor modulates synaptic plasticity. *Eur J Neurosci*. 32:1239-1244.
- Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. 2001. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*. 294:1945-1948.
- Lessmann V, Brigadski T. 2009. Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: an update. *Neurosci Res*. 67:11-22.
- Lessmann V, Gottmann K, Malsangio M. 2003. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog Neurobiol*. 69:341-374.
- Lin PY, Hintereder JM, Rollor SR, Birren SJ. 2007. Non-cell-autonomous regulation of GABAergic neuron development by neurotrophins and the p75 receptor. *J Neurosci*. 27:12787-12796.
- Lu B, Pang PT, Woo NH. 2005. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci*. 6:603-614.
- Matsuda N, Lu H, Fukata Y, Noritake J, Gao H, Mukherjee S, Nemoto T, Fukata M, Poo MM. 2009. Differential activity-dependent secretion of brain-derived neurotrophic factor from axon and dendrite. *J Neurosci*. 29:14185-14198.
- Matsumoto T, Rauskolb S, Polack M, Klose J, Kolbeck R, Korte M, Barde YA. 2008. Biosynthesis and processing of endogenous BDNF: CNS neurons store and secrete BDNF, not pro-BDNF. *Nat Neurosci*. 11:131-133.
- Mohajerani MH, Sivakumaran S, Zacchi P, Aguilera P, Cherubini E. 2007. Correlated network activity enhances synaptic efficacy via BDNF and the ERK pathway at immature CA3 CA1 connections in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:13176-13181.
- Nagappan G, Zaitsev E, Senatorov VV Jr., Yang J, Hempstead BL, Lu B. 2009. Control of extracellular cleavage of ProBDNF by high frequency neuronal activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:1267-1272.
- Patterson SL, Abel T, Deuel TA, Martin KC, Rose JC, Kandel ER. 1996. Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron*. 16:1137-1145.
- Patterson SL, Pittenger C, Morozov A, Martin KC, Scanlin H, Drake C, Kandel ER. 2001. Some forms of cAMP-mediated long-lasting potentiation are associated with release of BDNF and nuclear translocation of phospho-MAP kinase. *Neuron*. 32:123-140.
- Rosch H, Schweigreiter R, Bonhoeffer T, Barde YA, Korte M. 2005. The neurotrophin receptor p75NTR modulates long-term depression and regulates the expression of AMPA receptor subunits in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:7362-7367.
- Salama-Cohen P, Arevalo MA, Grantyn R, Rodriguez-Tebar A. 2006. Notch and NGE/p75NTR control dendrite morphology and the balance of excitatory/inhibitory synaptic input to hippocampal neurones through Neurogenin 3. *J Neurochem*. 97:1269-1278.
- Singh KK, Park KJ, Hong EJ, Kramer BM, Greenberg ME, Kaplan DR, Miller FD. 2008. Developmental axon pruning mediated by BDNF-p75NTR-dependent axon degeneration. *Nat Neurosci*. 11:649-658.
- Sivakumaran S, Mohajerani MH, Cherubini E. 2009. At immature mossy-fiber-CA3 synapses, correlated presynaptic and postsynaptic activity persistently enhances GABA release and network excitability via BDNF and cAMP-dependent PKA. *J Neurosci*. 29:2637-2647.

- Song W, Volosin M, Cragolini AB, Hempstead BL, Friedman WJ. 2010. ProNGF induces PTEN via p75NTR to suppress Trk-mediated survival signaling in brain neurons. *J Neurosci.* 30:15608–15615.
- Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, Kermani P, Torkin R, Chen ZY, Lee FS, et al. 2005. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci.* 25:5455–5463.
- Wang X, Butowt R, Vasko MR, von Bartheld CS. 2002. Mechanisms of the release of anterogradely transported neurotrophin-3 from axon terminals. *J Neurosci.* 22:931–945.
- Woo NH, Teng HK, Siao CJ, Chiaruttini C, Pang PT, Milner TA, Hempstead BL, Lu B. 2005. Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat Neurosci.* 8:1069–1077.
- Yamashita T, Higuchi H, Tohyama M. 2002. The p75 receptor transduces the signal from myelin-associated glycoprotein to Rho. *J Cell Biol.* 157:565–570.
- Yamashita T, Tohyama M. 2003. The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI. *Nat Neurosci.* 6:461–467.
- Yang F, Je HS, Ji Y, Nagappan G, Hempstead B, Lu B. 2009. Pro-BDNF-induced synaptic depression and retraction at developing neuromuscular synapses. *J Cell Biol.* 185:727–741.
- Yang J, Siao CJ, Nagappan G, Marinic T, Jing D, McGrath K, Chen ZY, Mark W, Tessarollo L, Lee FS, et al. 2009. Neuronal release of proBDNF. *Nat Neurosci.* 12:113–115.
- Zagrebelsky M, Holz A, Dechant G, Barde YA, Bonhoeffer T, Korte M. 2005. The p75 neurotrophin receptor negatively modulates dendrite complexity and spine density in hippocampal neurons. *J Neurosci.* 25:9989–9999.

Données non publiées

Introduction

Dans le cerveau en développement, des processus qui n'ont plus cours chez l'adulte permettent la mise en place d'un réseau fonctionnel et mature. Les différentes formes d'activités immatures existant dans plusieurs régions du cerveau en sont un exemple (Feller *et al.* 1999 ; Blankanship *et al.* 2010).

L'objectif de ce travail était de déterminer si les formes de plasticités synaptiques GABAergiques décrites dans les deux études précédentes étaient des processus régulés au cours du développement.

Résultats

Nous avons mis en évidence 3 plasticités GABAergiques différentes : une potentialisation dépendante de l'activation des récepteurs TrkB par le mBDNF (LTP-mBDNF-TrkB), une dépression dépendante de l'activation des récepteurs $p75^{\text{NTR}}$ par le proBDNF et des récepteurs NMDA (LTD-proBDNF- $p75^{\text{NTR}}$), et une potentialisation dépendante de l'activation des récepteurs $p75^{\text{NTR}}$ par le proBDNF (LTP-proBDNF- $p75^{\text{NTR}}$). Nous avons décidé de tester l'efficacité de ces différentes plasticités à différents stades développementaux.

Plasticité mBDNF

Dans un premier temps nous avons répété le protocole capable d'induire la LTP-mBDNF-TrkB à différents stades de développement (figure 1). Nous avons noté que le pourcentage de potentialisation diminue avec l'âge. De façon surprenante, le même protocole a tendance à induire une dépression de l'activité GABAergique dans les tranches issues de rats plus âgés (figure 1).

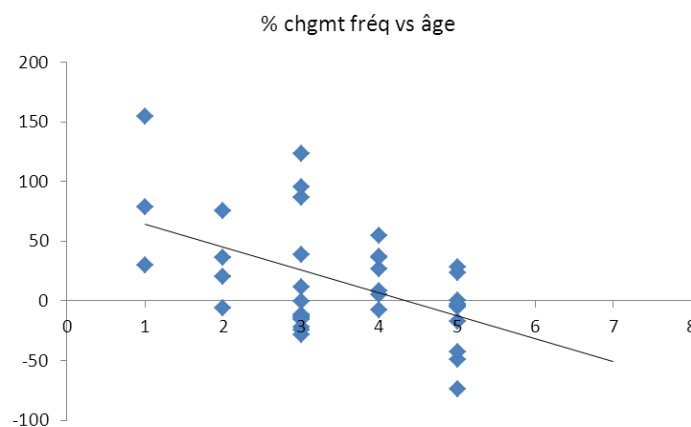


Figure 1. Pourcentage de changement de la fréquence des courants GABAergiques en fonction de l'âge des rats à partir desquels les hippocampes sont prélevés. L'âge est exprimé en nombre de jours postnataux.

Comme l'illustre le graphe de la figure 2, le pourcentage de changement de la fréquence des courants GABAergiques est également corrélé à la fréquence initiale de l'activité GABAergique de la cellule enregistrée (celle-ci est également corrélée à l'âge). Ce graphe montre que la polarité des changements semble s'inverser lorsque la fréquence initiale est supérieure à 10 Hz. Nous avons choisi de diviser en 2 groupes les cellules enregistrées : celles dont la fréquence de base est inférieure à 10 Hz (cellules immatures, groupe 1), et celles dont la fréquence de base est supérieure à 10 Hz (cellules matures, groupe 2).

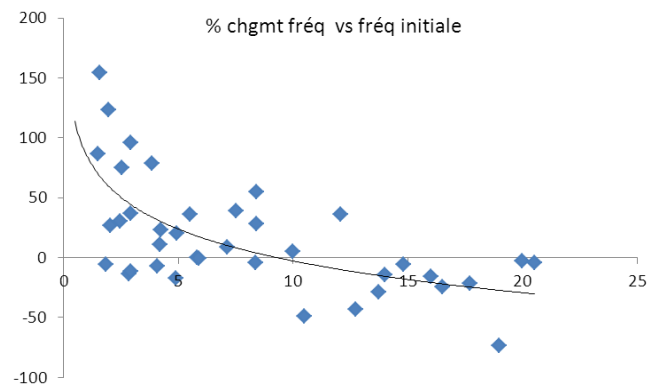
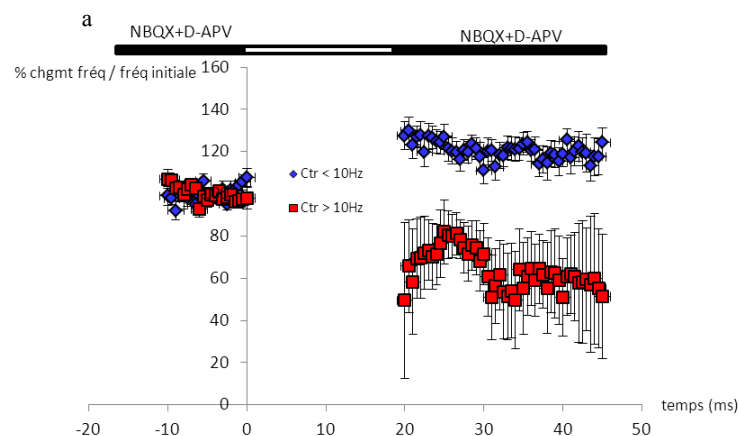


Figure 2. Pourcentage de changement de la fréquence des courants GABAergiques en fonction de la fréquence initiale de ces courants. La fréquence initiale est exprimée en Hz

La moyenne des données obtenues pour les cellules du groupe 1 montre que le retour de l'activité synaptique spontanée totale induit une potentialisation de l'activité GABAergique ($p=0,0001$, $n=26$, figure 3a). Pour le groupe 2, le retour de l'activité synaptique spontanée totale induit une dépression des courants GABAergiques ($p=0,02$, $n=14$, figure 3a). Cette potentialisation et cette dépression sont bloquées en présence de k252a (groupe 1 : $n=9$, figure 3b ; groupe 2 : $n=10$, figure 3c). En revanche, seule la dépression est bloquée en présence de D-APV (groupe 1 : $p=0,009$, $n=9$, figure 4b ; $n=9$, figure 4c).



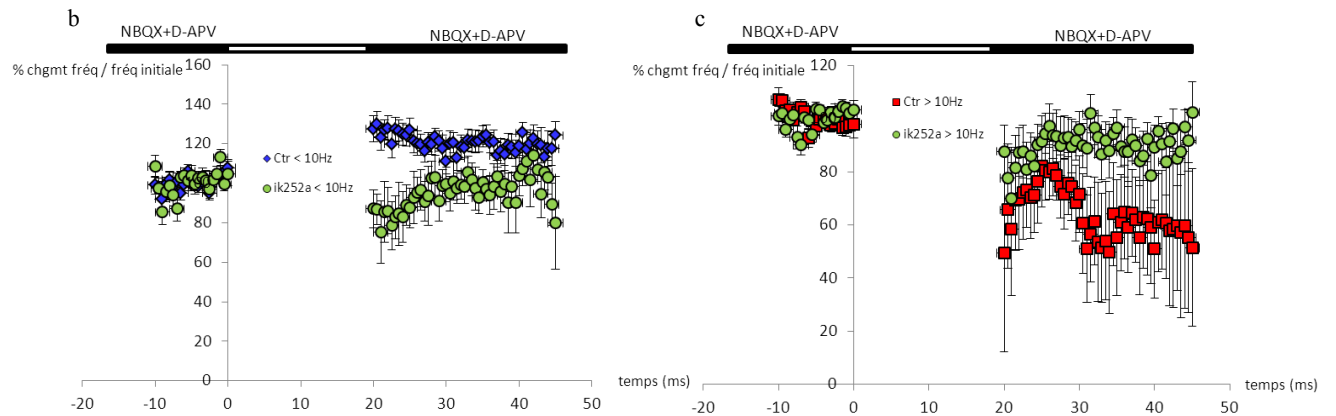


Figure 3. Pour des cellules matures, le retour de l'activité synaptique spontanée totale induit une LTD TrkBRS-dépendante. a) Changement moyen de fréquence des sGABA_A-PSCs après le retour de l'activité synaptique spontanée totale, pour des cellules ayant une fréquence de base des sGABA_A-PSCs <10Hz ou >10Hz. b) Changement moyen de fréquence des sGABA_A-PSCs après le retour de l'activité synaptique spontanée totale, pour des cellules ayant une fréquence de base des sGABA_A-PSCs <10Hz, avec ou sans k252a intracellulaire. c) Changement moyen de fréquence des sGABA_A-PSCs après le retour de l'activité synaptique spontanée totale, pour des cellules ayant une fréquence de base des sGABA_A-PSCs >10Hz, avec ou sans k252a intracellulaire.

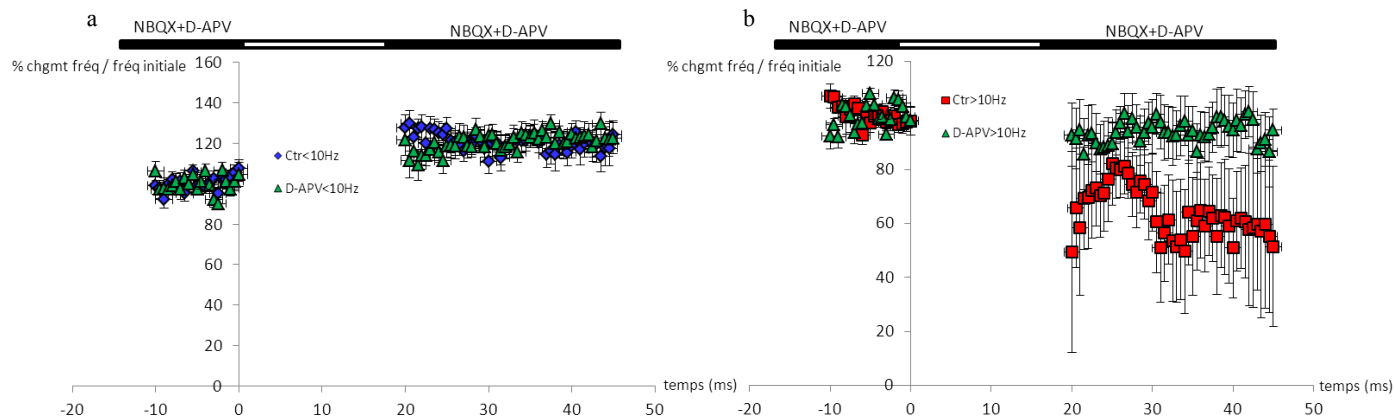


Figure 4. Pour des cellules matures, le retour de l'activité synaptique spontanée totale n'a aucun effet sur les courants GABAergiques en D-APV. a) Changement moyen de fréquence des sGABA_A-PSCs après le retour de l'activité synaptique spontanée totale, pour des cellules ayant une fréquence de base des sGABA_A-PSCs <10Hz, avec ou sans D-APV. b) Changement moyen de fréquence des sGABA_A-PSCs après le retour de l'activité synaptique spontanée totale, pour des cellules ayant une fréquence de base des sGABA_A-PSCs >10Hz, avec ou sans D-APV.

Selon ces résultats, l'application de mBDNF en présence de NBQX et de D-APV, c'est-à-dire en bloquant la libération de BDNF et les NMDARs, devraient conduire à une LTP pour les cellules du groupe 1 mais pas pour les cellules du groupe 2. C'est effectivement ce qu'on observe : pour les cellules du groupe 1, ce protocole induit une potentialisation des sGABA_A-PSCs ($p = 0,01$, $n=7$, figure 5). Pour les cellules du groupe 2, ce protocole n'a pas d'effet sur les sGABA_A-PSCs ($n=4$, figure 5).

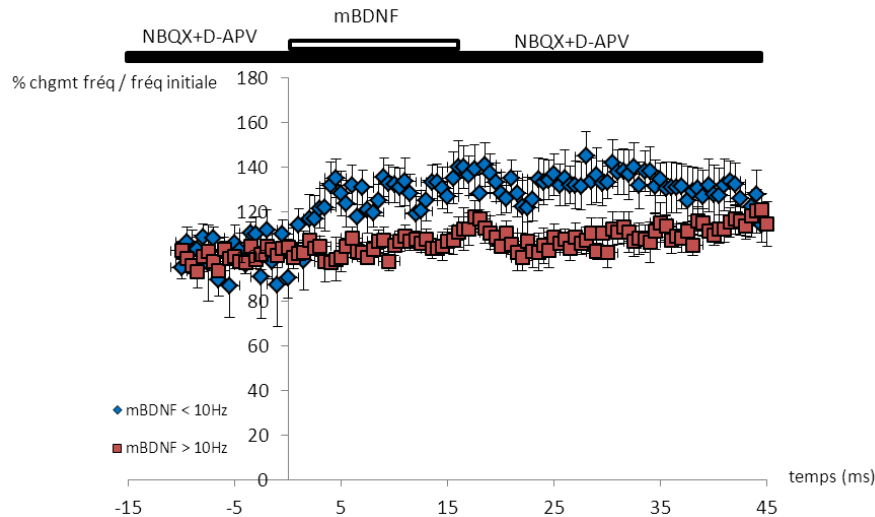
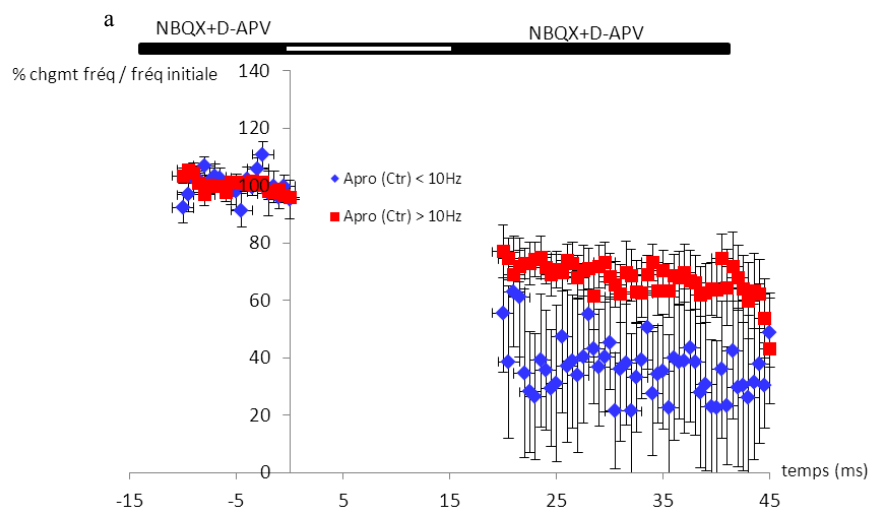


Figure 5. Pour des cellules matures, l'application de mBDNF n'a aucun effet sur les courants GABAergiques. Changement moyen de fréquence des sGABA_A-PSCs après le retour de l'activité synaptique spontanée totale, pour des cellules ayant une fréquence de base des sGABA_A-PSCs <10Hz ou >10Hz.

Le retour de l'activité synaptique spontanée totale induit donc une LTP-mBDNF-TrkB_{RR} NMDA-indépendante sur les cellules du groupe 1 et une LTD-mBDNF-TrkB_{RR} NMDA-dépendante sur les cellules du groupe 2.

Plasticité proBDNF

Nous avons ensuite étudié la LTD-proBDNF-p75^{NTR} à différents stades de développement, et avons également classé les résultats en deux groupes. Pour le groupe 1 (<10Hz) et le groupe 2 (>10Hz), le protocole en aprotinine induit une LTD ($p=0,0002$, $n=17$; $p=0,0003$, $n=19$, respectivement, figure 6a). Cependant, seule la LTD du le groupe 1 est bloquée par le TAT-Pep5 (groupe 1 : $p=0,2$, $n=10$; groupe2 : $p=0,07$, $n=8$, figures 6b et 6c respectivement).



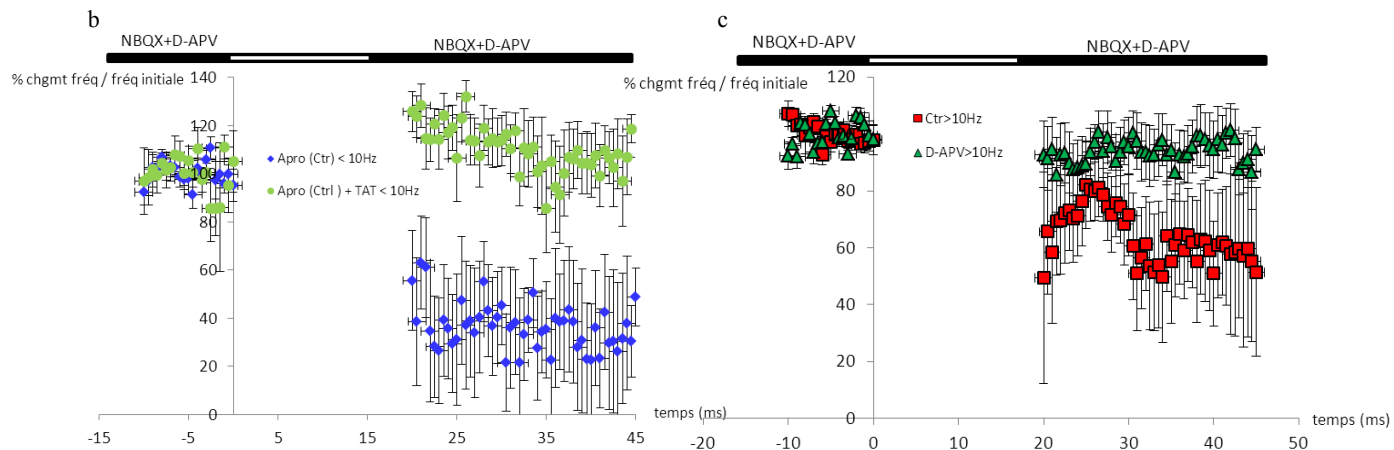
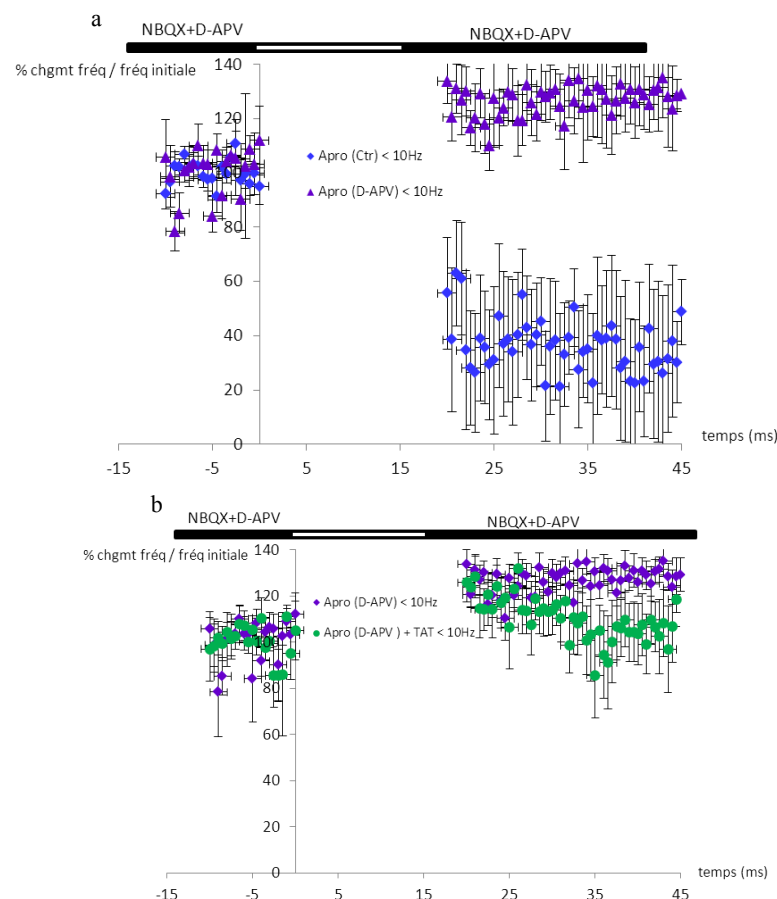


Figure 6. Pour des cellules matures, le retour de l'activité synaptique spontanée totale en aprotinine induit une LTD p75^{NTR}-indépendante. a) Changement moyen de fréquence des sGABA_A-PSCs après le retour de l'activité synaptique spontanée totale en aprotinine, pour des cellules ayant une fréquence de base des sGABA_A-PSCs <10Hz ou >10Hz. b) Changement moyen de fréquence des sGABA_A-PSCs après le retour de l'activité synaptique spontanée totale, pour des cellules ayant une fréquence de base des sGABA_A-PSCs <10Hz, avec ou sans TAT-Pep5. c) Changement moyen de fréquence des sGABA_A-PSCs après le retour de l'activité synaptique spontanée totale, pour des cellules ayant une fréquence de base des sGABA_A-PSCs >10Hz, avec ou sans TAT-Pep5.

Dans les deux groupes, le D-APV bloque la LTD. Dans le groupe 1, le protocole en présence de D-APV révèle une potentialisation ($p=0,0001$, $n=17$, figure 7a). Cette potentialisation est bloquée par TAT-Pep5 ($n=7$, figure 7b). Dans le groupe 2, le protocole en présence de D-APV n'induit aucun changement de l'activité synaptique GABAergique ($n=9$, figure 7c).



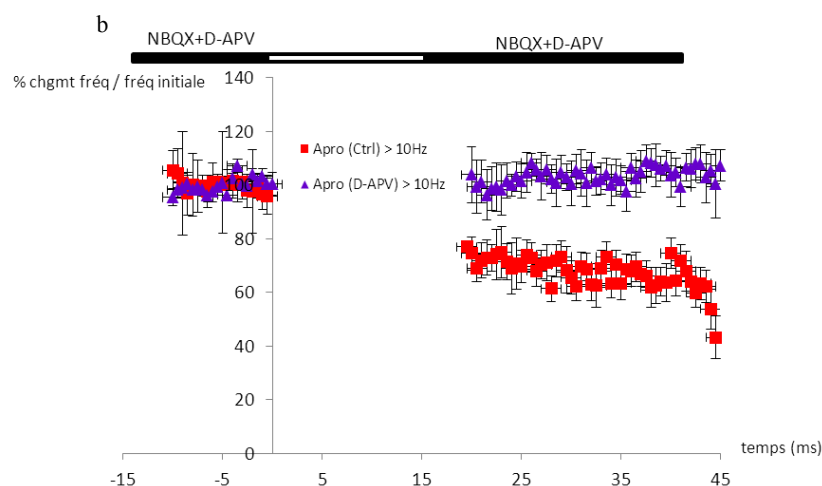


Figure 7. Pour des cellules matures, le retour de l'activité synaptique spontanée totale en aprotinine n'a aucun effet sur les courants GABAergiques en D-APV. a) Changement moyen de fréquence des sGABA_A-PSCs après le retour de l'activité synaptique spontanée totale en aprotinine, pour des cellules ayant une fréquence de base des sGABA_A-PSCs >10Hz, avec ou sans D-APV. b) Changement moyen de fréquence des sGABA_A-PSCs après le retour de l'activité synaptique spontanée totale en aprotinine+D-APV, pour des cellules ayant une fréquence de base des sGABA_A-PSCs <10Hz, avec ou sans TAT-Pep5.

Selon ces résultats, l'application CR-proBDNF en présence de NBQX et de D-APV, c'est-à-dire en bloquant la libération de BDNF et les NMDARs, devraient conduire à une LTP pour les cellules du groupe 1 mais pas pour les cellules du groupe 2. C'est effectivement ce qu'on observe : pour les cellules du groupe 1, ce protocole induit une potentialisation des sGABA_A-PSCs ($p=0,0005$, $n=14$, figure 8). Pour les cellules du groupe 2, ce protocole n'a pas d'effet sur les sGABA_A-PSCs ($n=9$, figure 8).

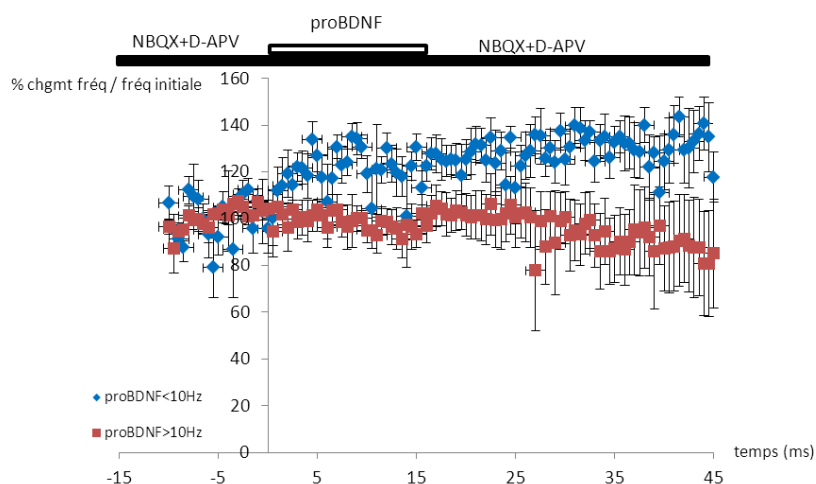


Figure 8. Pour des cellules matures, l'application de proBDNF n'a aucun effet sur les courants GABAergiques. Changement moyen de fréquence des sGABA_A-PSCs après le retour de l'activité synaptique spontanée totale, pour des cellules ayant une fréquence de base des sGABA_A-PSCs <10Hz ou >10Hz.

Le retour de l'activité synaptique spontanée totale en présence d'aprotinine induit donc une LTD-proBDNF-p75^{NTR} ou une LTP-proBDNF-p75^{NTR}, en fonction de l'activation ou non des NMDARs sur les cellules du groupe 1. Sur les cellules du groupe 2, ce protocole induit une LTD-proBDNF NMDA-dépendante et p75^{NTR}-indépendante.

Discussion

Ces résultats montrent que les plasticités BDNF-dépendantes de la transmission GABAergique sont régulées au cours du développement : les plasticités proBDNF- p75^{NTR}-dépendantes (LTP et LTD) sont uniquement présentes dans les cellules « immatures » dont la fréquence est <10Hz. La plasticité mBDNF-TrkBRS-dépendante est présente à tous les stades du développement étudiés. Cependant la polarité de cette plasticité change avec la « maturité » de la cellule : une LTP pour les cellules <10Hz et une LTD pour les cellules >10Hz.

Chez des cellules dont la fréquence de base des courants GABAergiques est supérieure à 10Hz, le retour de l'activité spontanée globale, en présence ou non d'aprotinine, induit une dépression des courants GABAergiques. Ce phénomène est bloqué par k252a et D-APV mais pas par TAT-Pep5. Cette plasticité est donc dépendante de l'activation des TrkBRS et des NMDARs mais indépendante des p75^{NTR}. Ces résultats sont consistants avec la diminution progressive de l'expression des p75^{NTR} au cours du développement. Ces résultats sont également cohérents avec des études précédentes montrant des effets bi-directionnels de l'activation des TrkBRS en fonction du stade de développement, via des voies de signalisation différentes (Rivera *et al.*, 2004). Il reste à déterminer si les TrkBRS sont activés en aprotinine, et comment: soit par le proBDNF, ou une partie libérée de BDNF sous forme mature.

Il semble donc que les 3 plasticités LTP-mBDNF-TrkBRS, la LTD-proBDNF- p75^{NTR} et la LTP-proBDNF- p75^{NTR} soient des phénomènes régulés de façon développementale, en fonction du niveau d'activité expérimenté par la cellule. A partir d'une certaine fréquence des courants glutamatergiques et GABAergiques, ces 3 plasticités disparaissent pour laisser place à une nouvelle, la LTD-TrkBRS-NMDARs. Ceci est cohérent avec l'idée qu'aux stades précoces du développement, un réseau synaptique primitif se construit, puis que celui-ci doit être épuré des connexions inutiles à l'obtention d'un réseau mature et fonctionnel.

Discussion

Au cours de ma thèse, j'ai montré que le BDNF endogène est libéré sous la forme d'un précurseur, clivé par une protéase extracellulaire, et qu'il est capable d'induire une plasticité des synapses GABAergiques. La polarité de la plasticité est dépendante du ratio proBDNF/mBDNF et du stade de développement.

Le mBDNF induit une LTP NMDARs-indépendante sur des cellules « immatures » (LTP-mBDNF-TrkBRS), et une LTD NMDARs-dépendante sur des cellules « matures » (LTD-mBDNF-TrkBRS). Le proBDNF induit une LTP (LTP-proBDNF-p75^{NTR}) ou une LTD (LTD-proBDNF-p75^{NTR}), en fonction de l'activation ou non des NMDARs, uniquement sur des cellules « immatures ». Son rôle sur les cellules « matures » n'a pas encore été clairement identifié.

I) Activité synaptique et libération de BDNF.

L'activité synaptique spontanée générée dans le réseau hippocampique immature induit une libération post-synaptique de BDNF par les cellules pyramidales glutamatergiques de la région CA3. Cette libération nécessite une entrée de calcium postsynaptique via les VDCCs. J'ai montré que le BDNF endogène peut être libéré en majorité sous sa forme immature, le proBDNF. Il peut être clivé par la voie tPA/plasmine extracellulaire, et ainsi générer du mBDNF. Comme dans beaucoup de régions du cerveau, l'hippocampe en développement est le lieu d'une forme d'activité synaptique de réseau immature, spontanée et synchronisée, les GDPs (giant depolarizing potentials, Ben-Ari, 2001). Ces patrons d'activité sont souvent impliqués dans des processus développementaux nécessaires à l'obtention d'un réseau neuronal mature et fonctionnel (Feller *et al.*, 1999 ; Blankenship *et al.*, 2010). Les GDPs représentent la majorité de l'activité synaptique spontanée expérimentée par l'hippocampe aux stades précoces post-nataux. De plus, ils représentent d'excellents candidats pour l'activation des VDCCs responsable de la libération de BDNF, étant donné qu'ils induisent une forte dépolarisation membranaire et une entrée massive de calcium dans le neurone. Cependant, de façon surprenante, nous avons montré que la libération de BDNF entraînant toutes ces formes de plasticités des synapses GABAergiques nécessitait uniquement l'activité des AMPARs (l'application de NBQX, un inhibiteur des AMPARs et des kainateRs, bloque la LTP-mBDNF-TrkBRS, la LTD-proBDNF-p75^{NTR} et la LTP-proBDNF-p75^{NTR}). La participation des kainateRs est en effet improbable. D'une part, l'expression de ces récepteurs ne commence pas avant P6 chez la souris (Marchal *et al.*, 2004). D'autre part, les courants isolés en présence de bicuculline ou de gabazine, inhibiteurs des courants GABAergiques, et de D-APV, un inhibiteur des NMDARs, présentent les caractéristiques cinétiques des courants des AMPARs (données non publiées).

L'activité des AMPARs induit une dépolarisation de la membrane neuronale et une activation des VDCCs postsynaptiques. Ces derniers vont induire une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium, nécessaire à la libération par la voie de sécrétion régulée du BDNF. Parmi les AMPARs, certains sont perméables au calcium (AMPA-Rs-CP) et pourraient contribuer à ce phénomène. D'une part, parce qu'ils représentent la majorité des AMPARs aux stades précoces du développement (dans l'hippocampe de la souris jusqu'à P17, Ho *et al.* 2007). D'autre part, les AMPARs-CP ont été impliqués dans plusieurs formes de plasticité, LTP et LTD (Man *et al.*, 2011). En ce qui concerne la plasticité des synapses GABAergiques, nous avons montré que l'application d'IEM-1460, un inhibiteur des AMPARs-CP, pendant le retour de l'activité spontanée totale, bloque la LTP-mBDNF-TrkBRS

(données non publiées). Bien qu'il ne semble y avoir qu'une seule source de BDNF pour les 3 formes de plasticité des cellules « immatures » étudiées, il reste à déterminer si l'IEM-1460 bloque également les plasticités proBDNF-dépendantes. Ces résultats ne nous permettent pas de savoir si leur seul rôle est de dépolariser la membrane postsynaptique ou si leur capacité à faire rentrer du calcium dans la cellule est également nécessaire pour atteindre une concentration intracellulaire suffisante à la sécrétion de BDNF.

On peut exclure que la contribution des NMDARs et des réserves intracellulaires de calcium soit nécessaire à la sécrétion de BDNF. En effet, LTP-mBDNF-TrkBRS et de la LTP-proBDNF-p75^{NTR} sont observées en présence de D-APV ou de thapsigargine (un inhibiteur indirect de la libération de calcium par le réticulum endoplasmique). Par contre la LTD-mBDNF-TrkBRS et la LTD-proBDNF-p75^{NTR} nécessitent l'activation des NMDARs. Le rôle précis de ces récepteurs dans ces dépressions reste à déterminer.

II) Libération de proBDNF.

Le fait que le proBDNF puisse être libéré dans le milieu extracellulaire a été débattu. Notamment, en 2008, Matsumoto *et al.* ont montré sur des cultures cellulaires hippocampiques que le proBDNF n'est pas détectable dans le milieu extracellulaire. Cependant, en 2009, Yang *et al.* ont montré l'inverse. L'explication à l'opposition entre ces résultats pourrait venir des conditions expérimentales différentes. En effet, dans la première étude, les dosages de proBDNF sont effectués en absence d'inhibiteurs des protéases extracellulaires capables de cliver la proneurotrophine. De plus, les cultures utilisées par Matsumoto *et al.* contiennent des cellules gliales. Or, celles-ci peuvent internaliser le proBDNF (Bergami *et al.*, 2008).

Dans notre étude, nous n'avons pas fourni la preuve directe de la sécrétion du proBDNF dans des tranches d'hippocampe en développement. En effet, le dosage direct du proBDNF libéré dans nos conditions expérimentales, par exemple par ELISA, est faisable mais très compliquée, du fait du faible taux d'expression de BDNF endogène, et de sa faible distance de diffusion due à ses caractéristiques électriques et sa rapide propension à être internalisé par les cellules gliales (qu'on ne peut enlever de notre préparation) et neuronales. Nous avons donc utilisé une méthode indirecte pour montrer que dans notre protocole, le BDNF libéré se trouvait sous forme de précurseur. En effet, le mBDNF via les TrkBRS induit une phosphorylation de CREB (cAMP-response element-binding protein). Nous avons utilisé la forme phosphorylée de CREB comme détecteur d'activation des TrkBRS, et donc indirectement de libération de mBDNF. Ainsi, le mBDNF libéré selon notre protocole ou appliqué de façon exogène, induit, en cultures dissociées et sur tranches d'hippocampe, la phosphorylation de CREB. En présence d'un inhibiteur du clivage extracellulaire du proBDNF, l'aprotinine, ou suite à l'application de CR-proBDNF, le facteur de transcription CREB n'est pas activé. Etant donné que du mBDNF exogène peut toujours activer CREB en présence d'aprotinine, l'effet observé n'est donc pas dû à une interaction entre l'aprotinine et la voie de signalisation entre les TrkBRS et CREB.

Une manière plus directe de prouver la libération de proBDNF est de trouver un senseur de l'activation de $p75^{\text{NTR}}$. ICER (inducible cAMP early repressor) est un facteur de transcription qui se fixe sur les mêmes promoteurs que CREB mais qui, contrairement à lui, inhibe l'expression de gènes sous leur contrôle (Hu *et al.*, 2008). Nous avons montré sur cultures dissociées hippocampiques que l'application de CR-proBDNF ou d'aprotinine induit une activation $p75^{\text{NTR}}$ -sensible d'ICER. Celui-ci pourrait donc être utilisé comme indicateur de l'activation de $p75^{\text{NTR}}$ par le proBDNF, comme CREB pour le mBDNF, dans nos conditions expérimentales sur tranches.

III) Mécanismes.

Les mécanismes par lesquels l'activation des voies des TrkBRS et des $p75^{\text{NTR}}$ peut modifier la transmission GABAergique restent à découvrir. Plusieurs hypothèses sont possibles : modification du nombre ou des propriétés des GABA_ARs, modification du nombre de synapses fonctionnelles, modification de la probabilité de libération du GABA, et modification de l'excitabilité des interneurons. Pour répondre plus précisément à cette question, plusieurs expériences sont envisageables. D'une part, une stimulation unitaire des courants GABAergiques permettra la mesure du pourcentage d'échecs de l'induction des courants évoqués GABAergiques et du coefficient de variation et du ratio en paired-pulse de l'amplitude de ces courants. D'autre part, l'utilisation de strontium permettra l'analyse de la fréquence et de l'amplitude des courants miniatures GABAergiques spontanés.

Concernant, d'éventuels effets postsynaptiques, Porcher *et al.* (2011) ont démontré sur cultures cérébrocorticales que l'activation des GABA_ARs induit la libération de BDNF. Ce BDNF va alors potentialiser les synapses GABAergiques via l'activation des TrkBRS. Ceux-ci activent la voie PI3K/PKC et inhibent l'endocytose des GABA_ARs à la surface. Inversement, les résultats préliminaires obtenus par C. Porcher indiquent que sur cultures hippocampiques dissociées, l'application de proBDNF ou d'aprotinine induit une diminution du nombre de GABA_ARs, une augmentation du nombre d'endosomes et une augmentation de la colocalisation des GABA_ARs et des marqueurs endosomiques. C. Porcher a également montré que l'activation des TrkBRS par le mBDNF et des $p75^{\text{NTR}}$ par le proBDNF induit l'activation de CREB et ICER respectivement. ICER et CREB sont connus pour réguler de façon opposée l'expression de plusieurs sous-unités des GABA_ARs (Hu *et al.*, 2008). On peut donc imaginer un modèle selon lequel l'activation des TrkBRS et des $p75^{\text{NTR}}$ induit un effet biphasique. Durant une première phase rapide, la durée pendant laquelle les GABA_ARs resteraient à la membrane serait soit augmentée, soit diminuée, respectivement. Durant la seconde phase plus lente, l'expression des GABA_ARs serait modifiée, conduisant à des modifications quantitatives et qualitatives des GABA_ARs à la surface.

IV) Les NMDARs : marqueurs bidirectionnel de l'« utilité » synaptique ?

Nous avons montré que l'activation des récepteurs NMDARs pouvait moduler la polarité de la plasticité BDNF-dépendante des synapses GABAergiques. Lors du développement cérébral, des synapses considérées comme « utiles » vont être renforcées, tandis que des synapses considérées comme « inutiles » vont être supprimées. Une des marqueurs les plus connues d'« utilité » est un fonctionnement synaptique selon la loi hebbienne, c'est-à-dire une synchronisation de l'activité des compartiments pré- et postsynaptiques (libération de neurotransmetteurs concomitante à une dépolarisation postsynaptique). D'autres marqueurs de l'« utilité » synaptique peuvent exister. En 2007, Liu Y *et al.* ont mis en évidence un modèle de plasticité bidirectionnelle des synapses GABAergiques, également dépendant de la transmission glutamatergique mais complètement opposé au notre, chez le têtard de Xénope. En absence de courants glutamatergiques, une stimulation induit une dépression des synapses GABAergiques, tandis qu'en présence de courants glutamatergiques, une stimulation induit une potentialisation de celles-ci, dont l'amplitude est linéairement corrélée au ratio excitation/inhibition. La potentialisation est dépendante de l'activation de NMDARs postsynaptiques et d'une activation des TrkBRS présynaptiques. En cas de blocage des NMDARs postsynaptiques, une dépression est observée. Dans ce cas, la présence de NMDARs peut être considérée comme un marqueur positif d'« utilité » synaptique, contrairement à notre modèle où elle peut être considérée comme un marqueur négatif d'« utilité ».

En 2012, Je *et al.* ont créé un modèle consistant en un myocyte contacté par 2 motoneurones. Lorsqu'on stimule un de ces 2 motoneurones, celui-ci est stabilisé, tandis que l'autre est éliminé. Ces processus sont respectivement induits par les voies mBDNF/TrkBRS et proBDNF/p75^{NTR}, sachant que le BDNF libéré par le myocyte est sous forme immature et que la polarité du phénomène de maturation dépend de l'activation de métalloprotéases extracellulaires. En 2009, Nagappan *et al.* ont quant à eux montré qu'une stimulation haute fréquence de neurones en culture induit une libération de proBDNF et de tPA qui convertit celui-ci en mBDNF, tandis qu'une stimulation basse fréquence induit uniquement une libération de proBDNF qui va s'accumuler dans le milieu extracellulaire. Le clivage du proBDNF extracellulaire est donc dépendant de l'activité synaptique, que ce soit via la sécrétion de protéases ou par leur activation.

Dans notre protocole, en conditions physiologiques, le proBDNF n'est pas accumulé dans le milieu extracellulaire. Cependant, étant donné que sa sécrétion et son accumulation sont dépendants du type d'activité synaptique générées, on peut imaginer qu'une activité synaptique pathologique induise une accumulation de proBDNF. En conditions pathologique, l'expression de KCC2 peut diminuer et le GABA redevenir dépolarisant, par exemple dans certains cas d'épilepsie (Huberfield *et al.*, 2007). On sait également que chez l'adulte, en conditions pathologiques, l'expression des p75^{NTR} peut réapparaître, alors qu'elle est normalement confinée aux stades précoces du développement (Chen *et al.*, 2009). Dans ces conditions, la proBDNF-p75^{NTR}-LTD pourrait inhiber l'excitation GABAergique lorsqu'elle est convergente à l'excitation glutamatergique et donc diminuer le niveau de décharge du réseau. Dans ce cas, la présence de NMDARs peut être considérée comme un marqueur négatif d'« utilité » synaptique.

V) Séquence développementale.

Au cours de ma thèse, j'ai montré l'existence d'une séquence développementale d'expression des plasticités GABAergiques dépendantes du BDNF pour les cellules pyramidales des CA3 dans l'hippocampe de rat en développement. Ces observations sont à replacer dans la chronologie de maturation fonctionnelle des synapses GABAergiques et glutamatergiques observée dans l'hippocampe en développement. En effet Tyzio *et al.*, (1999) ont montré que les premières synapses fonctionnelles formées sur les cellules pyramidales sont GABAergiques. Puis les synapses glutamatergiques fonctionnelles se forment. Les auteurs ont également montré que les deux types cellulaires (purement GABAergique et GABAergique° glutamatergique) cohabitent aux stades précoces du développement. Par conséquent, les cellules « immatures » présentant uniquement des synapses GABAergiques exprimeront uniquement des plasticités ne nécessitant pas l'activation des NMDARs : la LTP-mBDNF-TrkBRS et la LTP-proBDNF-p75^{NTR}. Ces cellules ne possédant pas de synapses glutamatergiques, la libération de BDNF AMPARs-dépendante nécessaire à l'induction de ces LTP se fera par les cellules voisines plus matures. Lorsque ces cellules « immatures » acquièrent une transmission glutamatergique fonctionnelle, elles peuvent alors être le siège des dépressions : la LTD-proBDNF-p75^{NTR} et la LTD-mBDNF-TrkBRS. Enfin, lorsque ces cellules atteignent un stade « mature » (transmissions GABAergique et glutamatergique importantes), elles ne peuvent plus expérimenter qu'une forme de plasticité : la LTD-TrkBRS-NMDARs.

Les plasticités proBDNF- p75^{NTR} -dépendantes ne sont quant à elles présentes chez des cellules « immatures ». Cela s'explique par l'expression régulée de façon développementale des p75^{NTR}. De plus, le proBDNF pourrait également induire la TrkBRS-LTD NMDA-dépendante. Il est également possible que les cellules matures ne libèrent plus que du mBDNF.

La fonction possible de ces plasticités est la maturation du réseau hippocampique par la stabilisation (LTP) ou l'élimination (LTD) des synapses GABAergiques. En conditions physiologiques, le mBDNF pourrait favoriser la stabilisation des synapses GABAergiques sur les cellules immatures afin de générer un réseau primitif dense de connections synaptiques (LTP-mBDNF-TrkBRS). Sur les cellules matures, le mBDNF pourrait ensuite favoriser l'élimination des synapses surnuméraires « inutiles » (LTD-mBDNF-TrkBRS). Cela serait cohérent avec le développement de la morphologie des interneurons : certains présentent des collatérales axonales plus développées que chez l'adulte (Hennou *et al.*, 2002). L'obtention d'une telle morphologie immature puis le passage à une morphologie mature pourrait être expliqué par des phénomènes similaires à ceux que nous avons observés dans les plasticités dépendantes du BDNF.

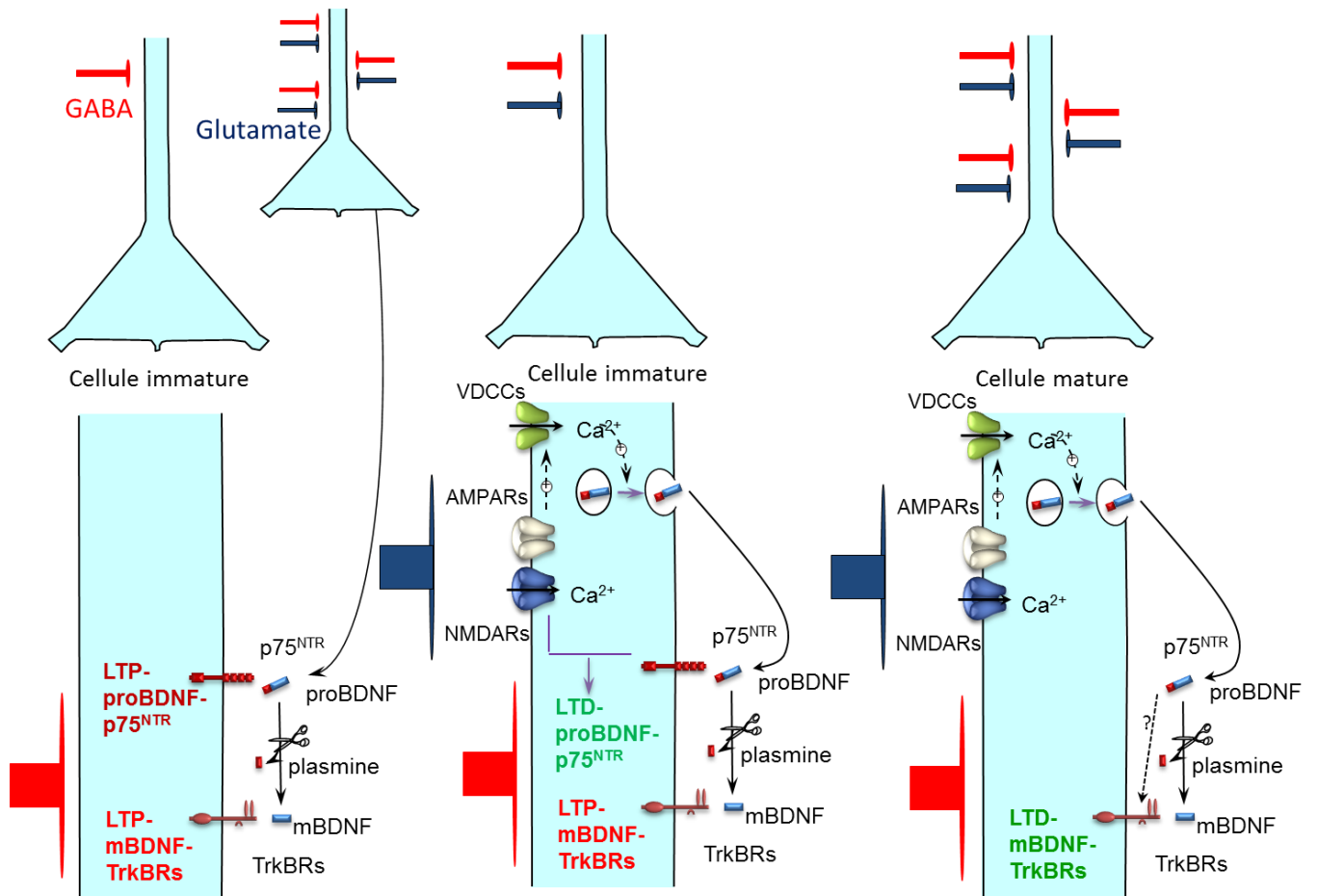


Figure 8. Séquence développementale dans l'hippocampe de rat en développement.

Bibliographie

Aid *et al.*, Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited, *Journal of Neuroscience Research*, 2007.

Amaral *et al.*, BDNF induces calcium elevations associated with IBDNF, a nonselective cationic current mediated by TRPC channels, *Journal of Neurophysiology*, 2007.

An *et al.*, Distinct role of long 3' UTR BDNF mRNA in spine morphology and synaptic plasticity in hippocampal neurons, *Cell*, 2008.

Barde *et al.*, Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain, *EMBO Journal*, 1982.

Bellion *et al.*, Early differences in axonal outgrowth, cell migration and GABAergic differentiation properties between the dorsal and lateral cortex, *Cerebral Cortex*, 2003.

Ben-Ari, Developing networks play a similar melody, *Trends in Neuroscience*, 2001.

Ben-Ari *et al.*, GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations, *Physiology Review*, 2007.

Benarroch, GABA(B) receptors: structure, functions, and clinical implications, *Neurology*, 2012.

Bergami *et al.*, Uptake and recycling of pro-BDNF for transmitter-induced secretion by cortical astrocytes, *Journal of Cell Biology*, 2008.

Berghuis *et al.*, Brain-derived neurotrophic factor controls functional differentiation and microcircuit formation of selectively isolated fast-spiking GABAergic interneurons, *European Journal of Neuroscience*, 2004.

Binder *et al.*, Brain-derived neurotrophic factor, *Growth Factor*, 2004.

Blankenship *et al.*, Mechanisms underlying spontaneous patterned activity in developing neural circuits, *Nature*, 2010.

Bliss *et al.*, Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path, *Journal of Physiology*, 1973.

Blum *et al.*, Neurotrophin-evoked depolarization requires the sodium channel Na(V)1.9, *Nature*, 2002.

Bonifazi *et al.*, GABAergic hub neurons orchestrate synchrony in developing hippocampal networks, *Science*, 2009.

Castillo *et al.*, Long-term synaptic plasticity at inhibitory synapses, *Current Opinion in Neurobiology*, 2011.

Chen *et al.*, Multiple roles of the p75 neurotrophin receptor in the nervous system, *Journal of International Medical Research*, 2009.

Cherubini *et al.*, The depolarizing action of GABA controls early network activity in the developing hippocampus, *Molecular Neurobiology*, 2011.

Cohen-Cory *et al.*, Brain-derived neurotrophic factor and the development of structural neuronal connectivity, *Developmental Neurobiology*, 2010.

D'Hulst *et al.*, The complexity of the GABAA receptor shapes unique pharmacological profiles, *Drug Discovery Today*, 2009.

Danglot *et al.*, The development of hippocampal interneurons in rodents, *Hippocampus*, 2006.

Epsztein *et al.*, Recurrent mossy fibers establish aberrant kainate receptor-operated synapses on granule cells from epileptic rats, *Journal of Neuroscience*, 2005.

Esposito *et al.*, The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor, *Journal of Biological Chemistry*, 2001.

Farhadi *et al.*, Neurotrophin-3 sorts to the constitutive secretory pathway of hippocampal neurons and is diverted to the regulated secretory pathway by coexpression with brain-derived neurotrophic factor, *Journal of Neuroscience*, 2000.

Farrant *et al.*, Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors, *Nature Review Neuroscience*, 2005.

Feller *et al.*, Spontaneous correlated activity in developing neural circuits, *Neuron*, 1999.

Gaĩarsa *et al.*, Long-term plasticity at GABAergic and glycinergic synapses: mechanisms and functional significance, *Trends in Neuroscience*, 2002.

Gubellini *et al.*, Activity- and age-dependent GABAergic synaptic plasticity in the developing rat hippocampus, *European Journal of Neuroscience*, 2001.

Gubellini *et al.*, Endogenous neurotrophins are required for the induction of GABAergic long-term potentiation in the neonatal rat hippocampus, *Journal of Neuroscience*, 2005.

Hardingham *et al.*, The Yin and Yang of NMDA receptor signaling, *Trends in Neuroscience*, 2003.

Hartmann *et al.*, Synaptic secretion of BDNF after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses, *EMBO Journal*, 2001.

Heifets *et al.*, Interneuron activity controls endocannabinoid-mediated presynaptic plasticity through calcineurin, *PNAS*, 2008.

Hennou *et al.*, Early sequential formation of functional GABA(A) and glutamatergic synapses on CA1 interneurons of the rat foetal hippocampus, *European Journal of Neuroscience*, 2002.

Heymach *et al.*, Differential activity-dependent secretion of brain-derived neurotrophic factor from axon and dendrite, *Nature*, 1995.

Ho *et al.*, Developmental expression of Ca²⁺-permeable AMPA receptors underlies depolarization-induced long-term depression at mossy fiber CA3 pyramid synapses, *Journal of Neuroscience*, 2007.

Hu *et al.*, Surface expression of GABAA receptors is transcriptionally controlled by the interplay of cAMP-response element-binding protein and its binding partner inducible cAMP early repressor, *Journal of Biological Chemistry*, 2008.

Huberfield *et al.*, Perturbed chloride homeostasis and GABAergic signaling in human temporal lobe epilepsy, *Journal of Neuroscience*, 2007.

Ichim *et al.*, Neurotrophins and cell death, *Experimental Cell Research*, 2012.

Je *et al.*, Role of pro-brain-derived neurotrophic factor (proBDNF) to mature BDNF conversion in activity-dependent competition at developing neuromuscular synapses, *PNAS*, 2012.

Jiang *et al.*, GABAergic neurons that pioneer hippocampal area CA1 of the mouse: morphologic features and multiple fates, *Journal of Comparative Neurology*, 201.

Kaupmann *et al.*, Expression cloning of GABA(B) receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors, *Nature*, 1997.

Kasyanov *et al.*, GABA-mediated giant depolarizing potentials as coincidence detectors for enhancing synaptic efficacy in the developing hippocampus, *PNAS*, 2004.

Kohara *et al.*, Activity-dependent transfer of brain-derived neurotrophic factor to postsynaptic neurons, *Science*, 2001.

Koshimizu *et al.*, Multiple functions of precursor BDNF to CNS neurons: negative regulation of neurite growth, spine formation and cell survival, *Molecular Brain*, 2009.

Kuczewski *et al.*, Activity-dependent dendritic secretion of brain-derived neurotrophic factor modulates synaptic plasticity, *European Journal of Neuroscience*, 2010.

Lee *et al.*, Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins, *Science*, 2001.

Leinekugel *et al.*, Ca²⁺ oscillations mediated by the synergistic excitatory actions of GABA(A) and NMDA receptors in the neonatal hippocampus, *Neuron*, 1997.

Lessmann *et al.*, Neurotrophin secretion: current facts and future prospects, *Progress in Neurobiology*, 2003.

Lessmann *et al.*, Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: an update, *Neuroscience Research*, 2009.

Levi-Montalcini *et al.*, In vitro experiments on the effects of mouse sarcomas 180 and 37 on the spinal and sympathetic ganglia of the chick embryo, *Cancer Research*, 1954.

Levy *et al.*, Synapses as associative memory elements in the hippocampal formation, *Brain Research*, 1979.

Liu SJ *et al.*, Ca²⁺-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and neuronal death, *Trends in Neuroscience*, 2007.

Liu Y *et al.*, Heterosynaptic scaling of developing GABAergic synapses: dependence on glutamatergic input and developmental stage, *Journal of Neuroscience*, 2007.

Lopez-Benito *et al.*, Preferential origin and layer destination of GAD65-GFP cortical interneurons, *Cerebral Cortex*, 2004.

Lu, BDNF and activity-dependent synaptic modulation, *Learning Memory*, 2003.

Man *et al.*, GluA2-lacking, calcium-permeable AMPA receptors--inducers of plasticity? *Current opinion in neurobiology*, 2011.

Marchal *et al.*, Postnatal maturation of mossy fibre excitatory transmission in mouse CA3 pyramidal cells: a potential role for kainate receptors, *Journal of Physiology*, 2004.

Marty *et al.*, GABAergic stimulation regulates the phenotype of hippocampal interneurons through the regulation of brain-derived neurotrophic factor, *Neuron*, 1996.

Marty *et al.*, Neuronal activity and brain-derived neurotrophic factor regulate the density of inhibitory synapses in organotypic slice cultures of postnatal hippocampus, *Journal of Neuroscience*, 2000.

Matsuda *et al.*, Differential activity-dependent secretion of brain-derived neurotrophic factor from axon and dendrite, *Journal of Neuroscience*, 2009.

Matsumoto *et al.*, Biosynthesis and processing of endogenous BDNF: CNS neurons store and secrete BDNF, not pro-BDNF, *Nature Neuroscience*, 2008.

McLean *et al.*, Spontaneous release of GABA activates GABAB receptors and controls network activity in the neonatal rat hippocampus, *Journal of Neurophysiology*, 1996.

Michles and Moss, GABA(A) receptors: properties and trafficking, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2007.

Michmizos *et al.*, Synaptic plasticity: a unifying model to address some persisting questions, *International Journal of Neuroscience*, 2010.

Mohajerani *et al.*, Correlated network activity enhances synaptic efficacy via BDNF and the ERK pathway at immature CA3 CA1 connections in the hippocampus, *PNAS*, 2007.

Mowla *et al.*, Differential sorting of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons, *Journal of Neuroscience*, 1999.

Nagappan *et al.*, Control of extracellular cleavage of ProBDNF by high frequency neuronal activity, *PNAS*, 2009.

Ozawa *et al.*, Glutamate receptors in the mammalian central nervous system, Progress in Neurobiology, 1998.

Pang *et al.*, Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity, Science 2004.

Polleux *et al.*, Control of cortical interneuron migration by neurotrophins and PI3-kinase signaling, Development, 2002.

Poo, Neurotrophins as synaptic modulators, Nature reviews Neuroscience, 2001.

Porcher *et al.*, Positive feedback regulation between gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptor signaling and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) release in developing neurons, Journal of Biological Chemistry, 2011.

Reichardt, Neurotrophin-regulated signalling pathways, Philosophical Transactions of the Royal Society of London, 2006.

Rösch *et al.*, The neurotrophin receptor p75NTR modulates long-term depression and regulates the expression of AMPA receptor subunits in the hippocampus, PNAS, 2005.

Sipila *et al.*, Depolarizing GABA acts on intrinsically bursting pyramidal neurons to drive giant depolarizing potentials in the immature hippocampus, Journal of Neuroscience, 2005.

Sipila *et al.*, GABAergic control of CA3-driven network events in the developing hippocampus, Results and Problems in Cell Differentiation, 2008.

Sivakuraman *et al.*, At immature mossy-fiber-CA3 synapses, correlated presynaptic and postsynaptic activity persistently enhances GABA release and network excitability via BDNF and cAMP-dependent PKA, Journal of Neuroscience, 2009.

Skaper *et al.*, The neurotrophin family of neurotrophic factors: an overview, Methods in Molecular Biology, 2012.

Stelzer *et al.*, Activation of NMDA receptors blocks GABAergic inhibition in an in vitro model of epilepsy, Nature, 1987.

Traub *et al.*, Cellular mechanism of neuronal synchronization in epilepsy, Science, 1982.

Tyzio *et al.*, The establishment of GABAergic and glutamatergic synapses on CA1 pyramidal neurons is sequential and correlates with the development of apical dendrites, Journal of Neuroscience, 1999.

Vicario-Abejon *et al.*, Neurotrophins induce formation of functional excitatory and inhibitory synapses between cultured hippocampal neurons, Journal of Neuroscience, 1998.

Vicario-Abejon *et al.*, Hippocampal stem cells differentiate into excitatory and inhibitory neurons, European Journal of Neuroscience, 2000.

Woo *et al.*, Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression, Nature Neuroscience, 2005.

Yamada *et al.*, Brain-derived neurotrophic factor promotes the maturation of GABAergic mechanisms in cultured hippocampal neurons, Journal of Neuroscience, 2002.

Yang *et al.*, Neuronal release of proBDNF, Nature Neuroscience, 2009.

Yoshii *et al.*, Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease, Developmental Neurobiology, 2010.

Résumé

Français

Titre Rôle du BDNF dans le développement des synapses GABAergiques dans l'hippocampe de rat.

Résumé Le cerveau immature est le siège de processus développementaux qui permettent de passer d'une structure primitive à un réseau mature et fonctionnel. L'activité synaptique spontanée générée dans le système nerveux en développement joue un rôle fondamental dans ces processus. Un des principaux moyens par lesquels cette activité peut être traduite en changement phénotypique au niveau neuronal est la sécrétion de neurotrophines. Les neurotrophines sont sécrétées par les neurones et contrôlent toutes les étapes du développement neuronal. Dans l'hippocampe en développement, la neurotrophine principale est le BDNF (brain derived neurotrophic factor). Cette protéine est synthétisée sous forme immature, le proBDNF, dont le rôle est encore méconnu. Durant ma thèse, j'ai montré que le BDNF exerce un contrôle bidirectionnel sur l'efficacité des synapses GABAergiques en développement. La polarité de la plasticité est déterminée par le type d'activité endurée par les neurones et la forme sous laquelle le BDNF est présenté à ces derniers. J'ai ainsi décrit une séquence développementale qui pourrait s'inscrire dans les processus développementaux permettant la maturation du réseau GABAergique dans l'hippocampe de rat.

Mots clés Développement, hippocampe, BDNF, GABA.

English

Title Role of BDNF in the development of GABAergic synapses in the rat hippocampus.

Abstract The immature brain is the place of developmental processes that allow the switch from a primitive structure to a mature and functional network. Spontaneous synaptic activity generated in the developing nervous system plays a fundamental role in these processes. One of the principal ways this activity is translated into phenotypical changes at the neuronal level is the secretion of neurotrophins. Neurotrophins are secreted by neurons and control each step of neuronal development. In the developing hippocampus, the major neurotrophin is BDNF (brain derived neurotrophic factor). This protein is synthesized under an immature form, proBDNF, which role is still poorly known. During my thesis, I showed that BDNF exerts a bidirectional control on the efficacy of developing GABAergic synapses, which polarity is set by the type of activity endured by neurons and the form of BDNF that is presented to them. I described a developmental sequence which could be a part of the developmental processes allowing the maturation of the GABAergic network in the developing rat hippocampus.

Key words Development, hippocampus, BDNF, GABA.