

Aix-Marseille Université
Faculté des Sciences de Luminy
École doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Thèse de Doctorat

présentée et soutenue publiquement par

Baptiste Riffault

en vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université d'Aix Marseille

spécialité Neurosciences

Plasticité GABAergique et épilepsie : Focus sur le proBDNF

Soutenue le 25 février 2016 devant le jury composé de

Pr. François Féron	Président du jury
Pr. Pascal Branchereau	Rapporteur
Dr. Sabine Levi	Rapporteur
Pr. Yehezkel Ben Ari	Examineur
Dr. Nicola Kuczewski	Examineur
Pr. Christophe Porcher	Directeur de thèse

INMED-INSERM UMR 901

Institut de Neurobiologie de la Méditerranée

Plasticité GABAergique et épilepsie :
Focus sur le proBDNF

Remerciements.

En premier lieu, je voudrais remercier tous les membres du jury pour avoir accepté d'examiner mon manuscrit de thèse.

Je remercie le fondateur et le directeur honoraire de l'INMED, le Professeur Yehezkel Ben-Ari, qui a fait de cet institut un lieu de vie scientifique unique qui rassemble convivialité, art et excellence.

Je remercie le directeur de l'INMED, le Docteur Alfonso Represa, pour m'avoir accueilli au sein de l'institut et avoir mis à ma disposition les moyens techniques et financiers pour effectuer cette thèse dans de très bonnes conditions.

Je ne remercierai jamais assez l'équipe qui m'a accueilli, l'équipe du Dr Jean-Luc Gaiarsa. Merci Yanlouc et Christophe Porcher, mon directeur de thèse, de m'avoir supporté toutes ces années. Merci pour nos fous rires qui arrivent toujours au bon moment, en fin de journée bien galère toujours un réconfort, merci pour nos discussions scientifiques et moins scientifiques. Jean-Luc, un esprit créatif musical impressionnant. Toutefois, ne jamais laisser une paire de baguettes proche de son bureau, ni la paire de ciseaux et le scotch (ni le fameux escargot, hein christophe ;)) mais pour d'autre raison.

Merci à Camille Dumon(d), alias CamCam, pour son soutien et surtout pour notre pause-café-décompression, tu as toujours été présente pour faire partie des délires dans le bureau.

Merci à Lucie pour ta gentillesse. Merci à Diabé Diabira alias Dédé pour ton sourire et ton aide dans les tâches communes et dans les expériences. Merci à Igor Medina pour ta douceur Ukrainienne de tous les instants. Merci aussi à tous les anciens membres qui ont croisés mon chemin, Damien Guimond et Anaïs Langlois.

Un remerciement spécial au plus « ancien » membre de l'équipe, Nadine Ferrand, alias « mamie », tu m'as aidé dans tous les projets de plusieurs façons. Merci pour ton soutien, ta bonne humeur, ton franc parlé, toutes tes attentions. Tu resteras une personne très importante dans l'histoire de mon doctorat, ton bisounours.

Merci aussi à tous les chercheurs de l'INMED qui m'ont apporté beaucoup par leurs connaissances et leurs explications.

Merci à Christophe Pellegrino, alias Cricri, qui est toujours là pour m'aider, discuter et me faire marrer.

Merci à tous les doctorants.

Merci à nazimus qui a été présent dans tous les moments importants depuis que j'ai intégré l'INMED. Merci pour ton aide, ton soutien et, surtout, pour tous les meilleurs moments de la house INMEDienne ! Nous sommes les 2 acolytes inséparables de l'INMED. Merci mon ami d'avoir été qui tu es et d'être un vrai pilier dans mon doctorat.

Merci à tous les autres également, Laminouch, Anissa, Olivier, Laurianne,...

Merci aux personnels de l'administration, à « Bahiddja » qui est toujours présente pour nos demandes plus ou moins importantes et, surtout, pour la joie qu'elle apporte à l'institut. Merci à Robert, toujours prêt à participer à la construction et la modification des Set-ups.

Un merci tout spécial à ma petite famille new-yorkaise, Aurélie et Michel. A ma petite marraine de thèse qui m'a vraiment aidé pendant mon doctorat, à nos discussions skype longue distance, à « mich-mich » pour nos sorties rugby et sessions déconnes dans ton (ancien) bureau, vous êtes géniaux !!

Merci aux personnels de « Tous chercheurs » : Constance, Amina, Marion et surtout à Jeannot qui a toujours été partant pour m'accueillir et toujours été présent pour des discussions tardives sur notre passion du sport.

La thèse est un aboutissement dans les études et ce long chemin n'est possible que grâce au soutien de la famille. Je voudrais donc grandement remercier ma famille qui m'a soutenu toutes ces années, ils ont été présents pour chaque réussite dans ma vie étudiante et personnelle et je ne serais pas là où j'en suis sans eux. Merci !

Ces remerciements ne peuvent s'achever sans une pensée pour ma première fan. Je remercie donc également ma femme et très chère épouse pour son soutien inconditionnel et son réconfort de tous les instants. Tu as été là pendant toutes ces années, merci pour ton enthousiasme sur mon projet de recherche « BDNF, KCC2 et chlore sensor » comme tu dis souvent, notre couple a grandi en même temps que mon projet professionnel et notre histoire continue avec le partage encore et toujours de grands moments de bonheur, de rire et d'amour pour le restant de notre vie.

Sans oublier les rats dont la vie a été sacrifiée pour la patrie, pour la science et pour la gloire et sans qui ces travaux n'auraient pu avoir lieu.



Table des matières

REMERCIEMENTS.....	V
TABLE DES MATIERES	VIII
TABLE DES FIGURES	X
INTRODUCTION	1
1. BRAIN DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR (BDNF).....	3
1.1. GENERALITES.....	3
1.1.1. Les neurotrophines.....	3
1.2. BRAIN DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR (BDNF)	4
1.2.1. Distribution.....	5
1.2.2. Transcrit	6
1.2.3. Protéine BDNF.....	7
1.2.3.1. Synthèse	7
1.2.3.2. Adressage	8
1.2.3.3. Maturation	9
1.2.4. Sécrétion.....	10
1.2.4.1. Transport subcellulaire et site de libération.....	10
1.2.4.2. Libération activité dépendante	13
1.2.5. Les récepteurs du BDNF.....	14
1.2.5.1. Le récepteur TrkB	14
1.2.5.2. Le récepteur p75 ^{NTR}	18
1.2.6. Ange et démon : mBDNF et proBDNF ?.....	20
1.2.6.1. mBDNF.....	21
1.2.6.2. ProBDNF	22
2. NEUROTRANSMISSION GABAERGIQUE.....	27
2.1. NEUROTRANSMETTEUR GABA	27
2.1.1. Généralités	27
2.1.2. Métabolisme du GABA	28
2.1.3. Développement des interneurons GABAergiques.....	29
2.2. SYNAPSE GABAERGIQUE	31
2.2.1. Récepteurs GABA.....	31
2.2.1.1. Récepteurs GABA _B	31
2.2.1.2. Récepteurs GABA _A	32
2.2.1.2.1. Composition en sous-unités	33
2.2.1.2.2. Expression des GABAAR.....	34
2.2.1.2.3. Adressage, endocytose et recyclage des GABAAR.....	36
2.3. SEQUENCE DEVELOPPEMENTALE DU GABA.....	39
2.4. ACTION TROPHIQUE DU GABA	43
2.5. BDNF ET TRANSMISSION GABAERGIQUE	44
3. PROBDNF ET EPILEPSIE.....	45
3.1. GENERALITES EPILEPSIE	45
3.2. EPILEPSIE DU LOBE TEMPORAL (ELT).....	46
3.2.1. Historique clinique des patients atteints de ELT.....	47
3.2.2. Modèles animaux d'ELT	48

3.2.2.1.	Généralités	48
3.2.2.2.	Modèle d'étude : le modèle pilocarpine	49
3.2.3.	<i>Pathophysiologie de l'épileptogenèse chez l'homme et le modèle animal</i>	49
3.2.3.1.	Activité GABAergique et épilepsie	51
3.2.3.1.1.	Modification des GABAARs	52
3.2.3.1.2.	Renforcement de la transmission GABAergique.	53
3.2.3.1.3.	Homéostasie chlore et ELT.	53
3.3.	MBDNF/PROBDNF ET EPILEPSIE	54
OBJECTIF DE LA THESE		57
RESULTATS		61
DISCUSSION		141
REFERENCES		155

Table des figures

FIGURE 1. EVOLUTION DES NEUROTROPHINES	4
FIGURE 2. EXPRESSION DU BDNF	5
FIGURE 3. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ÉPISSAGE ALTERNATIF ET DE LA TRANSCRIPTION DU GENE BDNF DE LA SOURIS	7
FIGURE 4. LE PREPROBDNF	7
FIGURE 5. SYNTHÈSE ET MODE DE SÉCRETION DU BDNF DANS LE NEURONE	9
FIGURE 6. TRANSPORT AXONAL RETROGRADE ET ANTEROGRADE DU BDNF	11
FIGURE 7. SÉCRETION DENDRITIQUE ET AXONALE DU BDNF	12
FIGURE 8. MÉCANISMES DÉCLENCHÉURS DE LA LIBÉRATION SYNAPTIQUE DU BDNF	14
FIGURE 9. EXPRESSION DU RECEPTEUR TrkB DANS LE CERVEAU	15
FIGURE 10. PRINCIPALES VOIES DE SIGNALISATION ACTIVÉES PAR LE RECEPTEUR TrkB	17
FIGURE 11. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU RECEPTEUR p75 ^{NTR}	19
FIGURE 12. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES VOIES DE SIGNALISATION DE p75 ^{NTR}	20
FIGURE 13. CONVERSION ACTIVITÉ DÉPENDANTE DU PROBDNF EN MBDNF : UN MODÈLE DE PLASTICITÉ SYNAPTIQUE ACTIVITÉ DÉPENDANTE DANS L'ORGANISATION DES JONCTIONS NEUROMUSCULAIRES	24
FIGURE 14. IMPLICATION DE LA VOIE PROBDNF/p75 ^{NTR} DANS LA DÉPRESSION ET LA RETRACTATION DES SYNAPSES ASYNCHRONES	25
FIGURE 15. SYNTHÈSE ET TRANSPORT DU GABA AU NIVEAU DE LA SYNAPSE	28
FIGURE 16. DIVERSITÉ DES INTERNEURONES GABAÉRIQUES	30
FIGURE 17. MÉCANISME D'ACTIVATION DU RECEPTEUR GABA _B	32
FIGURE 18. STRUCTURE DU RECEPTEUR GABA _A	33
FIGURE 19. LOCALISATION DES RECEPTEURS GABA _A	34
FIGURE 20. DISTRIBUTION DIFFÉRENTIELLE DES SOUS-UNITÉS DES RECEPTEURS GABA _A	34
FIGURE 21. RÉGULATION DYNAMIQUE DE LA SYNAPSE GABAÉRIQUE PAR DIFFUSION LATÉRALE DES RECEPTEURS ..	37
FIGURE 22. RECYCLAGE OU DÉGRADATION DES RECEPTEURS GABA _A ?	38
FIGURE 23. SIGNALISATION CELLULAIRE DU CHLORE	40
FIGURE 24. SÉQUENCE MATURATIVE DU GABA PAR L'EXPRESSION PRÉCOCE DE NKCC1 ET TARDIVE DE KCC2	41
FIGURE 25. CONTRÔLE DE L'ACTIVITÉ DE KCC2 PAR DIFFÉRENTES VOIES DE SIGNALISATION	42
FIGURE 26. ACTIONS SYNERGIQUES DES RECEPTEURS GABA _A ET NMDA PENDANT LE DÉVELOPPEMENT	43
FIGURE 27. PROFIL D'ÉVOLUTION DE L'ELT	48
FIGURE 28. SCHEMA DE L'ANATOMIE CELLULAIRE DE L'HIPPOCAMPE EN CONDITION CONTRÔLE ET ÉPILEPTIQUE	50
FIGURE 29. DÉFAUT D'ADRESSAGE DES GABA _A RS DANS L'ÉPILEPSIE	53
FIGURE 30. SWITCH DE LA RÉPONSE GABAÉRIQUE DANS L'ÉPILEPSIE	54
FIGURE 31. NIVEAU D'EXPRESSION DU PROBDNF, MBDNF ET p75 ^{NTR} APRÈS CRISE	55
FIGURE 32. MODÈLE PILOCARPINE SUR LES RATS CR-PROBDNF	145
FIGURE 33. RÉSUMÉ DE NOTRE ÉTUDE SUR LA PLASTICITÉ INDUITE PAR LA VOIE PROBDNF/p75 ^{NTR} APRÈS SE	148
FIGURE 34. RÉSULTATS DES TESTS COMPORTEMENTAUX DES RATS CR-PROBDNF	150
FIGURE 35. SÉQUENCE DÉVELOPPEMENTALE DE L'EXPRESSION DE PROBDNF, p75 ^{NTR} , MBDNF ET TrkB	152
FIGURE 36. CONTRÔLE DE LA SÉQUENCE MATURATIVE DU GABA PAR LE RATIO PROBDNF/MBDNF	153

Introduction

1. Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF)

1.1. Généralités

1.1.1. Les neurotrophines

La diversité cellulaire du système nerveux trouve son origine dans l'action de différents processus de différenciation, de maturation et de migration cellulaire, ainsi que dans la synaptogenèse. L'ensemble de ces processus sont possibles en partie grâce à des facteurs neurotrophiques, c'est-à-dire grâce à des protéines qui contrôlent la survie et la fonctionnalité de populations spécifiques de neurones. Ces facteurs neurotrophiques sont groupés dans la superfamille des neurotrophines.

En 1953, travaillant sur un sarcome de souris transplantée à proximité des ganglions de la moelle épinière d'un poulet en développement *in ovo*, R. Levi-Montalcini et V. Hamburger ont découvert la sécrétion d'un facteur soluble favorisant la survie et le développement des fibres neuronales sympathiques. Par la suite, des études *in vitro* réalisées par Stanley Cohen ont permis d'isoler ce facteur qui était d'un poids moléculaire relativement faible et de l'identifier comme un facteur de croissance des nerfs, le « Nerve Growth Factor » ou NGF. Cette découverte a alors ouvert un nouveau champ de recherche en neuroscience consacré à l'identification et à la description des facteurs dits neurotrophiques. Deux décennies après l'identification du NGF, un autre facteur neurotrophique fut isolé, le « Brain Derived Neurotrophic Factor » ou BDNF. Il fut initialement purifié à partir de cerveau de cochon, d'où son nom, et trouvé à une faible concentration puisque 1,5 kg de tissu cérébral était requis pour purifier 1 µg de BDNF (Barde et al., 1982). Similairement aux autres facteurs de croissance, le BDNF participe à la survie et à la différenciation de certaines populations neuronales. Depuis, 4 autres membres de la famille des neurotrophines ont été identifiés : NT3, NT4/5, NT6 et NT7. Ces 2 derniers ne sont pas exprimés chez les mammifères mais uniquement chez les poissons (Figure 1). Des études phylogéniques ont montré que deux duplications successives ont conduit à la

formation du NGF, NT3, BDNF et NT4/5. Une première duplication d'un gène ancestral des neurotrophines a donné deux gènes ancestraux intermédiaires qui ont eux-mêmes été dupliqués pour former respectivement d'un côté NGF, NT3 et de l'autre BDNF, NT4/5. Ces duplications ont eu lieu avant la scission des poissons cartilagineux. Une duplication additionnelle apparue chez les poissons osseux pour donner NT-6 et NT-7 (Figure 1) (Hallböök, 1999).

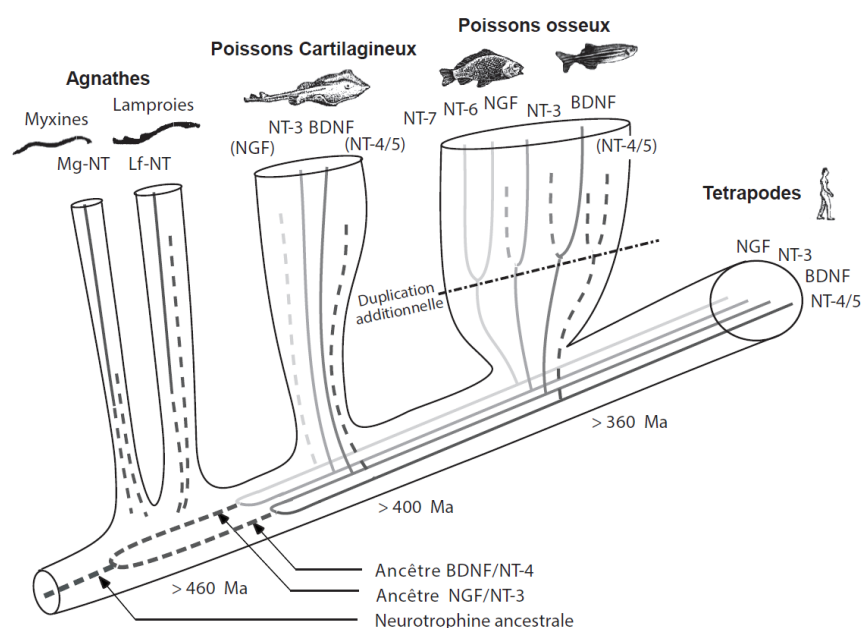


Figure 1. Evolution des Neurotrophines

Illustration schématique des relations phylogénétiques entre espèces montrant les différentes duplications génétiques des gènes codant pour les neurotrophines, d'après Hallböök, 1999.

1.2. Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF)

Le BDNF, découvert en 1982 par Barde (Barde et al., 1982), est la neurotrophine qui est la plus conservée parmi les différentes espèces (Hofer et al., 1990; Rosenthal et al., 1991) et la plus exprimée dans le cerveau de mammifère en développement et chez l'adulte. De nombreuses études ont également montré son implication dans différents mécanismes de plasticité synaptique (Gottmann et al., 2009). Pour ces raisons, la suite de cette introduction sera focalisée sur le BDNF.

1.2.1. Distribution

Différents patterns d'expression de l'ARNm codant pour le BDNF ont été décrits dans les régions du cerveau au cours du développement post-natal, suggérant un gradient caudo-rostral dans l'expression du BDNF pendant le développement du cerveau ; ceci peut être mis en parallèle avec le développement du cerveau, lui aussi caudo-rostral, et suggère l'implication du gène du BDNF dans la prolifération et la différenciation neuronale. Chez l'adulte, le BDNF est particulièrement exprimé dans différentes zones du cerveau antérieur, en particulier l'hippocampe, l'amygdale et différentes zones du cortex. On le trouve aussi dans le clastrum, le noyau endopiriforme ou le cervelet (Ernfors et al., 1990; Wetmore et al., 1990). En outre, chez l'homme adulte, le BDNF a aussi été caractérisé en dehors du Système Nerveux Central (SNC) dans le cœur, les poumons et les muscles squelettiques (Hofer et al., 1990), les reins, la glande submaxillaire, les ovaires (Ernfors et al., 1990), la rétine (Scarisbrick et al., 1993) et les plaquettes (Leibrock et al., 1989). Finalement, chez le rat, on le trouve aussi au niveau de l'aorte (Scarisbrick et al., 1993). Son expression chez le rongeur augmente fortement après la naissance et ceci jusqu'à l'âge de 30 jours. Au-delà, les concentrations se stabilisent, continuent à augmenter ou diminuent selon la structure considérée (Figure 2).

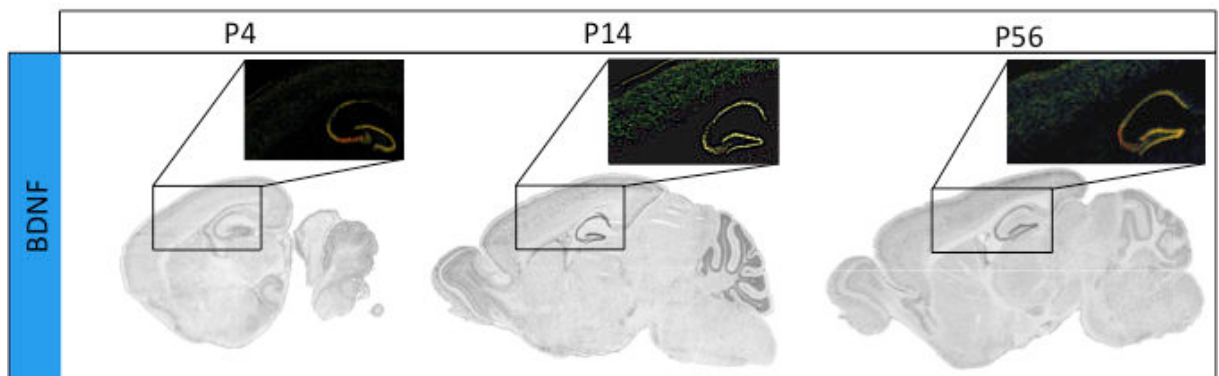


Figure 2. Expression du BDNF

Coupe sagittale de souris pendant le développement post-natal avec hybridation in situ et niveau d'expression de BDNF, d'après l'institut Allen Brain Atlas.

1.2.2. Transcrit

Le gène *BDNF* a été cartographié sur le chromosome 11 chez l'humain, sur le chromosome 2 chez la souris et sur le chromosome 3 chez le rat (Ozçelik et al., 1991). Tous les gènes codant pour les neurotrophines ont une structure fondamentalement similaire mais, parmi toutes ces neurotrophines découvertes, la structure génomique du *BDNF* reste la plus complexe. Malgré le fait que la régulation de l'expression du *BDNF* rongeur et humain ait reçu une attention particulière au cours de la dernière décennie, la connaissance de l'organisation structurelle et de la régulation du gène *BDNF* n'a été bien caractérisée que récemment (Liu et al., 2005). Le gène rongeur du *BDNF* est composé d'au moins huit exons 5' non traduit et un exon 3' codant pour la protéine, et différents isoformes du transcrit sont exprimés par épissage des exons non codants et de l'exon codant (Figure 3) (Mallei et al., 2015). La structure complexe du gène *BDNF* permet une modulation des transcrits selon les différentes localisations cellulaires, dans des régions spécifiques du cerveau, et en réponse à des stimuli distincts (Baj et al., 2013; Musazzi et al., 2014). Il a été précédemment montré que les variants de l'ARNm du *BDNF* présentent une expression région spécifique en réponse à l'activation neuronale dans les trois compartiments subcellulaires: le soma (variants *BDNF* 1, 3, 5, 7, 8, 9a), l'extrémité proximale (*BDNF* 4) ou les dendrites distales (*BDNF* 2, 6), comportant ainsi comme un codage spatial (Baj et al., 2013; 2011). L'expression du *BDNF* peut également être modifiée par des modifications génétiques et épigénétiques, et y compris par des modifications post-traductionnelles.

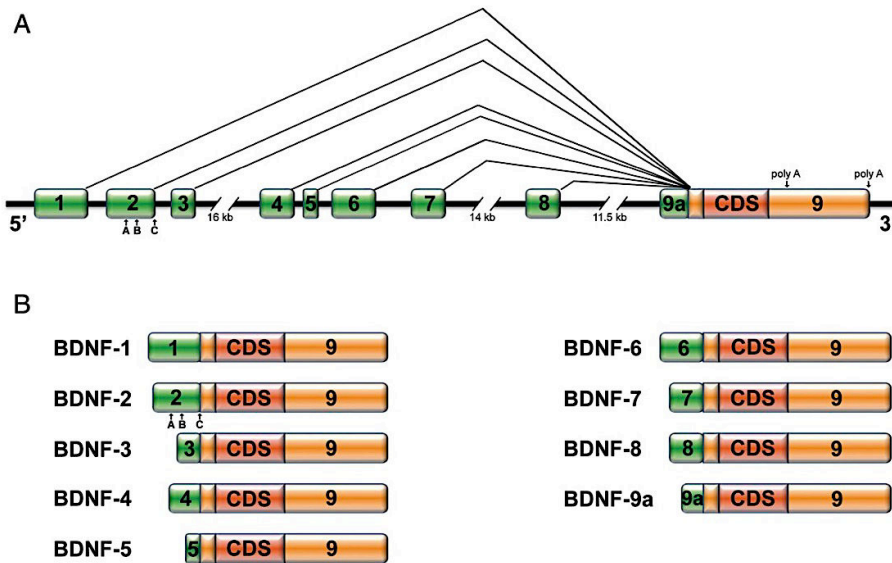


Figure 3. Représentation schématique de l'épissage alternatif et de la transcription du gène BDNF de la souris

(A). gène et sites d'épissage. (B). Composition en exon des différents transcrits du BDNF, d'après Mallei, 2015. CDS, séquence codante.

1.2.3. Protéine BDNF

1.2.3.1. Synthèse

La protéine BDNF, qui partage avec les autres membres de la famille des neurotrophines de nombreuses caractéristiques structurales, est d'abord synthétisée sous forme de précurseurs, les pré-proneurotrophines (240-260 acides aminés).

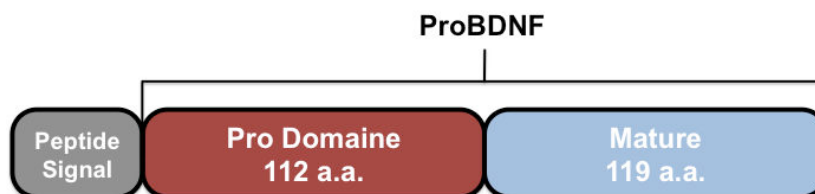


Figure 4. Le préproBDNF

Composition de la préproneurotrophine : un peptide signal, un prodomaine de 112 acides aminés et un domaine mature de 119 acides aminés

La pré-proneurotrophine va ensuite être clivée afin de donner un peptide signal et la proneurotrophine. Cette forme immature du BDNF, d'environ 32 kDa (ProBDNF), est composée d'un pro-domaine et de la région mature, formées

respectivement de 112 et 119 acides aminés (Figure 4). Cette proneurotrophine doit être clivée afin d'obtenir une protéine homodimérique mature.

1.2.3.2. Adressage

Le BDNF est exprimé en préproneurotrophine qui est immédiatement clivée en proneurotrophine dans le réticulum endoplasmique (RE). Cette proneurotrophine va ensuite subir différentes modifications post-traductionnelles sur son trajet dans le réseau trans-golgien (TGN), avant de se retrouver dans les granules ou vésicules de sécrétions. Il existe au moins deux voies de sécrétion distinctes partant du TGN, l'une constitutive et l'autre régulée. La voie constitutive, présente dans tous les types cellulaires, est constituée de petites vésicules qui vont être transportées jusqu'à la membrane de la cellule sans mécanisme d'induction. Au contraire de la voie régulée, présente uniquement dans les cellules excitables et constituée de grosses vésicules à cœur dense qui vont fusionner avec la membrane de façon calcium-dépendante. L'adressage du proBDNF dans la voie de sécrétion constitutive ou régulée est déterminé alors par des séquences spécifiques présentes sur la protéine (Figure 5). A cet effet, il a été montré l'importance particulière du pro-domaine, puisque l'adressage du BDNF dépend d'un polymorphisme val66met dans le pro-domaine. Le val-BDNF emprunte la voie régulée tandis que le met-BDNF (présent chez 40% des humains) ne peut pas être libéré de façon activité-dépendante et emprunte uniquement la voie constitutive. Un récepteur d'adressage résidant du Golgi, la sortiline, interagit avec le pro-domaine pour orienter le BDNF vers la voie de sécrétion régulée. Il a d'ailleurs été montré que l'expression d'un dominant négatif de la sortiline entraînait une augmentation de l'adressage du proBDNF dans la voie constitutive (Z.-Y. Chen et al., 2005b). Une séquence additionnelle d'information, présente dans la portion mature et constituant un site de reconnaissance pour la carboxypeptidase E (CPE), semble agir de concert avec les informations d'adressage du pro-domaine. De plus, il a été montré que la délétion du gène CPE entraînait la perte de sécrétion du BDNF par la voie régulée dans les neurones hippocampiques et corticaux. Par conséquent, le domaine mature du BDNF contient également un motif essentiel pour l'adressage vers la voie de sécrétion activité-dépendante (Lou et al., 2005). De plus, la CPE est impliquée dans le transport des vésicules de BDNF le long des microtubules. En effet, la queue

cytoplasmique de la CPE interagit avec le système d'ancrage vésiculaire des microtubules, permettant ainsi un transport plus efficace des vésicules BDNF (B. Lu et al., 2005; J. J. Park et al., 2008).

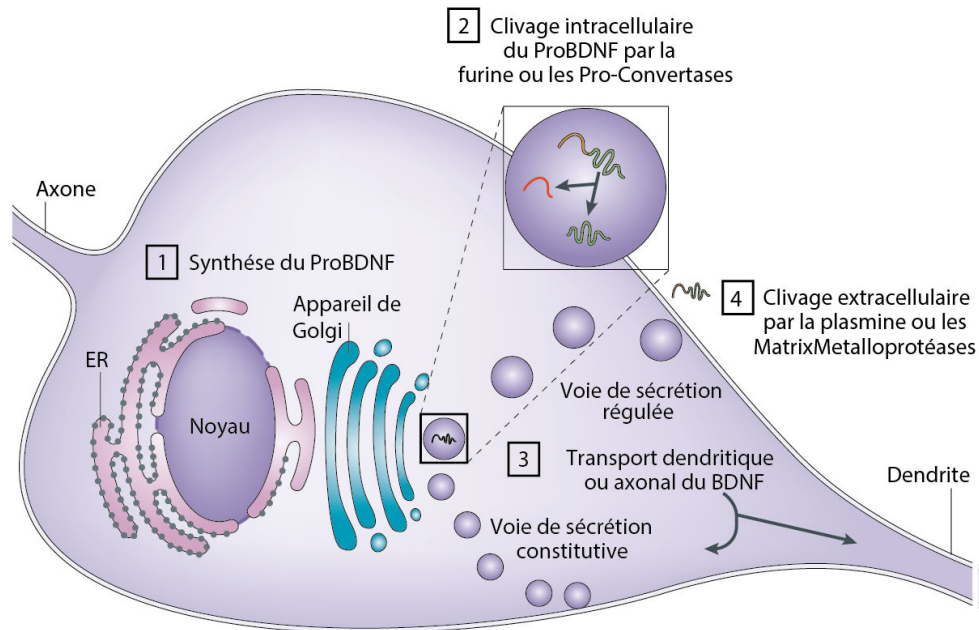


Figure 5. Synthèse et mode de sécrétion du BDNF dans le neurone

(1), Synthèse du proBDNF dans le réticulum endoplasmique, (2), Clivage possible du proBDNF par les endoprotéases, (3) Choix de passage dans les vésicules de sécrétion de la voie constitutive ou régulée. (4) Libération du BDNF dans le milieu extracellulaire et clivage du proBDNF possible par des MMP (MatrixMétalloProtéases), d'après Lu et al, 2005.

1.2.3.3. Maturation

La maturation du BDNF se fait en deux étapes. La première consiste en la glycosylation au niveau de son pro-domaine, qui est important pour la sortie du RE et l'évitement de la voie de dégradation intracellulaire. Les oligosaccharides ainsi générés vont ensuite être sulfatés. La deuxième étape est le clivage du pro-domaine qui va alors donner le BDNF mature. Ce clivage peut-être intracellulaire et commencer dans le réseau trans-golgien où le pro-domaine est clivé par les pro-convertases (PC) et la furine. L'activité de ces sérine-protéases 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. Cependant, il est important de noter que le clivage de la forme immature, le proBDNF, est dépendant du répertoire de convertases présent au sein

de la cellule, et bien que les PC et la furine puissent potentiellement cliver le proBDNF, aucunes d'elles ne sont vraiment efficaces, laissant une grande partie du proBDNF intracellulaire non clivé (Farhadi et al., 2000; Mowla et al., 1999). Contrairement à ce qui a pu être pensé, ce clivage n'est pas un prérequis à la sécrétion puisque le clivage du proBDNF peut également se faire dans le milieu extracellulaire, par différentes protéases. Plusieurs matrix metalloprotéases (MMP), telles que MMP3 et MMP7, permettent le clivage du proBDNF. Le zinc présent dans le milieu extracellulaire peut réguler l'activation des MMP et permettre la conversion du pro- en mature BDNF (Hwang et al., 2005). Cependant, une autre protéase clive le proBDNF dans le milieu extracellulaire, la plasmine sérine protéase (Pang et al., 2004).

1.2.4. Sécrétion

Dans le cerveau, ce sont principalement les neurones glutamatergiques, les cellules pyramidales et granulaires, et les cellules microgliales activées qui expriment du BDNF (Lessmann and Brigadski, 2009). Comme le BDNF est également impliqué dans la régulation de la plasticité synaptique, un processus qui doit être très limité dans le temps et l'espace, les mécanismes de sécrétion du BDNF sont des facteurs très importants. Ainsi, la localisation subcellulaire précise de libération du BDNF dans les compartiments pré- et post-synaptiques et le type de libération sont des points clés dans la compréhension des mécanismes et modes d'actions de cette neurotrophine dans la plasticité.

1.2.4.1. *Transport subcellulaire et site de libération*

En raison de l'importance du BDNF endogène, les questions sur sa localisation subcellulaire dans les processus neuronaux et sur son expression préférentiellement dendritique ou axonale sont largement étudiées.

En premier lieu, il a été démontré un transport axonal rétrograde concernant l'endocytose du BDNF extracellulaire. Ce phénomène a été largement impliqué, dans la survie et la croissance axonale des neurones sympathiques, au cours du développement *in utéro*. Les cellules non-neurales (peau, muscles, glandes) sécrètent du BDNF en faible quantité. Celui-ci se fixe sur ses récepteurs portés par les terminaisons sympathiques. Le complexe récepteur-BDNF est ensuite

internalisé et les vésicules d'endocytose sont transportées de l'axone jusqu'au soma. Ce complexe va alors induire l'activation de différentes cascades de signalisation cellulaire, qui peuvent elles-mêmes déclencher la transcription de gènes impliqués dans la survie neuronale (Lessmann et al., 2003).

Cependant, il existe également un transport axonal antérograde du BDNF. Ce dernier est synthétisé par la cellule innervante puis transporté, via l'axone, au niveau de la synapse où il pourra agir de façon autocrine ou paracrine sur la cellule cible (Figure 6). Ce transport est retrouvé dans les projections des neurones corticaux vers le striatum et dans les projections des fibres moussues du gyrus denté vers CA3 (Danzon and McNamara, 2004; Smith et al., 1997). Fait intéressant, ces deux groupes de neurones de projection sont connus pour contenir la plus forte concentration de BDNF dans le cerveau. Le BDNF est également très abondant dans les terminaisons axonales des cellules granulaires du cervelet en contact avec les cellules de Purkinje (Sadakata et al., 2004).

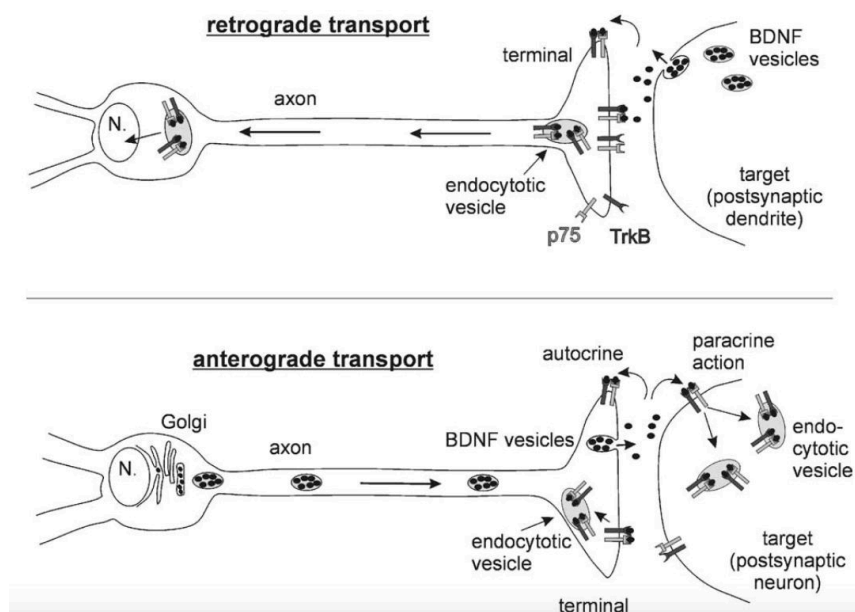


Figure 6. Transport axonal rétrograde et antérograde du BDNF

En haut, le BDNF est sécrété par le tissu innervé et ensuite endocyté par la terminaison axonale. Suivant un transport rétrograde, les vésicules d'endocytose contenant le BDNF vont alors activer des voies de signalisation au niveau de la terminaison mais également dans le compartiment somatique de la cellule. En bas, les vésicules contenant le BDNF, synthétisé par les neurones, peuvent être transportées du soma à la terminaison axonale suivant un transport antérograde. Suite à la libération pré-synaptique, le BDNF va agir de façon autocrine ou paracrine selon le site d'expression de ses récepteur TrkB et p75^{NTR}, d'après Lessmann et al, 2003.

Il existe également une expression de BDNF endogène au niveau somato-dendritique, qui a été rapporté dans les neurones CA1 de l'hippocampe et les neurones pyramidaux corticaux, mais à des niveaux relativement plus faibles (Adachi et al., 2005; Matsuda et al., 2009). Cependant, cette conclusion sur la localisation du BDNF dans les dendrites reste encore débattu car, pour visualiser cette expression, les expériences ont été faites avec des neurones en culture transfectés avec un BDNF fusionné à un tag (Dieni et al., 2012). Cette différence de localisation subcellulaire est sous-tendue par un niveau d'expression différent de BDNF selon la région cérébrale. L'hypothèse actuelle, suggérée par le docteur Lessmann en 2009, est qu'un faible niveau d'expression de BDNF entraîne un transport préférentiellement dendritique, tandis qu'un haut niveau d'expression implique un transport axonal en supplément (Figure 7) (Lessmann and Brigadski, 2009).

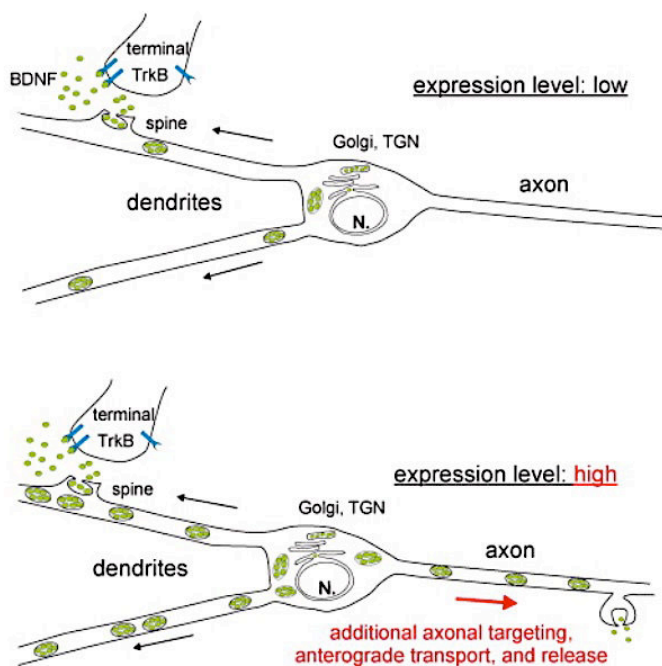


Figure 7. Sécrétion dendritique et axonale du BDNF

L'hypothèse actuelle est que la libération du BDNF contenu dans les vésicules de sécrétion peut dépendre du niveau d'expression du BDNF lui-même. Un niveau faible d'expression entrainera une libération exclusivement dendritique tandis qu'un niveau élevé favorisera une libération axonale en supplément, d'après Lessmann et al, 2003.

1.2.4.2. Libération activité dépendante

La sécrétion dendritique et axonale du BDNF nécessite la genèse de potentiels d'action (PA) ainsi qu'une augmentation relativement importante et prolongée de la concentration en calcium intracellulaire (Kuczewski et al., 2010). Plusieurs signaux synaptiques menant à une libération activité dépendante de BDNF ont été directement identifiés : (i) La stimulation à haute fréquence des fibres glutamatergiques présynaptiques et l'activation sous-jacente des récepteurs ionotropiques glutamatergiques, (ii) une dépolarisation membranaire prolongée, (iii) la rétropropagation des PA dans les dendrites, (iiii) et l'activation des récepteurs métabotropiques GABA et glutamate. Tous ces différents signaux, permettant la libération du BDNF, vont déclencher une élévation intracellulaire de Ca^{2+} . Cette augmentation de calcium peut résulter de l'activation des récepteurs NMDA ainsi que les canaux calciques voltage-dépendants (VDCCs), elle-même induite par la dépolarisation membranaire engendrée par l'activation des mGluRs et des AMPARs post-synaptiques. Les mGluRs vont alors activer la phospholipase C (PLC), qui va elle-même activer l'inositol triphosphate (IP3), et permettre la libération de calcium à partir des réserves intracellulaires. Cette hausse de calcium intracellulaire peut encore être amplifiée par l'activation d'un autre récepteur situé sur le réticulum endoplasmique, les récepteurs ryadonine qui vont maintenir des niveaux élevés de calcium. Le Calcium va ensuite activer la CaMKII qui va induire la fusion des vésicules de sécrétion avec la membrane post-synaptique.

Au niveau des synapses GABAergiques, les récepteurs GABA_A , via l'activation des VDCCs, et les récepteurs GABA_B , via l'activation de la PLC et de la phosphoskinase C, permettent également l'augmentation de calcium entraînant la libération de BDNF. La sécrétion peut par contre être inhibée par la synaptotagmine IV, une protéine de transport membranaire. Le niveau d'activité de la protéine kinase A (PKA) est également important pour la libération de BDNF en raison de son implication dans l'ancrage des vésicules de sécrétion au niveau des sites de libération (Figure 8).

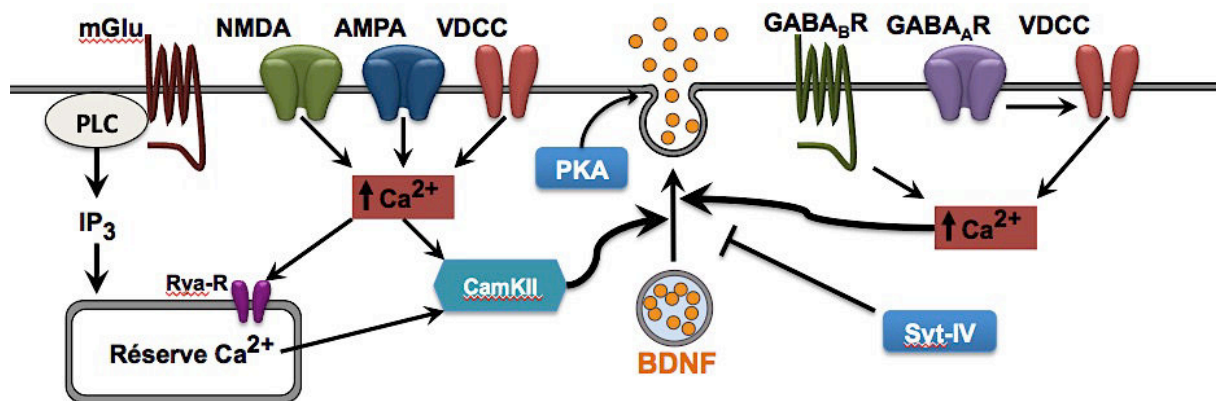


Figure 8. Mécanismes déclencheurs de la libération synaptique du BDNF

La sécrétion du BDNF requiert une augmentation intracellulaire de calcium. Cette augmentation résulte d'une entrée de calcium par les canaux calciques voltages dépendants (VDCCs) ou des récepteurs NMDA suite à une dépolarisation membranaire, ou à partir des réserves intracellulaires de calcium. L'augmentation initiale de calcium peut être amplifiée par la suite, via différents mécanismes. La libération post-synaptique est inhibée par la synaptotagmine IV, d'après Kuczewski et al, 2010.

1.2.5. Les récepteurs du BDNF

Le BDNF interagit avec deux catégories distinctes de récepteurs: le récepteur à activité tyrosine-kinase TrkB et le récepteur p75 des neurotrophines (p75^{NTR}). Le récepteur TrkB présente une grande affinité avec son ligand, le mBDNF et une plus faible avec la forme immature, le proBDNF. A l'inverse, le récepteur p75^{NTR} a une faible affinité pour toutes les neurotrophines matures, mais se lie au proneurotrophines avec une forte affinité.

1.2.5.1. Le récepteur TrkB

Le récepteur TrkB est présent dans plusieurs régions du cerveau incluant le cortex, l'hippocampe, le striatum, la substance noire, les cellules de Purkinje du cervelet et également dans le système périphérique (Figure 9) (Altar et al., 1994).

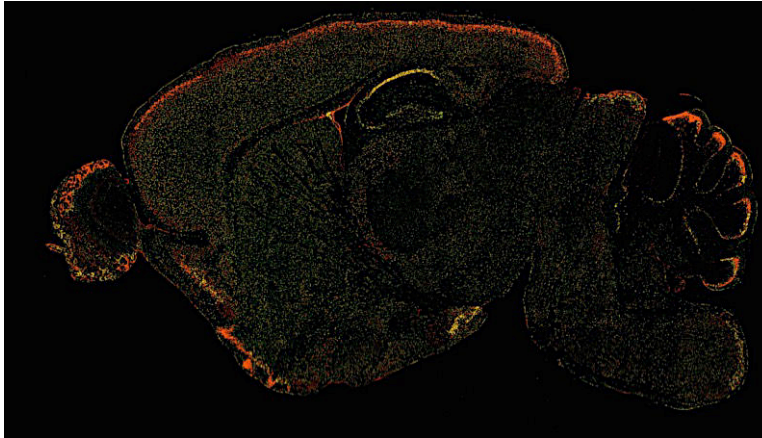


Figure 9. Expression du récepteur TrkB dans le cerveau

Coupe sagittale de souris à P14 avec immunohistochimie de TrkB, d'après l'institut Allen Brain Atlas.

Localisation. Au niveau cellulaire, la localisation du TrkB a été étudiée dans la formation hippocampique et le cortex. Dans la formation hippocampique, le récepteur est présent dans les neurones pyramidaux glutamatergiques, dans les cellules granulaires du gyrus denté. Dans le cortex, TrkB est présent dans les dendrites des neurones pyramidaux. Une étude sur le développement des neurones corticaux a montré que TrkB colocalise avec les vésicules synaptiques et les récepteurs NMDA avant la formation des synapses. Au cours de la formation synaptique, TrkB s'accumule au niveau des épines dendritiques et des cônes de croissance axonales (Gomes et al., 2006). Il a notamment été démontré, dans les neurones du cortex visuel, que TrkB était associé avec PSD-95, un composant majeur des protéines post-synaptiques (Yoshii and Constantine-Paton, 2007). TrkB est également présent dans le segment initial des axones des interneurones, dans certaines terminaisons axonales formant des synapses inhibitrices au niveau du soma et de l'arbre dendritique et dans les terminaisons axonales de type excitatrice d'origine extra-hippocampiques (Drake et al., 1999). La localisation des récepteurs TrkB à proximité des sites synaptiques suggère qu'il est idéalement placé pour réguler à la fois les compartiments pré- et post-synaptiques des synapses excitatrices et inhibitrices.

Cascades de signalisation. Suite à la liaison avec son ligand BDNF, le récepteur TrkB forme un dimère avec un autre récepteur. Les deux récepteurs dimérisés autophosphorylent alors leur domaine à activité tyrosine-kinase (Cunningham and Greene, 1998), permettant ainsi le recrutement de protéines

adaptatrices et l'activation des cascades de signalisation intracellulaire. Il existe trois principales voies de signalisation activées par le récepteur TrkB : (i) la voie ras/MEK/ERK qui va promouvoir la croissance et la différenciation neuronale (Reichardt, 2006), (ii) la voie Gab1/Pi3k/Akt qui active la prolifération et la survie neuronale (Yamada et al., 1997), (iii) et la voie PLC/PKC qui va intervenir dans la neurotransmission et la plasticité synaptique (Gärtner et al., 2006; Minichiello, 2009). Chacune de ces voies va également réguler la transcription des gènes en agissant par différents intermédiaires sur le facteur de transcription CREB (Figure 10). Les récepteurs TrkB peuvent également activer les canaux TRPCs (transient receptor potential canonical) via la PLC (Amaral and Pozzo-Miller, 2007). Ils pourraient également activer un canal sodique (Nav1.9) et induire ainsi une dépolarisation et une entrée de calcium (Blum et al., 2002).

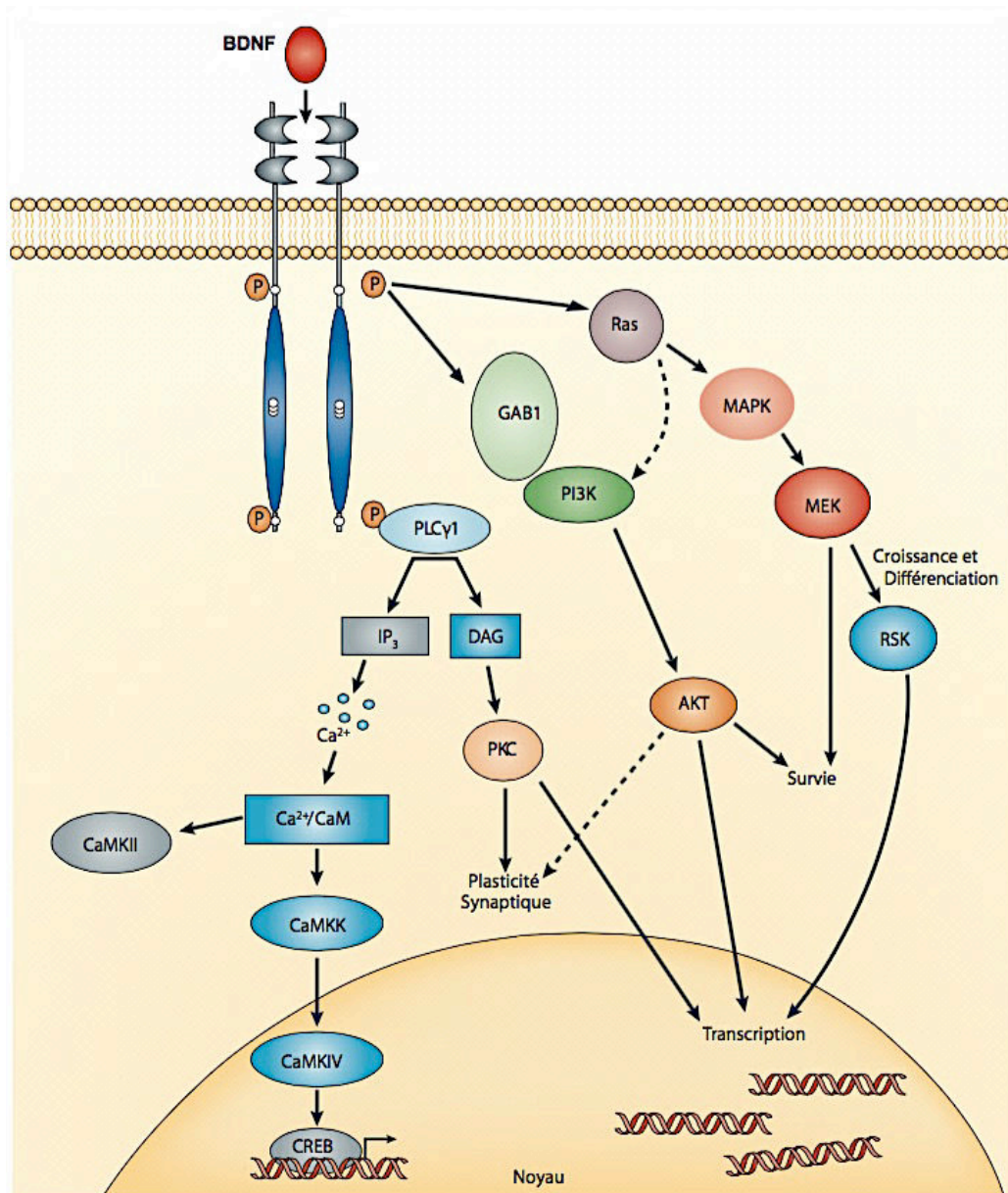


Figure 10. Principales voies de signalisation activées par le récepteur TrkB

L'interaction entre le récepteur et BDNF active trois principales voies de signalisation. La phosphorylation de TrkB va activer la voie ras/MAPK/Erk qui va induire des mécanismes de croissance, de différenciation et de survie. La voie Pi3k/Akt qui va participer également à la survie et aussi à la régulation transcriptionnelle de gènes importants. La voie PLC qui va être impliquée dans la plasticité synaptique et l'activation du facteur de transcription CREB, d'après Minichiello, 2009.

1.2.5.2. *Le récepteur p75^{NTR}*

Le p75^{NTR} est le membre fondateur de la superfamille des récepteurs aux facteurs de nécrose tumorale (TNF) et a d'abord été identifié comme un récepteur de faible affinité au NGF, le NGFR (Johnson et al., 1986). Après la découverte des autres membres de la famille des neurotrophines, il a finalement été montré que NGFR avait la même affinité pour toutes les neurotrophines et fut renommé p75^{NTR} pour récepteur aux neurotrophines (Rodriguez-Tébar et al., 1990).

Le p75^{NTR} est fortement exprimé dans de nombreuses régions du système nerveux au cours du développement mais est quasi inexistant dans le tissu adulte à l'exception des neurones cholinergiques dans l'hippocampe et des neurones granulaires du cervelet. En outre, p75^{NTR} peut-être ré-exprimé après plusieurs types de traumatismes cérébraux dans les neurones corticaux, le striatum, le cortex entorhinal, les cellules de Purkinje et la moelle épinière (Ernfors et al., 1989; Kokaia et al., 1998; Martínez-Murillo et al., 1998; J. A. Park et al., 2000; Roux et al., 1999).

Le p75^{NTR} est une protéine largement conservée entre les différentes espèces des vertébrés. C'est un récepteur transmembranaire de type I de 399 acides aminés répartis en un domaine extracellulaire (222 aa), transmembranaire (19 aa) et intracellulaire (158 aa). Le domaine extracellulaire est constitué de 4 domaines riches en cystéines (DRC), ce qui lui vaut d'appartenir à la superfamille des récepteurs du TNF. Chacun de ces DRC, numérotés de 1 à 4 à partir de l'extrémité N-terminale, contient 3 ponts-disulfures conférant au récepteur sa conformation tridimensionnelle et permettant la liaison des ligands. Le domaine transmembranaire joue un rôle important dans la dimérisation du récepteur et dans le changement de conformation induit par la liaison du ligand et la transduction du signal (Vilar et al., 2009). Contrairement aux récepteurs Trk, le récepteur p75^{NTR} ne possède pas d'activité enzymatique intrinsèque. La liaison entre p75^{NTR} et ses ligands permet le recrutement de plusieurs protéines adaptatrices qui peuvent se fixer sur différentes régions. Le récepteur possède un domaine de mort cellulaire, un domaine Chopper et, situé à l'extrémité C-terminale, une séquence de liaison aux protéines à domaines PDZ (Post-synaptic Disc-large Zona) (Figure 11). Ces protéines permettent l'assemblage de complexes protéiques servant de plateforme

de signalisation pour l'activation de différentes voies (Gallardo et al., 2010; Hung and Sheng, 2002). Le domaine intracellulaire est également sujet à des modifications post-traductionnelles telles que diverses phosphorylations qui sont impliquées dans le recrutement de multiples partenaires protéiques.

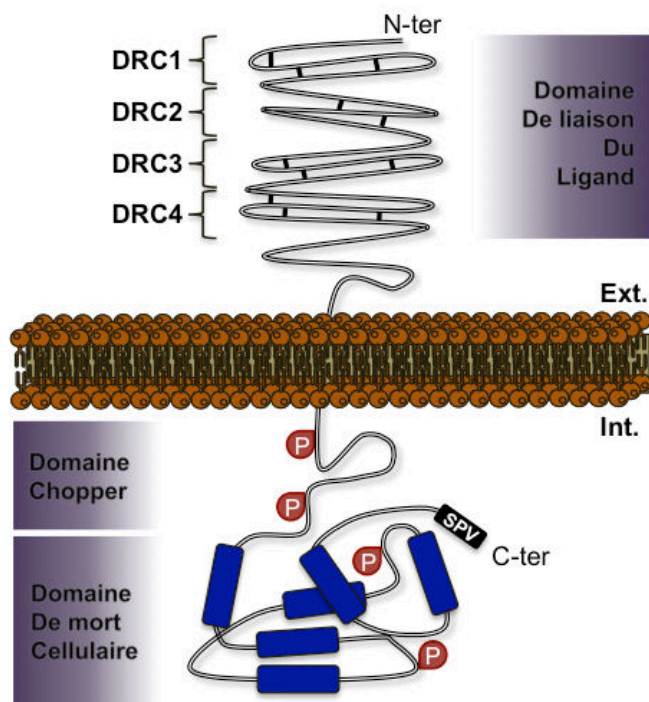


Figure 11. Représentation schématique du récepteur p75^{NTR}

Le récepteur p75^{NTR} est constitué d'un domaine extracellulaire comprenant 4 régions riches en cystéines (CRD1-4) permettant la liaison du ligand, d'un domaine transmembranaire unique contenant une cystéine conservée impliquée dans la dimérisation du récepteur et enfin d'un domaine intracellulaire comprenant un domaine Chopper juxta-membranaire, un domaine de mort formé de 6 hélices α et un tripeptide SPV en C-terminal permettant la liaison de protéines à domaine PDZ. Ce récepteur présente également plusieurs modifications post-traductionnelles telles que des N- et O- glycosylations, une palmitoylation permettant l'ancrage à la membrane ainsi que plusieurs phosphorylations impliquées dans le recrutement de partenaires protéiques et dans la transduction du signal, d'après Roux et Barker, 2002.

Le p75^{NTR} régule 3 principales voies de signalisation : l'activation de NF- κ B induisant la transcription de plusieurs gènes permettant la survie neuronale, l'activation de la kinase Jun qui contrôle l'expression de gènes pro-apoptotiques et l'activation des protéines Rho qui contrôlent la mobilité du cône de croissance. Cependant, l'activation de ce récepteur et la liste des voies de signalisation recrutées reste encore très incomplète, du fait de la spécificité de ce récepteur à agir comme corécepteur avec différents ligands (Barker, 2004; K. K. Teng and Hempstead, 2004). Le p75^{NTR} peut interagir sur les récepteurs Trk pour

améliorer l'affinité et la spécificité de liaison avec les neurotrophines matures (Chao, 2003), avec NogoR et Lingo1 pour réguler la croissance axonale (Mi et al., 2004; K. C. Wang et al., 2002) et avec la sortiline ou SorCS2 (Sortilin-related VPS10 domain containing receptor 2) pour déclencher la mort cellulaire et la rétraction des cônes de croissance induites par les pro-neurotrophines (Figure 12) (Deinhardt et al., 2011; Westergaard et al., 2004).

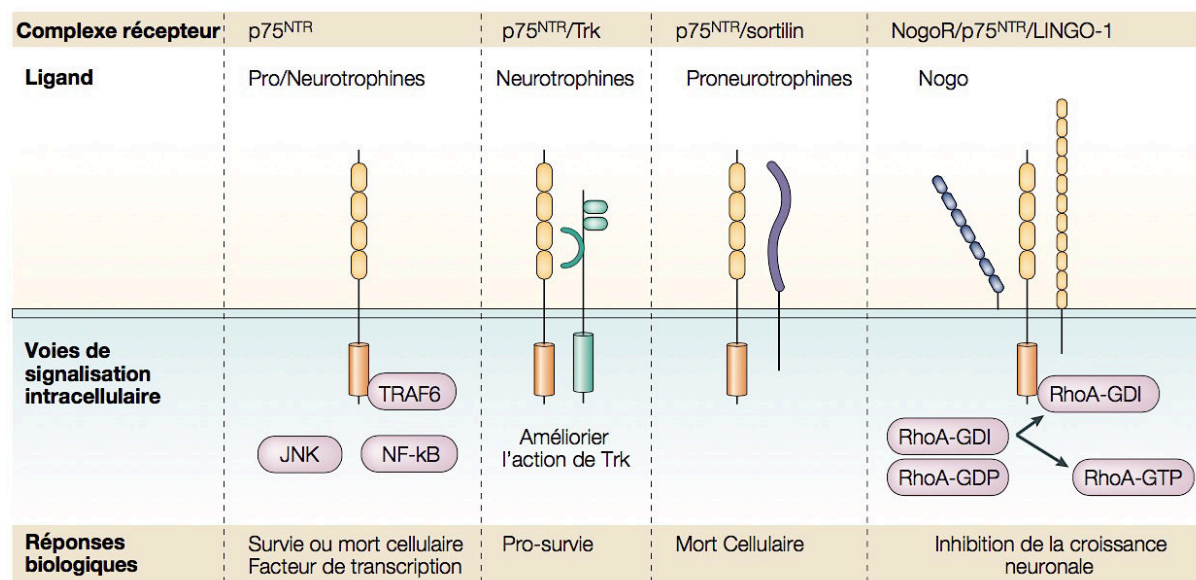


Figure 12. Représentation schématique des voies de signalisation de p75^{NTR}

La fixation des ligands à p75^{NTR} entraîne le recrutement de protéines adaptatrices au niveau des domaines intracellulaires du récepteur ou la formation de complexe avec d'autres partenaires protéiques. Cela va initier plusieurs voies de signalisation, et promouvoir des mécanismes tels que l'apoptose, la survie, la transcription et l'inhibition de la croissance neuronale; d'après Lu, 2005.

1.2.6. Ange et démon : mBDNF et proBDNF ?

Le développement des circuits neuronaux implique de nombreuses étapes, dont des mécanismes de survie neuronale, de différenciation, de croissance, de formation et de maturation synaptique et de développement des réseaux neuronaux. BDNF a un rôle essentiel dans la majeure partie de ces étapes. Jusqu'à récemment, on pensait que mBDNF était la seule forme sécrétée et active. Mais des études plus récentes ont montré que le proBDNF était biologiquement actif et pouvait jouer un rôle contraire au mBDNF dans plusieurs processus développementaux.

1.2.6.1. *mBDNF*

Tout d'abord avant la différenciation neuronale, mBDNF peut avoir une fonction très importante dans la régulation de la survie des cellules souches neuronales qui expriment les récepteurs TrkB et p75NTR (Lachyankar et al., 1997). Il a été montré que le traitement avec BDNF sur des cultures de cellules souches neuronales permettait une survie cellulaire plus importante (Benraiss et al., 2001; Shetty and Turner, 1998). Après différenciation, il est admis que mBDNF permet la survie de plusieurs types de neurones dans le SNC, que cet effet passe par la liaison à TrkB et l'activation de voies de signalisation permettant l'expression de gènes qualifiés de pro-survie (Reichardt, 2006). Cependant, cette notion que les neurotrophines en général permettent la survie est basée quasi uniquement sur des expériences sur cultures cellulaires. Des études récentes de *Bdnf*-KO conditionnel ont alors montré que l'absence de BDNF ne causait pas une réduction significative du nombre de cellules neuronales mais une réduction du nombre d'épines et de la complexité dendritique (Rauskolb et al., 2010). Le mBDNF joue également un rôle important dans l'initiation et la polarisation axonale, une diminution de la synthèse de BDNF entraînant une perturbation importante de l'initiation. Le mBDNF via l'activation de TrkB, entraîne une boucle de rétroaction positive qui permet l'augmentation de l'activité de AMPc et PKA, des protéines nécessaires à l'initiation axonale et au maintien de la sécrétion de mBDNF (Cheng et al., 2011). Dans des cultures neuronales, il a été montré qu'un gradient d'expression et une sécrétion locale de mBDNF permettait aussi le guidage des cônes de croissance axonale ainsi que la croissance et la ramification des dendrites (Horch and Katz, 2002; Tucker et al., 2001). Le mBDNF module également la formation et la maturation des synapses excitatrices et inhibitrices en régulant l'expression de différentes protéines synaptiques incluant les enzymes nécessaires à la synthèse des neurotransmetteurs, les protéines des vésicules et les sous-unités des récepteurs post-synaptiques (Vicario-Abejón et al., 2002). L'effet du mBDNF fut ainsi largement étudié sur le circuit GABAergique où il participe à la migration, la différenciation et la croissance dendritique des interneurons GABAergiques (Jin et al., 2003; Polleux et al., 2002; Sakata et al., 2009). Il augmente aussi la densité et/ou la taille des terminaisons synaptiques GABAergiques (Palizvan et al., 2004; Yamada et al.,

2002). Le mBDNF joue un rôle indispensable dans le déclenchement et le maintien de la potentialisation à long-terme (LTP) des synapses glutamatergiques et GABAergiques, définit comme le renforcement durable de l'efficacité de la transmission synaptique (Pang et al., 2004). BDNF est aussi connu pour son rôle dans la vasculogénèse (H. Kim et al., 2004). En conclusion, l'interaction avec son récepteur TrkB confère donc au mBDNF différentes propriétés dans plusieurs étapes importantes du développement. D'un point de vue intégré, la forme mature du BDNF a une fonction essentielle dans les mécanismes impliqués dans l'apprentissage et la mémoire (Y. Lu et al., 2008; Pang et al., 2004), la régulation de l'humeur (Chourbaji et al., 2011; Kozisek et al., 2008), le contrôle du comportement alimentaire (Nakazato et al., 2012), le retard d'apparition des signes cliniques des maladies neurodégénératives (Levivier et al., 1995; Mogi et al., 1999; Phillips et al., 1990) et dans la récupération fonctionnelle post-AVC (Kokaia et al., 1995; Mattson and Wan, 2008). Il a également été montré que le polymorphisme Val66Met, à l'origine d'une diminution de la sécrétion régulée de BDNF (Z.-Y. Chen et al., 2005a; 2004; Egan et al., 2003), entraînait chez les sujets hétérozygotes une baisse de la mémoire épisodique, une diminution de l'activation de l'hippocampe en réponse à une stimulation cognitive (Egan et al., 2003; Hariri et al., 2003) et des récupérations fonctionnelles post-AVC plus longues (W.-S. Kim et al., 2013). De plus, ce polymorphisme est à l'origine d'un risque accru de développement de dépression, de maladies psychiatriques et de maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer et de Parkinson (Boulle et al., 2012; Y. Lee et al., 2013).

1.2.6.2. ProBDNF

Le BDNF existe donc sous deux formes pro et mature. Toutefois, la question de savoir si proBDNF était sécrété et avait une réelle fonction physiologique a été très controversé.

Plusieurs études ont cependant montré que le proBDNF endogène pouvait être sécrété à partir des neurones. Une étude a utilisé des neurones exprimant un BDNF fusionné à un marqueur permettant de détecter la quantité de protéine libérée. Cette approche a permis de montrer que proBDNF et mBDNF sont libérés

après dépolarisation des neurones (Yang et al., 2009) et que le ratio proBDNF/mBDNF libéré dépend du pattern de stimulation : proBDNF est la forme sécrétée prédominante après une stimulation à basse fréquence, tandis que mBDNF est majoritaire après une stimulation à haute fréquence (Nagappan et al., 2009). La première étude, montre également que proBDNF peut avoir un rôle important dans le développement du cerveau, suggérant que l'activation de $p75^{NTR}$ par le proBDNF, lui donne la capacité de déclencher le processus de dépression à long terme (LTD), un phénomène débouchant sur la mise sous silence de la synapse (Pang et al., 2004). Pour déterminer si le proBDNF pouvait altérer l'activité synaptique, l'étude s'est poursuivie en utilisant un proBDNF non clivable (CR-proBDNF) sur des souris sauvages et $p75^{NTR}$ -KO. La perfusion du CR-proBDNF facilitait alors bien l'apparition de la LTD des synapses glutamatergiques chez les souris sauvages mais pas sur les souris $p75^{NTR}$ -KO (Woo et al., 2005). Le proBDNF a récemment été montré comme induisant aussi une LTP ou une LTD en fonction de l'activation ou non des récepteurs NMDA dans les neurones immatures (Langlois et al., 2013). Comme cela a été décrit précédemment (1.2.5.2), l'activation du complexe récepteur $p75^{NTR}$ /sortiline par le proBDNF est à l'origine du déclenchement de processus apoptotiques neuronaux (Barker, 2009; H. K. Teng et al., 2005). En sus de ces effets pro-apoptotiques impliquant $p75^{NTR}$, l'activation de ce récepteur donne au proBDNF la capacité d'exercer des effets rapides sur la morphologie des neurones et, plus spécifiquement, au niveau des jonctions neuromusculaires. Ainsi sécrété par les myocytes, proBDNF induit une rétraction axonale des neurones moteurs et une dépression synaptique (Figure 13) (Je et al., 2012; Yang et al., 2009).

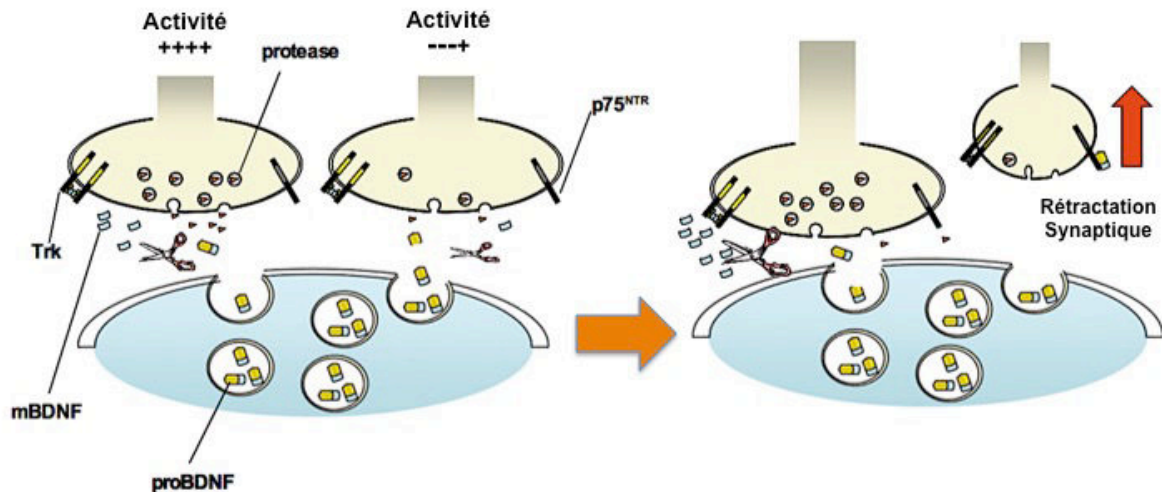


Figure 13. Conversion activité dépendante du proBDNF en mBDNF : un modèle de plasticité synaptique activité dépendante dans l'organisation des jonctions neuromusculaires

Durant le développement neuromusculaire, l'innervation présynaptique contrôle la production et la sécrétion de proBDNF provenant des cellules musculaires postsynaptiques. Une terminaison axonale active va sécréter la quantité de protéase nécessaire au clivage du proBDNF en mBDNF. Ce dernier va induire, via l'activation de TrkB, des voies de signalisation permettant la stabilisation de la synapse. Au contraire, une faible activité au niveau de la terminaison axonale ne va pas permettre le clivage optimal du proBDNF. Ce dernier, via l'activation de p75^{NTR}, va induire une dépression, voire une rétraction de la terminaison synaptique ; d'après Je et al, 2012.

Un effet similaire avec un CR-proBDNF a été observé sur les neurones ganglionnaires de la racine dorsale, où proBDNF empêche la croissance des neurites et des filopodes des cônes de croissance via l'activation du récepteur p75^{NTR} et de la voie de signalisation ROCK/RhoA (Sun et al., 2012). Enfin, il a été prouvé que proBDNF était sécrété par les cellules ganglionnaires de la rétine et qu'il agissait localement via p75^{NTR} sur la guidance axonale (Marler et al., 2010). Récemment, une étude *in vivo* suggère que la stimulation asynchrone des synapses, entraîne une perte de contact entre les synapses et donc de transmission synaptique déclenchée par la voie proBDNF/p75^{NTR}. Ainsi, pendant le développement, l'activité synaptique spontanée va façonner la connectivité neuronale avec une précision subcellulaire à travers un mécanisme de plasticité médié par proBDNF. Il va, via son action sur p75^{NTR}, engendrer une perte de lien si localement une synapse est asynchrone par rapport aux synapses environnantes (Figure 14) (Winnubst et al., 2015).

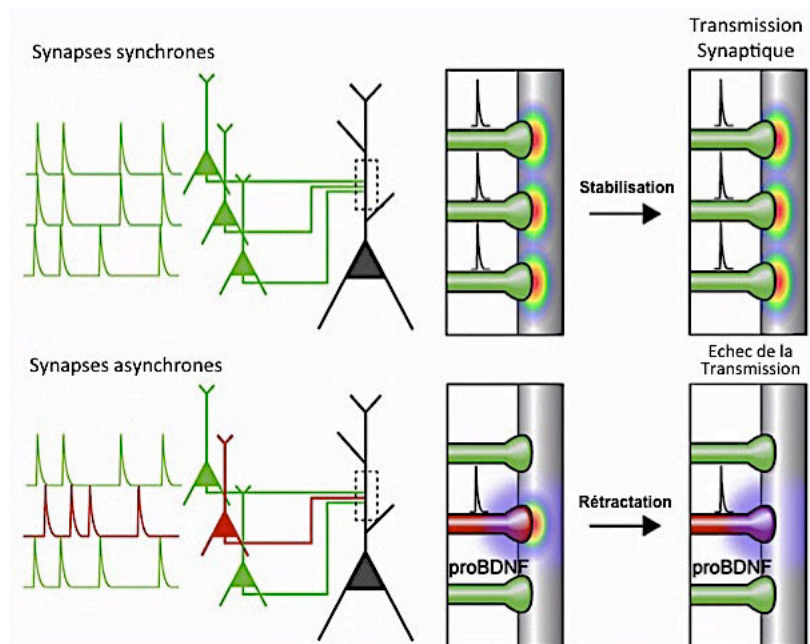


Figure 14. Implication de la voie proBDNF/p75NTR dans la dépression et la rétraction des synapses asynchrones

Modèle pour l'induction du « out-of-sync ». En haut, un exemple de synapses localement synchrones. Trois neurones présynaptiques (en vert) ont des potentiels d'action de manière synchrone et sont tous en contact avec une même dendrite de la cellule postsynaptique (en noir). Cette activité permet alors une stabilisation synaptique. En bas, un exemple de synapse asynchrone (en rouge), qui entraîne une augmentation locale, au niveau synaptique, de proBDNF et va entraîner une dépression de la transmission et une rétraction de la synapse ; d'après Winnubst et al, 2015.

Ensemble, ces résultats soutiennent un modèle dans lequel la sécrétion de proBDNF peut avoir des effets complètement opposés sur le développement et la plasticité synaptique par rapport au mBDNF. Un modèle où mBDNF est l'ange de la plasticité et proBDNF le démon. Cependant, même si les effets du proBDNF sur la survie et la plasticité de la transmission synaptique glutamatergique ont été étudiés, plusieurs autres questions demeurent encore sans réponse. L'une d'elles serait de savoir si et comment proBDNF module la transmission synaptique GABAergique.

2. Neurotransmission GABAergique

2.1. Neurotransmetteur GABA

2.1.1. Généralités

L'acide γ -aminobutyrique (GABA) est le principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux chez l'adulte. Le GABA a été longtemps connu comme un élément important du cycle de Krebs présent chez les plantes et les bactéries. En 1950, Eugene Roberts et Jorge Awapara ont découvert la présence d'un taux très élevé de GABA dans le système nerveux central des mammifères (1mg/g de tissus) tandis qu'il restait indétectable dans les autres tissus. Cependant, il est intéressant de noter que le GABA n'était pas accepté comme neurotransmetteur jusque dans les années 60 où plusieurs expériences ont permis de montrer son implication dans la transmission synaptique. Ce fut la découverte de l'inhibition synaptique chez les vertébrés et les invertébrés, avec le GABA comme neurotransmetteur inhibiteur qui fut le premier exemple clair (Roberts and Difiglia, 1988). Il a par exemple été montré que des extraits de cerveau de mammifères contenant une substance, appelée Facteur I, bloquait la genèse d'impulsion électrique dans les neurones d'écrevisse. Ce facteur était en fait, le GABA (ELLIOTT and FLOREY, 1956; FLOREY, 1991). Dans les crustacés, le GABA fut retrouvé à des concentrations 100 fois plus importantes dans les axones inhibiteurs que dans les axones excitateurs, et en réponse à la stimulation nerveuse, il a été trouvé que les terminaisons inhibitrices sécrétaient du GABA (KRAVITZ and POTTER, 1965; Otsuka et al., 1966). Par la suite, l'identification de la biosynthèse et des voies métaboliques du GABA a montré que la production, la diffusion, la recapture et le métabolisme de ce neurotransmetteur avait lieu dans le système nerveux (Roberts and Difiglia, 1988). Lorsque le GABA fut appliqué sur des cellules nerveuses et musculaires de vertébrés et d'invertébrés, il a été reconnu comme ayant un effet majoritairement inhibiteur et produisant un changement de conductance au niveau de la sensibilité aux ions (Krnjević and Schwartz, 1967; KUFFLER and EDWARDS, 1958; A. TAKEUCHI and N. TAKEUCHI, 1965). Enfin, dans les années 1970, le GABA fut définitivement localisé au niveau des terminaisons nerveuses des mammifères. Des anticorps

dirigés contre les enzymes de biosynthèse du GABA ont montrés sa localisation préférentielle dans les neurones inhibiteurs (Bloom and Iversen, 1971; Roberts and Difiglia, 1988).

2.1.2. Métabolisme du GABA

Dans le cerveau des mammifères, le GABA est synthétisé principalement par décarboxylation du glutamate, réaction catalysée par une enzyme, l'acide glutamique décarboxylase (GAD). Le GABA est ensuite chargé dans les vésicules de sécrétion synaptique par un transporteur vésiculaire, le VGAT, et est ensuite libéré des terminaisons présynaptiques par exocytose de manière calcium-dépendante (Fon and Edwards, 2001). Cependant, des formes de sécrétion de GABA non vésiculaire ont également été décrites (par exemple, par inversion d'un transporteur) qui pourraient être particulièrement importantes pendant le développement (Attwell et al., 1993). Les effets du GABA sont ensuite médiés par l'activation de récepteurs ionotropiques ou métabotropiques, qui peuvent être localisés au niveau pré- ou post-synaptique (Figure 15).

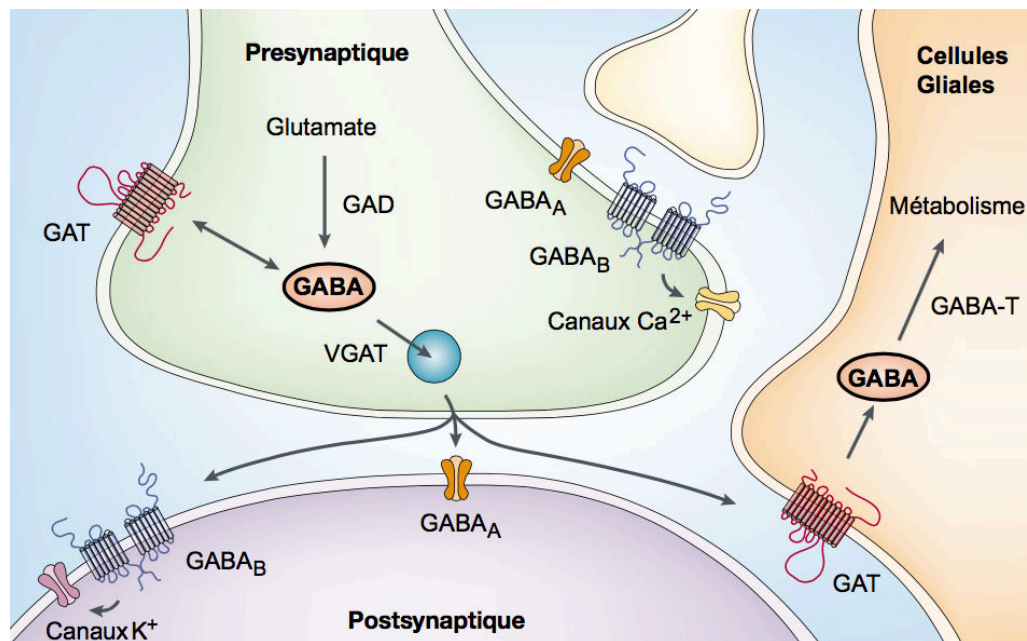


Figure 15. Synthèse et transport du GABA au niveau de la synapse

Le GABA est synthétisé à partir du glutamate par l'acide glutamique décarboxylase (GAD), puis transporté dans les vésicules par le transporteur vésiculaire des neurotransmetteurs (VGAT). Les récepteurs GABA (GABARs) sont localisés au niveau pré- et post-synaptique. Le GABA est ensuite récupéré par les neurones et les cellules gliales par l'activité du transporteur GABA (GAT). Le GABA est métabolisé par une réaction de transamination, effectué par la transaminase GABA (GABA-T) ; d'après Owens et al, 2002.

L'action du GABA se termine ensuite par sa recapture dans les terminaisons nerveuses et/ou dans les cellules gliales voisines par une famille de transporteur GABA située sur la membrane plasmique, les GATs (Cherubini and Conti, 2001; Owens and Kriegstein, 2002). Enfin, le GABA est métabolisé par une réaction de transamination qui est catalysée par la GABA transaminase (GABA-T) (Roberts and Difiglia, 1988).

2.1.3. Développement des interneurones GABAergiques

Il existe une grande variété de neurones dans le cerveau produisant du GABA. Dans le néocortex, la plupart des neurones contenant du GABA sont des interneurones. Les interneurones, qui sont principalement inhibiteurs, représentent 20 à 30% du nombre total de neurones dans le système nerveux central (DeFelipe and Fariñas, 1992; Ren et al., 1992). Les interneurones inhibiteurs utilisent le GABA et la glycine comme neurotransmetteur et sont caractérisés par leurs arborisations dendritiques, les synapses et leurs projections (Markram et al., 2004). Malgré leur faible nombre, les neurones inhibiteurs sont beaucoup plus diversifiés dans leurs morphologies, leurs connections et leurs propriétés physiologiques que les neurones pyramidaux excitateurs (DeFelipe, 1993; Gupta et al., 2000). Une classification unique des interneurones GABAergiques s'est avérée très difficile en raison de la diversité de leurs propriétés. Toutefois, de récentes études ont clarifié et unifié les éléments qui les caractérisent (Figure 16) (Kepecs and Fishell, 2014).

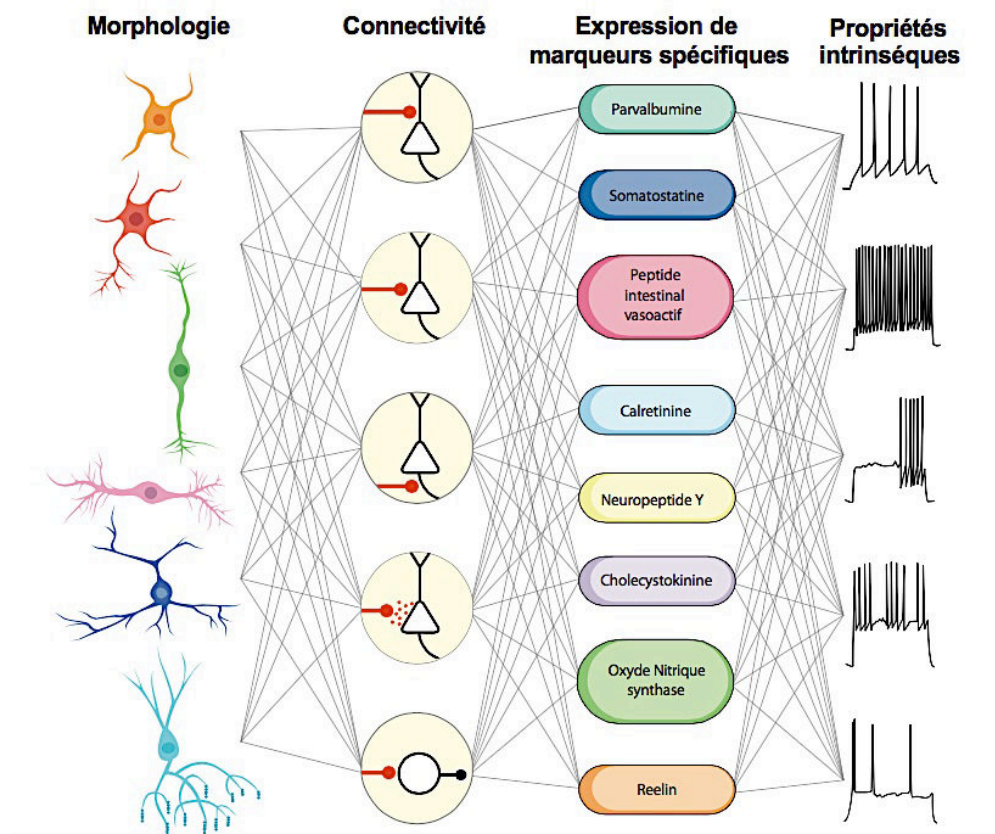


Figure 16. Diversité des interneurons GABAergiques

Classification des différents interneurons selon leurs morphologies, leurs connectivités, l'expression de certains marqueurs et leurs propriétés intrinsèques de décharge ; d'après Kepecs et Fishell, 2014.

Les éminences ganglionnaires, situées dans le télencéphale ventral, sont à l'origine des neurones GABAergiques du striatum, de l'hippocampe, du cortex et du bulbe olfactif. Les interneurons nés dans l'éminence ganglionnaire médiale (MGE) et caudale (CGE) vont migrer tangentiellement pour peupler le cortex et l'hippocampe, tandis que ceux nés dans les éminences ganglionnaires latérales (LGE) vont peupler les bulbes olfactifs. Une fois la migration tangentielle terminée, les interneurons migrent radialement, similairement aux neurones glutamatergiques qui sont positionnés dans le cortex selon le moment où ils sont nés : les premiers dans les couches profondes et les neurones plus tardifs dans les couches superficielles du cortex (Kepecs and Fishell, 2014).

2.2. Synapse GABAergique

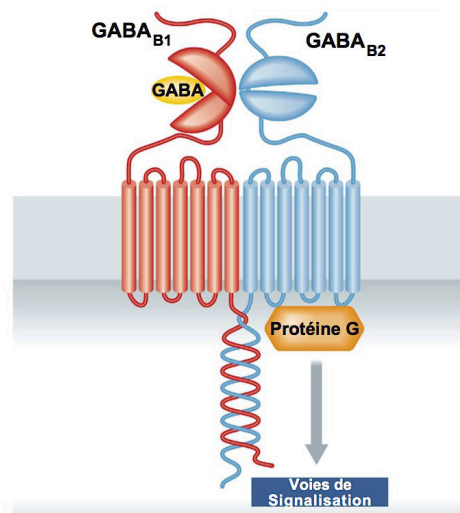
Les synapses GABAergiques sont les sites majeurs de la transmission inhibitrice dans le cerveau. Cette transmission s'effectue par la libération du GABA par les interneurons inhibiteurs qui vont alors activer les récepteurs GABA.

2.2.1. Récepteurs GABA

Les récepteurs GABA peuvent être de type ionotrope ou métabotrope. Les récepteurs GABA_A (GABA_AR) et GABA_C (GABA_CR) sont les récepteurs ionotropes impliqués dans la transmission synaptique inhibitrice rapide, tandis que les récepteurs GABA_B (GABA_BR) sont les récepteurs métabotropes couplés aux protéines G qui vont, eux, médier l'inhibition lente (Jacob et al., 2008).

2.2.1.1. Récepteurs GABA_B

Deux sous-unités différentes du récepteur métabotrope, GABA_{B1} et GABA_{B2}, ont été identifiées chez les mammifères (Kaupmann et al., 1997). Une particularité des GABA_BR est qu'ils ne sont fonctionnels uniquement sous la forme d'hétérodimères GABA_{B1}/GABA_{B2} (Martin et al., 1999). Un schéma général présente GABA_{B1} comme la seule des 2 sous-unités à posséder un site de liaison avec le neurotransmetteur GABA et GABA_{B2} comme la seule capable de se coupler à la protéine G. Cependant, l'interaction entre les deux sous-unités est plus complexe : GABA_{B1} améliore l'efficacité d'interaction de GABA_{B2} avec la protéine G et GABA_{B2} augmente l'affinité de GABA_{B1} pour le GABA et est nécessaire à l'activation du récepteur (Figure 17) (Benke et al., 2012).



Le fonctionnement du récepteur $GABA_B$ est uniquement possible lorsqu'il est sous la forme d'un hétérodimère constitué des sous unités $GABA_{B1}$ et $GABA_{B2}$. Le GABA se fixe sur l'extrémité N-terminal de $GABA_{B1}$, active le recrutement de protéine G par $GABA_{B2}$ et permet la régulation de différents systèmes (Canaux potassiques, VGCC...) ; d'après Benke et al, 2012.

Figure 17. Mécanisme d'activation du récepteur $GABA_B$

Les $GABA_B$ Rs activent différentes voies de signalisation en fonction de leurs localisations: des canaux potassiques au niveau postsynaptique, responsables de l'inhibition lente et des canaux calciques voltage-dépendants présynaptiques, diminuant la libération de neurotransmetteurs. L'activation des $GABA_B$ Rs module également la production d'AMPC, participant à la régulation de plusieurs fonctions neuronales et synaptiques. Par la suite, nous nous focaliserons uniquement sur les récepteurs ionotropiques et, plus particulièrement, sur les $GABA_A$ Rs, les $GABA_C$ Rs étant principalement exprimés dans la rétine.

2.2.1.2. Récepteurs $GABA_A$

Les $GABA_A$ Rs font partis de la superfamille des canaux ioniques ligands-dépendants qui comprend également les récepteurs glycine, les récepteurs nicotiniques à acétylcholine et les récepteurs sérotoninergiques. Les récepteurs de cette superfamille sont des hétéropentamères qui sont composés de sous-unités homologues qui partagent une structure commune : une grande partie N-terminale extracellulaire et 4 domaines transmembranaires (TM), avec un large domaine intracellulaire entre le TM3 et TM4 et où le TM2 définit le pore du canal. On compte aujourd'hui 18 sous-unités différentes divisées en 7 classes différentes dont certaines ont plusieurs membres : α (1–6), β (1–3), γ (1–3), δ , ϵ (1–3), θ et π (Figure 18).

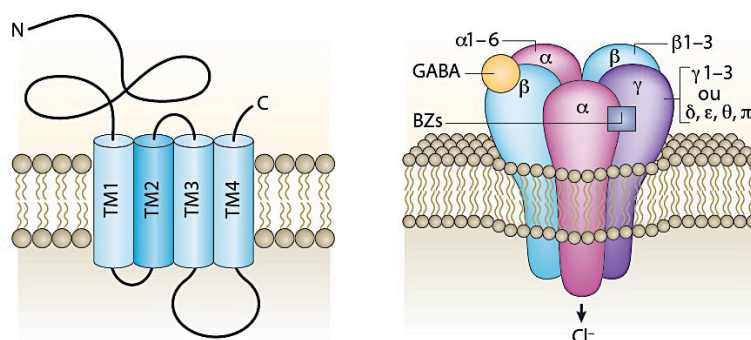


Figure 18. Structure du récepteur GABA_A

Le GABA_AR est un membre de la superfamille des canaux ioniques ligands dépendants. Les sous-unités du GABA_AR consistent en 4 domaines transmembranaires hydrophobes. La liaison du GABA se fait sur la partie N-terminal qui contient également un domaine de liaison aux benzodiazépines (BZs). Le GABA_AR est composé de cinq sous-unités des sept que compte la famille des sous unités du récepteur (α , β , γ , δ , ϵ , θ et π) et forme un canal hétéropentamérique perméable au chlore. Il est composé obligatoirement de deux α et de deux β . Seul la sous-unité γ peut être remplacé par γ , δ , ϵ , θ ou π ; d'après Jacob et al, 2008.

2.2.1.2.1. Composition en sous-unités

L'expression des différents sous-types de récepteurs est régulée spatialement et de façon développementale. La majorité des récepteurs est composée de 2 sous-unités α , 2 β et 1 γ , assemblées autour du canal selon la séquence γ - β - α - β - α . Les sous-unités δ , θ , ϵ et π semblent pouvoir remplacer la sous-unité γ . Le sous-récepteur le plus abondant dans le cerveau est formé par les sous-unités $\alpha 1$, $\beta 2$ et $\gamma 2$. En plus de l'expression de sous-unités différentielles selon les régions du cerveau, la composition des GABA_ARs varie selon le type cellulaire et le site d'adressage subcellulaire. En général, les récepteurs, composés des sous unités $\alpha 1$, $\alpha 2$ ou $\alpha 3$ avec les sous unités β et γ , sont sensibles aux benzodiazépines, sont localisés au niveau de la synapse et participent à l'inhibition synaptique phasique (courants rapides) dans le cerveau. Au contraire des récepteurs composés des sous unités $\alpha 4$, $\alpha 5$ ou $\alpha 6$ avec les sous-unités β et γ qui sont majoritairement extrasynaptiques, insensibles aux benzodiazépines et qui participent à l'inhibition tonique (courants lents) (Figure 19). En outre, il existe aussi des récepteurs sur la membrane présynaptique. 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 (Jacob et al., 2008).

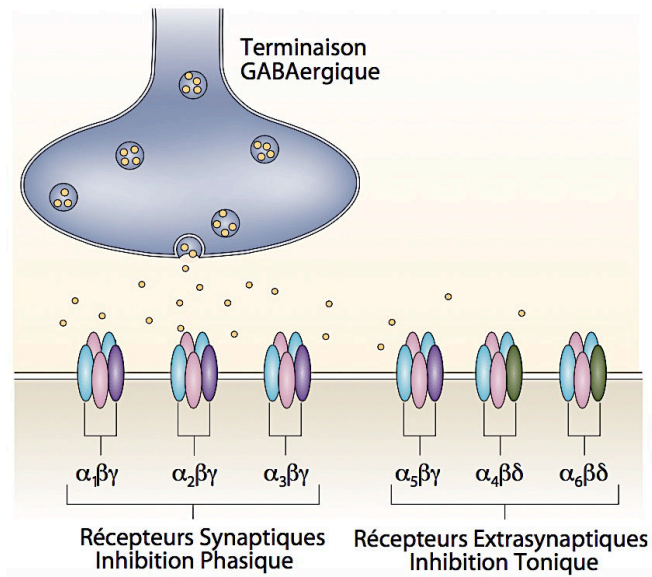


Figure 19. Localisation des récepteurs GABA_A

Les GABA_AR composés des sous-unités α (1-3), β et γ sont principalement localisés au niveau synaptique tandis que ceux composés des sous-unités α (4-6), β et γ ou δ sont largement localisés au niveau extrasynaptique ; d'après Jacob et al, 2008.

2.2.1.2.2. Expression des GABAAR

Chaque sous-unité des GABA_AR dispose d'une distribution unique dans le cerveau. Si quelques sous-unités sont exprimées de manière ubiquitaire dans le cerveau, l'expression de la plupart d'entre-elles est plus étroitement confinée à certaines régions (Figure 20) (Pirker et al., 2000; Wisden et al., 1992).

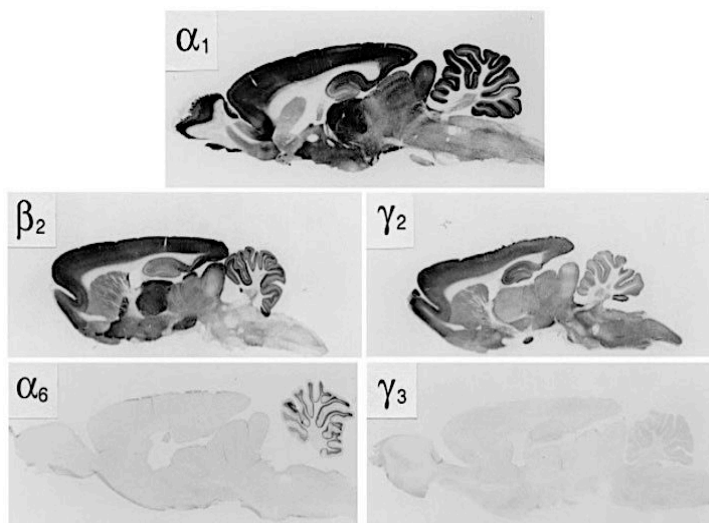


Figure 20. Distribution différentielle des sous-unités des récepteurs GABA_A

Coupe sagittale avec marquage des sous-unités par immunocytochimie ; d'après Jacob et al, 2008.

Le nombre très élevé de gènes codant pour les sous-unités GABA_AR et leurs distributions variées dans les régions du cerveau suggère un système complexe régulant leurs transcriptions (Olsen and Sieghart, 2009). Au cours du développement, plusieurs changements majeurs se font dans l'expression des sous-unités (Laurie et al., 1992). Plusieurs études ont également indiqué une modification dans leurs expressions à un stade adulte (Loup et al., 2000). Le changement est souvent associé à une modification de l'activité neuronale. Dans des cultures neuronales, l'expression de plusieurs sous-unités est augmentée suite à la dépolarisation avec un agoniste des récepteurs au glutamate (Salonen et al., 2006). Au contraire, la présence prolongée de GABA entraîne une réduction de la transcription de la sous-unité $\alpha 1$ (Lyons et al., 2001). Cette régulation dépendante de l'activation des GABA_AR suggère un mode d'action qui inclut de manière temporelle : une désensibilisation, l'endocytose des sous-unités, leurs dégradations et enfin la répression de la transcription des gènes codants pour les sous-unités (Barnes, 1996).

On sait également que des voies de signalisations activités dépendantes régulent des facteurs de transcriptions importants pouvant participer à l'expression des GABA_ARs. Dans ces voies, le calcium est un second messenger crucial que ce soit pour la transduction de l'activité synaptique ou de la transcription des gènes. Il est également impliqué dans les mécanismes de régulation des GABA_ARs (Lyons et al., 2001). Le principal facteur de transcription impliqué est le facteur CREB qui se fixe directement sur la région promotrice du gène sur le domaine CRE (cAMP response element). Suite à une réponse aux neurotransmetteurs ou aux facteurs neurotrophiques, il est activé en étant phosphorylé (Lonze and Ginty, 2002). Il a récemment été démontré que l'activation de la PKC dans des cultures neuronales augmente la transcription de $\alpha 1$ via la phosphorylation de CREB. Ce dernier se fixe alors sur le promoteur du gène. A l'inverse, l'activation de la PKA réprime la transcription de $\alpha 1$ via l'activation du facteur répresseur ICER : celui-ci va former un hétérodimère inactif avec CREB empêchant la transcription (Hu et al., 2008). De manière intéressante, le BDNF diminue la transcription de $\alpha 1$, via l'activation de la voie de signalisation comportant la kinase janus (Jak) et le transducteur de signal et activateur de transcription (STAT). STAT3, qui fait partie de la famille des STAT, a un mécanisme de phosphorylation dépendant de BDNF qui va

induire la synthèse de ICER qui, à son tour, va réprimer la transcription de sous-unité des GABA_ARs (Lund et al., 2008). Cependant, l'ajout de BDNF dans des cultures de neurones du cortex visuel entraîne une rapide augmentation du nombre total de GABA_AR fonctionnel à la membrane (Mizoguchi et al., 2003). Ces études suggèrent que le BDNF affecte l'expression des GABA_AR de façon cellule et région spécifique.

2.2.1.2.3. Adressage, endocytose et recyclage des GABAAR

Après l'assemblage des différentes sous-unités pour former le récepteur dans le réticulum endoplasmique (RE), les GABA_ARs vont être adressés à l'appareil de Golgi et être accumulés dans les vésicules pour le transport à la membrane plasmique. Les processus impliqués sont encore peu étudiés mais on connaît plusieurs protéines qui s'associent aux GABA_ARs afin de faciliter l'adressage. La principale est la protéine associée au GABA_AR (GABARAP) qui interagit avec un domaine intracellulaire de la sous-unité γ et les microtubules. La GABARAP est concentrée au niveau de l'appareil de Golgi et absente au niveau des synapses GABAergiques. Ceci suggère que son rôle principal est le transport intracellulaire des GABA_ARs (H. Wang et al., 1999). La surexpression de GABARAP entraîne une augmentation du transport intracellulaire des récepteurs et, ainsi, le nombre de récepteurs à la membrane (L. Chen et al., 2000; Leil et al., 2004).

Les GABA_ARs sont ensuite insérés dans la membrane plasmique et localisés selon leurs compositions en sous-unités. Ils sont présents sous la forme de clusters synaptiques ou extrasynaptiques ou sous la forme de clusters qui diffusent le long de la membrane. La diffusion latérale dans la membrane plasmique permet un échange permanent entre ces différents groupes. Il a été montré que la plupart des récepteurs sont tout d'abord localisés à des endroits extrasynaptiques et, qu'au fil du temps, la diffusion augmente la population de récepteurs synaptiques (Bogdanov et al., 2006).

Une des protéines les plus impliquées dans la régulation des clusters des GABA_ARs, au niveau des synapses inhibitrices, est la protéine multifonctionnelle géphyrine. Elle a été identifiée par son association et sa liaison directe avec le domaine intracellulaire d'une sous-unité des récepteurs glycine et sa fonction de stabilisation de ces récepteurs au niveau des synapses (Lévi et al., 2004; Meyer et

al., 1995). Les mécanismes moléculaires de l'action de la géphyrine sur les clusters GABA sont encore peu connus. Il est cependant suggéré qu'il existe un domaine critique pour l'assemblage en cluster des GABAAR dans la sous-unité gamma2 (Figure 21).

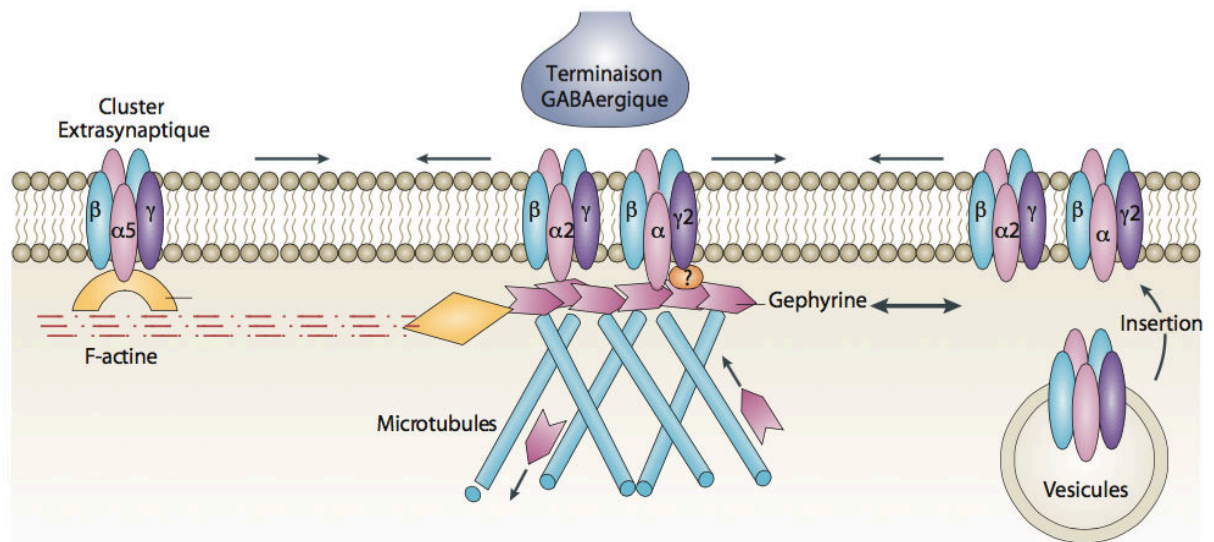


Figure 21. Régulation dynamique de la synapse GABAergique par diffusion latérale des récepteurs

La diffusion latérale permet un échange continu de la population des récepteurs. La géphyrine va permettre une action locale sur les mouvements latéraux des récepteurs; d'après Jacob et al, 2008.

Tandis que les données sur la diffusion latérale des GABA_ARs sont encore rares, il existe plusieurs évidences que les GABA_ARs sont constamment endocytés et recyclés à la surface membranaire, régulant ainsi l'efficacité de la transmission GABAergique (Kittler and Moss, 2003). Les GABA_ARs peuvent s'associer directement avec la machinerie d'endocytose, par liaison de ses sous-unités β et γ avec l'adaptateur à la clathrine (AP2). Cependant, AP2 peut se lier aux GABA_ARs et entraîner l'internalisation du récepteur uniquement quand le récepteur est déphosphorylé principalement par les phosphatase PP1α et PP2A. Ainsi, l'une des principales modifications fonctionnelles des GABA_ARs est faite par la régulation de l'état de phosphorylation de la sous-unité β. Les sous-unités β(1-3) sont particulièrement intéressantes dans ce contexte puisqu'elles contiennent plusieurs résidus sérine qui peuvent être phosphorylés par de multiples sérine/thréonine kinase (McDonald and Moss, 1997). Le site Ser408/Ser409 de la sous-unité β3 est

sujet à des phosphorylations par la PKA. Cette phosphorylation se traduisant par la potentialisation de la réponse GABA. A l'inverse, de la phosphorylation de la sous-unité $\beta 1$ qui entraîne une réduction de la réponse GABA et de la sous-unité $\beta 2$ qui n'est pas une cible de PKA (McDonald et al., 1998). Par ailleurs, la sous-unité $\beta 3$ est également phosphorylée par la PKC, la CAMKII et Akt (Brandon et al., 2002). La phosphorylation amenant à une augmentation du nombre de GABA_AR à la membrane. Un changement de l'état de phosphorylation de la sous-unité $\beta 3$ a récemment été suggéré comme étant le résultat de l'action du BDNF, qui a précédemment été décrit comme modifiant l'activité GABA sur des neurones en cultures (Jovanovic et al., 2004). Enfin, lorsque les GABA_ARs sont internalisés et endocytés, ils peuvent soit être ciblés vers la dégradation lysosomale, soit recyclés et remis à la membrane grâce à des protéines régulatrices (Figure 22) (Comenencia-Ortiz et al., 2014).

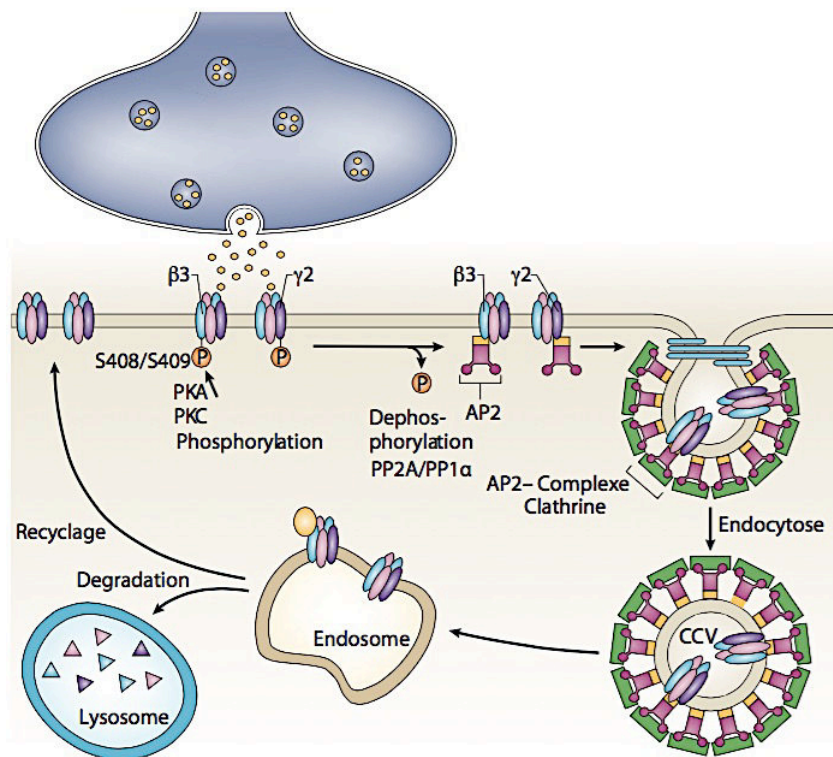


Figure 22. Recyclage ou dégradation des récepteurs GABA_A ?

L'endocytose se fait principalement par des mécanismes qui dépendent de la formation de vésicules recouvertes de clathrine. Ce type d'endocytose est dépendant de l'état de phosphorylation de motifs spécifiques situés principalement sur la sous-unité $\beta 3$. Cette sous-unité sera soit phosphorylée principalement par la PKA et PKC ce qui stabilisera le GABAAR à la membrane, soit déphosphorylée par PP1 α et PP2A ce qui permettra l'endocytose. Une fois endocytés dans des vésicules enveloppées de clathrine (CCV), les récepteurs sont soit dégradés soit recyclés grâce à des protéines lysosomales régulatrices qui vont promouvoir le retour des récepteurs à la membrane ; d'après Jacob et al, 2008.

2.3. Séquence développementale du GABA

Les différents effets de la transmission synaptique par les GABA_ARs dépendent de la concentration intracellulaire en chlore [Cl⁻]_i. Ainsi, la régulation du [Cl⁻]_i est de la première importance dans plusieurs conditions neurophysiologiques. La [Cl⁻]_i repose sur l'action concomitante et coordonnée d'un nombre important de protéines membranaires (canaux, récepteurs-canaux et transporteurs) qui permettent le passage sélectif des ions à travers la membrane. Dans les cellules neuronales, le transport de chlore se fait à la fois par des mécanismes de diffusions passives au travers des canaux chlorures et par des mécanismes actifs secondaires par des co-transporteurs ou échangeurs. L'homéostasie du chlore est donc déterminée par une balance entre l'expression fonctionnelle des transporteurs et des canaux présents à la membrane, mais aussi dans la membrane des organites intracellulaires. Elle est également déterminée par les forces thermodynamiques qui conduisent le chlore ; par les propriétés intrinsèques des co-transporteurs, des canaux et des échangeurs ; et enfin par de nombreux autres facteurs (pH, CO₂/HCO₃⁻, K⁺, Na⁺, potentiel membranaire) (Figure 23).

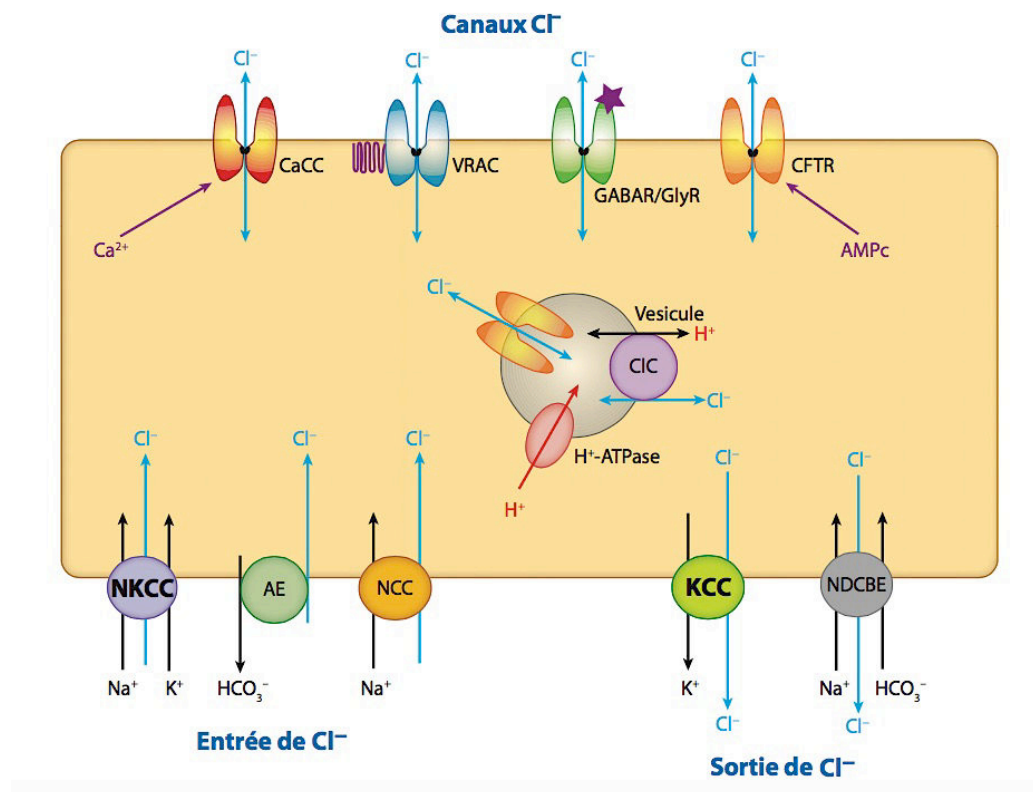


Figure 23. Signalisation cellulaire du chlore

Le chlore est transporté à travers la membrane plasmique par des transporteurs qui l'accumulent à l'intérieur ou qui le pompent à l'extérieur de la cellule. Il peut également traverser passivement la membrane plasmique à travers plusieurs canaux chlore incluant les canaux activés par le calcium (CaCC), le volume cellulaire (VRAC), l'AMPc (CFTR), ou liés à un ligand (récepteurs GABA_A et glycine). Les canaux et transporteurs sont présents également sur la membrane de compartiments intracellulaires, tels que la voie endosomal-lysosomal (famille des CLC); d'après duran et al, 2010.

Au stade précoce du développement, l'expression majoritaire du co-transporteur NKCC1 qui, de part son fonctionnement déterminé par le gradient sodium et potassium, entraîne l'accumulation d'une forte $[Cl^-]_i$ dans les neurones immatures. Pendant le développement, les premières synapses fonctionnelles formées sont les synapses GABAergiques, les synapses glutamatergiques ayant besoin de plus de cible postsynaptique mature. Le niveau élevé de la $[Cl^-]_i$ à ce stade va entraîner une sortie de chlore et une dépolarisation membranaire lorsque les GABA_ARs seront activés. Plus tard dans le développement, la réponse des GABA_ARs passe de dépolarisante à hyperpolarisante et inhibitrice. Cette nouvelle réponse est initiée par la diminution de l'expression à la membrane de NKCC1, par l'action suggérée de facteur de transcription dépendant du calcium et à l'augmentation d'expression d'un nouveau co-transporteur, le KCC2. Ce dernier va faire sortir le chlore de la cellule, convertissant ainsi la transmission GABAergique d'excitatrice à inhibitrice (Figure 24) (Ben-Ari, 2002).

Le KCC2 joue ainsi un rôle clé dans la séquence maturative du GABA, d'actions excitatrices à inhibitrices. D'ailleurs, des changements dans le niveau d'expression des ARNm de KCC2 sont corrélés avec des modifications de l'action du GABA. La surexpression de KCC2 entraîne la conversion à un GABA inhibiteur. Inversement, l'activation ou le blocage des GABA_ARs modifie le niveau de KCC2 (Ben-Ari, 2002; Cancedda et al., 2007). Il a également été montré que la glycine et l'activation de son récepteur pouvaient être nécessaires à l'augmentation de l'expression de KCC2 dans la moelle épinière (Allain et al., 2015). La régulation neuronale de KCC2 est donc une donnée importante dans la séquence développementale du GABA.

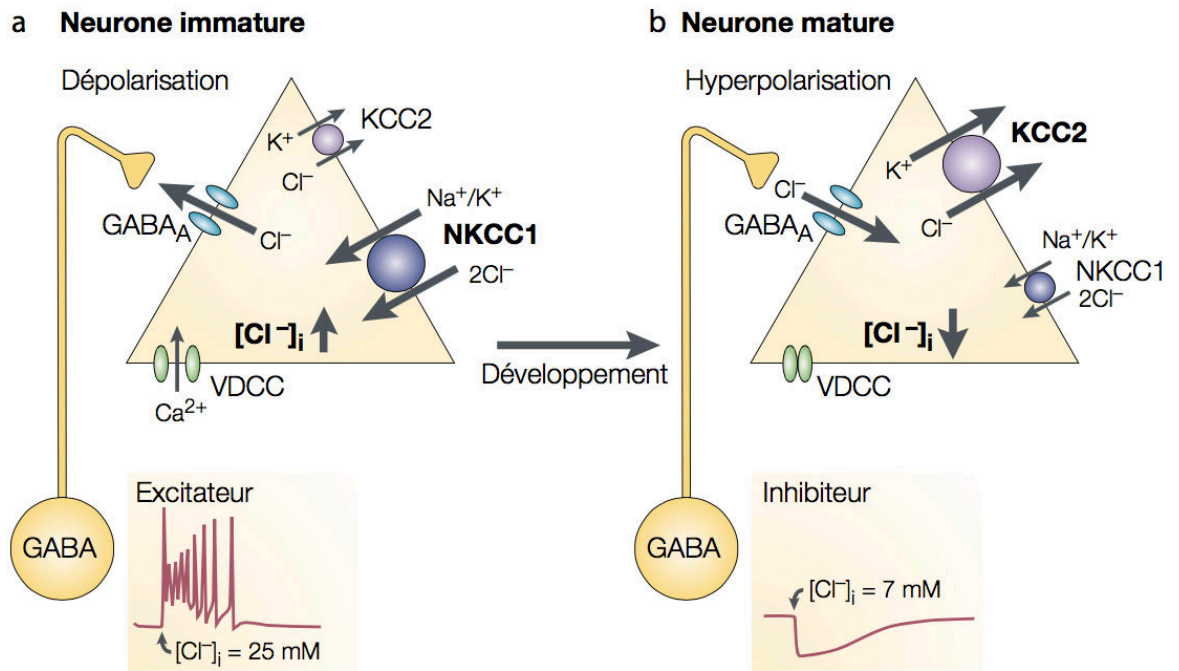


Figure 24. Séquence maturative du GABA par l'expression précoce de NKCC1 et tardive de KCC2

Le gradient chlore est principalement contrôlé par NKCC1, KCC2 et VDCC. (a) NKCC1 est prédominant dans les neurones immatures, entraînant une forte $[Cl^-]_i$ et une réponse dépolarisante et excitatrice du GABA. (b) L'expression de KCC2 prédomine dans les neurones matures, entraînant une diminution de $[Cl^-]_i$ et une réponse hyperpolarisante et inhibitrice du GABA ; d'après Ben Ari et al, 2002.

Plusieurs mécanismes sont impliqués dans le contrôle de la fonction de KCC2 (Figure 25) (I. Medina et al., 2014). Au moins trois facteurs trophiques ont été identifiés comme modulateurs de la transcription de KCC2 : le BDNF, la Neurturin et le facteur de croissance associé à l'insuline. Etant donné que l'activité neuronale régule la sécrétion de BDNF au niveau pré- et post-synaptique, les effets du BDNF sur KCC2 sont les mieux caractérisés. Le BDNF, via TrkB, active la transcription de KCC2, pendant le développement, par l'intermédiaire de la voie Erk qui module l'activité du facteur de transcription Egr4 (Ludwig et al., 2011). Le fonctionnement et l'expression à la membrane de KCC2 sont eux modulés par des modifications post-traductionnelles. L'une des plus importantes est la phosphorylation sur différents résidus de la protéine, contrôlée par l'action de différentes kinases et phosphatases (Kahle et al., 2013). La principale kinase qui phosphoryle directement KCC2 et permet son fonctionnement et sa stabilité à la membrane est la PKC. Plusieurs voies peuvent réguler l'activité de cette kinase tels que : le BDNF, via TrkB, l'activation des

récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR) et les récepteurs à la sérotonine (Banke and Gegelashvili, 2008; Bos et al., 2013). Il est également montré que l'activité des récepteurs NMDA diminue la stabilité à la membrane de KCC2 en entraînant une internalisation du co-transporteur grâce à la déphosphorylation par la protéine phosphatase 1 (PP1) du même résidu ciblé par la PKC (H. H. C. Lee et al., 2011). Par contre, la phosphorylation par les kinases WNK, SPAK et OSR1 sur des résidus différents de KCC2 entraînent une diminution de l'activité du co-transporteur (Inoue et al., 2012) et joue un rôle important dans la plasticité GABAergique pendant le développement en régulant ainsi l'homéostasie chlore (Kaila et al., 2014).

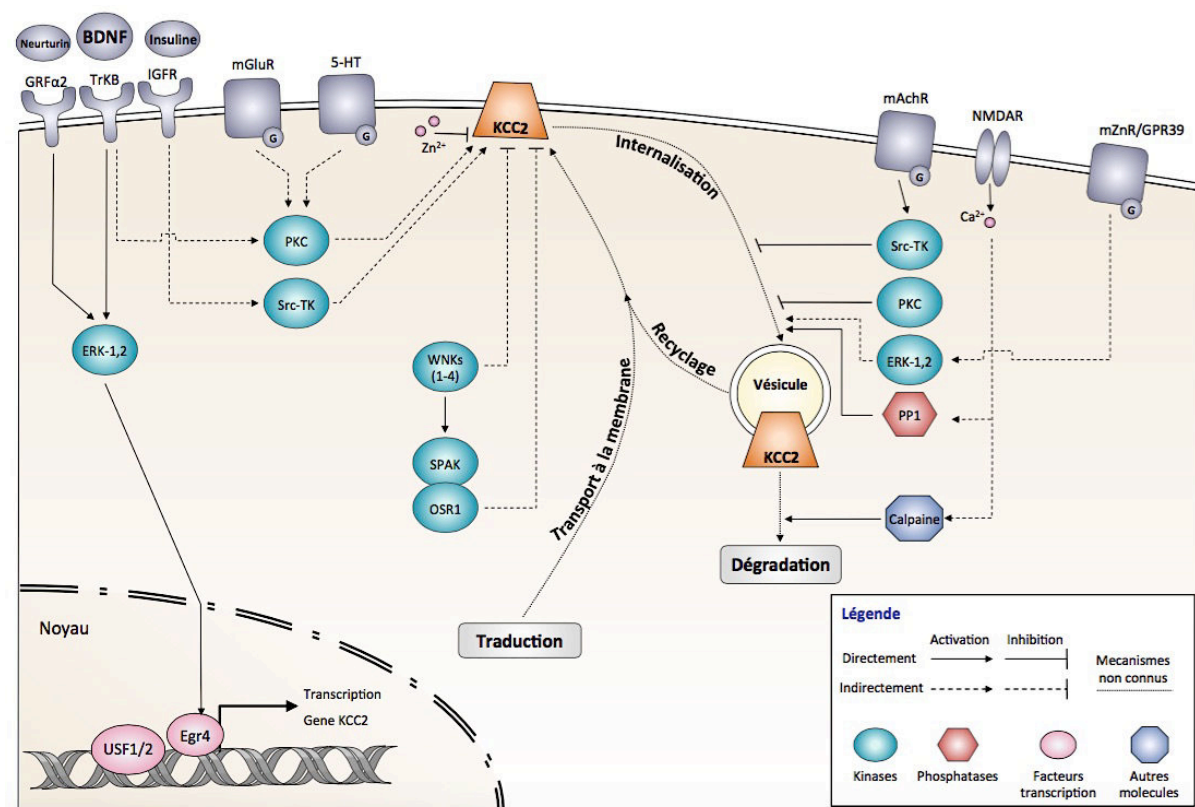


Figure 25. Contrôle de l'activité de KCC2 par différentes voies de signalisation

La régulation de l'activité de KCC2 s'effectue par des modifications transcriptionnelles et post-traductionnelles, contrôlées principalement par l'action de kinases et de phosphatases ; d'après Medina et al, 2014.

2.4. Action trophique du GABA

Pendant le développement, le GABA exerce aussi un rôle trophique en stimulant la migration neuronale, la division cellulaire et la croissance neuronale. L'activation des GABA_ARs génère aussi des courants calciques en activant les VDCCs. Le résultat de la dépolarisation induite est l'enlèvement du magnésium voltage-dépendant qui bloquait les récepteurs NMDA, induisant une augmentation de calcium. Ainsi, le GABA travaille en synergie avec les canaux NMDA dans les neurones immatures. Cette fonction est importante car les courants induits par NMDA vont fournir un élément supplémentaire dans l'activité globale du réseau en développement et pas chez l'adulte. Ceci est due à l'expression différentielle des sous-unités des récepteurs NMDA, dans les neurones immatures et adultes, qui donne des courants d'une durée plus longue. Comme le GABA est à l'origine de la principale source de courants dépolarisants à ce stade, la synergie d'action avec les NMDA permet l'augmentation de l'activité neuronale dans le réseau et va contribuer au développement des circuits neuronaux matures (Figure 26).

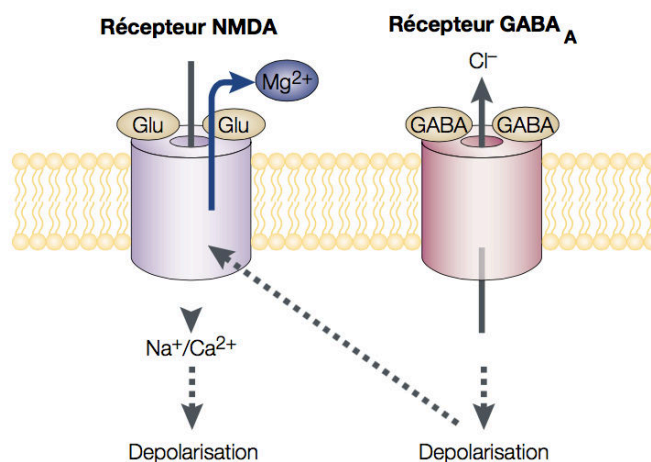


Figure 26. Actions synergiques des récepteurs GABA_A et NMDA pendant le développement

En générant une dépolarisation, le GABA va activer le récepteur NMDA, entraînant une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire et ainsi un maintien de l'activité; d'après Ben Ari et al, 2002.

2.5. BDNF et transmission GABAergique

L'implication du BDNF dans la différenciation morpho-fonctionnelle des neurones GABAergiques a été largement démontrée. Des applications de BDNF exogène, sur différents types de neurones immatures en culture, ont permis la croissance de l'arborisation dendritique, la formation et la maturation des synapses GABAergiques par des modifications présynaptiques dont l'augmentation de l'expression de GAD ainsi que la libération de GABA (Berghuis et al., 2004; Yamada et al., 2002). Il intervient également dans la maturation de l'arborisation axonale et dans l'augmentation de l'expression à la membrane des GABA_ARs chez les neurones GABAergiques mais aussi dans la formation des synapses inhibitrices et excitatrices (Vicario-Abejón et al., 2002). De plus, il a été montré que l'activité neuronale, et plus particulièrement GABAergique, pouvait être à l'origine de la libération du BDNF impliquée dans tous ces processus (Marty et al., 2000).

Ensuite, après l'établissement des connexions synaptiques fonctionnelles des neurones, ces contacts doivent être éliminés ou renforcés afin d'affiner l'efficacité du réseau ainsi formé. Selon le stade développemental, la structure étudiée et le type cellulaire, le BDNF peut potentialiser ou déprimer l'efficacité des synapses GABAergiques via des modifications pré- ou post-synaptique (nombre de terminaisons, probabilité de libération, nombre et propriétés fonctionnels des récepteurs...) (Gottmann et al., 2009). Le BDNF intervient également sur l'inhibition GABAergique par la régulation de l'expression du co-transporteur KCC2 (C. Rivera et al., 2002).

3. ProBDNF et épilepsie

3.1. Généralités épilepsie

L'épilepsie est le trouble neurologique le plus fréquent, après le trauma et la migraine (Acharya et al., 2008), et affecte globalement dans le monde 50 millions de personnes (de Boer et al., 2008). La ligue internationale contre l'épilepsie, définit l'épilepsie et les crises épileptiques comme étant des phénomènes transitoires de signes et/ou symptômes dus à une activité neuronale anormalement synchrone ou excessive dans le cerveau. L'épilepsie est un trouble neurologique caractérisé par une prédisposition persistante à la production de crises et par des troubles neurobiologiques, cognitif, psychologique et social. La définition de l'épilepsie nécessite la présence d'au moins une crise (Fisher et al., 2005). Les épilepsies sont complexes avec un large spectre de causes possibles telles que les tumeurs, les traumatismes, les infections virales, les troubles neuro-développementaux ou la mutation génétique (Browne and Holmes, 2001). Les syndromes épileptiques sont en outre classés en 3 groupes : idiopathique (l'épilepsie elle-même est responsable du syndrome épileptique), symptomatique (la cause est connue) et cryptogénique (de cause inconnue). Les termes ont été récemment modifiés en défaut génétique, structural/métabolique et cause inconnue (Berg et al., 2010). Plus de la moitié des épilepsies sont classées comme des défauts structurels/métaboliques (Engel et al., 2006).

La sémiologie (l'étude des symptômes) des épilepsies est double: on distingue les épilepsies généralisées (avec un départ simultané aux deux hémisphères, des activités ictales et interictales bilatérales et synchrones aux deux hémisphères) et les épilepsies focales ou partielles, comme l'épilepsie du lobe temporal (ELT), dont le départ de la crise ne concerne qu'un seul hémisphère, mais qui peut ensuite se généraliser aux deux.

En épilepsie, on distingue deux types d'activités paroxystiques (activités symptomatiques qui apparaissent et s'estompent rapidement) : l'activité interictale (ou activité intercritique, entre les crises), et l'activité ictale (ou activité critique, de crise). L'activité interictale correspond à une activité pathologique cérébrale, présente à la fois pendant l'épileptogénèse et l'épilepsie dans les modèles

animaux, et entre les crises chez les patients ELT. L'activité ictale, quant à elle, est la marque d'une activité pathologique continue puisqu'elle constitue l'activité de crises d'épilepsie proprement dite.

La zone épileptogène (ZE) est l'ensemble des structures cérébrales impliquées dans la genèse des activités paroxystiques (épileptiques). Dans les épilepsies partielles, la ZE se traduit le plus souvent par une décharge rapide de bas voltage qui implique souvent plusieurs régions simultanément en début de crise (Bancaud and Talairach, 1965; Bartolomei, 2009; Kahane et al., 2006). Avant l'apparition de cette décharge rapide, il y a une synchronisation des structures impliquées dans la ZE, qui est parfois progressive et souvent associée à une augmentation/apparition de pointes interictales. D'autres fois, elle est plus rapide à se mettre en place (Bartolomei et al., 2001; S. S. Spencer and D. D. Spencer, 1994). C'est comme si plusieurs secondes avant le début de la crise, un renforcement des relations entre structures de la ZE se mettait en place pour aboutir à un phénomène de synchronisation des activités de ces structures (démarrage quasi-synchrone des décharges rapides dans les structures cérébrales distantes).

La ZE se distingue de la zone lésionnelle qui, comme son nom l'indique, constitue la zone du cerveau où la lésion initiale s'est produite (dysplasie corticale, malformation corticale périnatale, méningiome, gliome, etc.) et de la zone irritative, siège des activités pathologiques qui surviennent entre les crises. La zone irritative peut ou non englober la zone lésionnelle et/ou la ZE.

Au cours de ma thèse, j'ai travaillé sur un modèle particulier d'épilepsie, l'ELT. L'ELT est la forme la plus commune d'épilepsie partielle retrouvée chez l'adulte et sont réfractaires aux traitements antiépileptiques classiques dans 20 à 30% des cas.

3.2. Epilepsie du lobe temporal (ELT)

L'épilepsie du lobe temporal (ELT) est la forme d'épilepsie focale la plus fréquente chez l'adulte.

L'étiologie des ELT peut être divisée en 4 groupes : les formes associées à la sclérose hippocampique (SH), les formes associées à des lésions autres que la SH (tumeurs neuro-développementales, dysplasies corticales focales, cavernomes, etc.), les formes génétiques et les ELT cryptogéniques (20%). Ces ELT sont pharmaco-résistantes dans un nombre important de cas, bien qu'il n'y ait pas d'étude spécifique sur la pharmaco-résistance des ELT.

3.2.1. Historique clinique des patients atteints de ELT

Il est fréquent que les patients souffrant d'ELT aient subi un événement déclencheur au début de leur enfance (de 0 à 5 ans) comme un épisode de convulsions fébriles, d'anoxie, d'ischémie, de traumatisme crânien ou une maladie infectieuse. Une grande proportion de patients atteints d'ELT (30 à 60%) ont connu une convulsion fébrile prolongée (Theodore et al., 1999). En effet, les enfants qui ont subi des convulsions fébriles présentent 8 fois plus de risque de développer des épilepsies par rapport aux enfants qui n'ont eu aucun épisode de convulsion. Après cette crise, que l'on peut nommer d'événement inaugural, une période de 8 à 10 ans sans aucun signe clinique précèdera l'apparition de la première crise chronique spontanée. Cette période, dite période de latence ou phase d'épileptogénèse, est une phase pendant laquelle le patient n'a pas le moindre signe d'un comportement épileptique. Cependant, les enregistrements EEG montrent déjà l'existence d'une activité anormale. Souvent pendant l'adolescence, la phase chronique se met en place et les premières crises spontanées et récurrentes se produisent, accompagnées d'une réduction des performances cognitives et comportementales (Figure 27) (Engel et al., 2006).

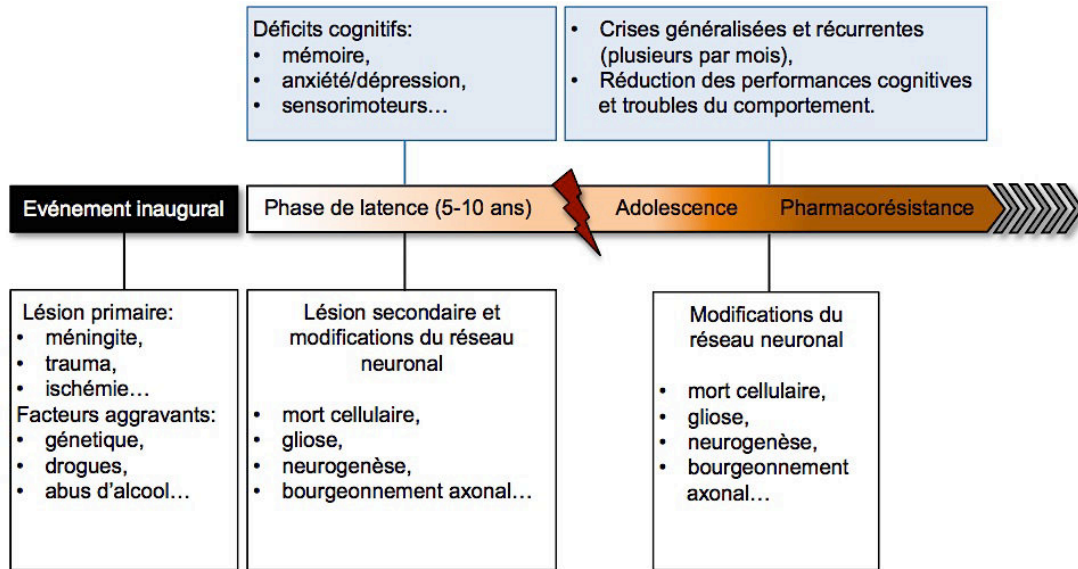


Figure 27. Profil d'évolution de l'ELT

Après un événement inaugural dans le cerveau qui induit un état de mal épileptique, le patient entre dans une phase cliniquement asymptomatique. Cette phase est suivie par un premier épisode de crise spontanée et récurrente qui va définir l'entrée dans la phase chronique qui devient souvent pharmacorésistante. L'épilepsie est accompagnée d'un large spectre de modifications du réseau neuronal.

3.2.2. Modèles animaux d'ELT

3.2.2.1. Généralités

Pour mieux comprendre le développement de l'épilepsie et étudier l'effet de drogues antiépileptiques, plusieurs modèles animaux mimant la pathologie ont été développés. Le principal avantage est l'accès à la phase de latence ou phase d'épileptogenèse, inaccessible chez l'homme, qui est primordiale pour la compréhension des mécanismes aboutissant au développement de l'épilepsie. Les modèles les plus couramment utilisés pour l'étude des processus d'épileptogenèse dans l'ELT sont les modèles Status Epilepticus (SE) (Pilocarpine et Kainate principalement) et le modèle d'embrasement (aussi appelé modèle de « kindling »).

3.2.2.2. *Modèle d'étude : le modèle pilocarpine*

Dans ce modèle, développé chez le rat (Turski et al., 1983), l'administration de pilocarpine induit un SE caractérisé par des crises généralisées tonico-cloniques, suivies par une phase de latence puis d'une phase chronique avec apparition de crises récurrentes spontanées.

La pilocarpine est un agoniste des récepteurs cholinergiques de type muscarinique qui va entraîner une altération des courants potassiques et calciques (Segal, 1988), augmentant ainsi la dépolarisation des neurones, donc l'excitabilité neuronale.

Suite à l'injection (300 mg/kg), les animaux commencent à être immobiles, ont des troubles au niveau de la face : salivation, clignement des yeux, contractions des vibrisses et bâillements. L'animal présentera ensuite des clonies de la tête et des pattes antérieures puis déclenchera une crise généralisée et aboutira au SE (Turski et al., 1983).

3.2.3. Pathophysiologie de l'épileptogenèse chez l'homme et le modèle animal

L'évènement inaugural, comme le *status epilepticus*, induit plusieurs changements au niveau moléculaire et structurel dans le cerveau. Bien que les altérations cellulaires peuvent être différentes selon les patients, certaines sont communes, telles que la neurodégénérescence, la neurogenèse, la gliose, l'invasion de cellules inflammatoires et des neuroinflammations, le bourgeonnement axonal, la plasticité dendritique, l'angiogenèse et des changements dans la matrice extracellulaire. La plupart de ces changements ne sont pas limités dans le temps, après l'évènement inaugural, mais peuvent continuer durant toute la phase de latence qui est assimilée au processus d'épileptogenèse (Pitkänen and Lukasiuk, 2009).

La perte neuronale ou neuro-dégénérescence, est l'une des principales caractéristiques du cerveau épileptique (Dam, 1980) et touche plusieurs régions du cerveau, aussi bien chez les modèles animaux que chez l'homme. Il reste cependant à savoir si la perte neuronale est la cause ou la conséquence des crises.

Plusieurs études ont plutôt montrées que chaque crise pouvait amener à une perte neuronale et que l'augmentation de la sévérité des crises entraîne une plus forte mort neuronale dans l'hippocampe (Ben-Ari and Dudek, 2010). En revanche, il semble que chaque crise ne va pas endommager obligatoirement les neurones (Cavazos et al., 1994; Mathern et al., 2002).

La ZE de l'ELT est située dans le lobe temporal et plus particulièrement dans l'hippocampe. L'hippocampe normal est défini par la présence de 2 structures principales interconnectées : la Corne d'Ammon (CA), divisée en région CA1-3, et le Gyrus Denté (GD). Les principaux neurones de la CA sont des cellules pyramidales tandis que celles du GD sont des cellules granulaires. Certains neurones sont plus vulnérables aux crises que d'autres : notamment, les neurones des régions CA1 et CA3 de l'hippocampe qui montrent une mort cellulaire plus importante après crise, provoquant ainsi une sclérose hippocampique. Cette mort neuronale est également associée à une gliose qui consiste en un développement exagéré des cellules gliales (Figure 28).

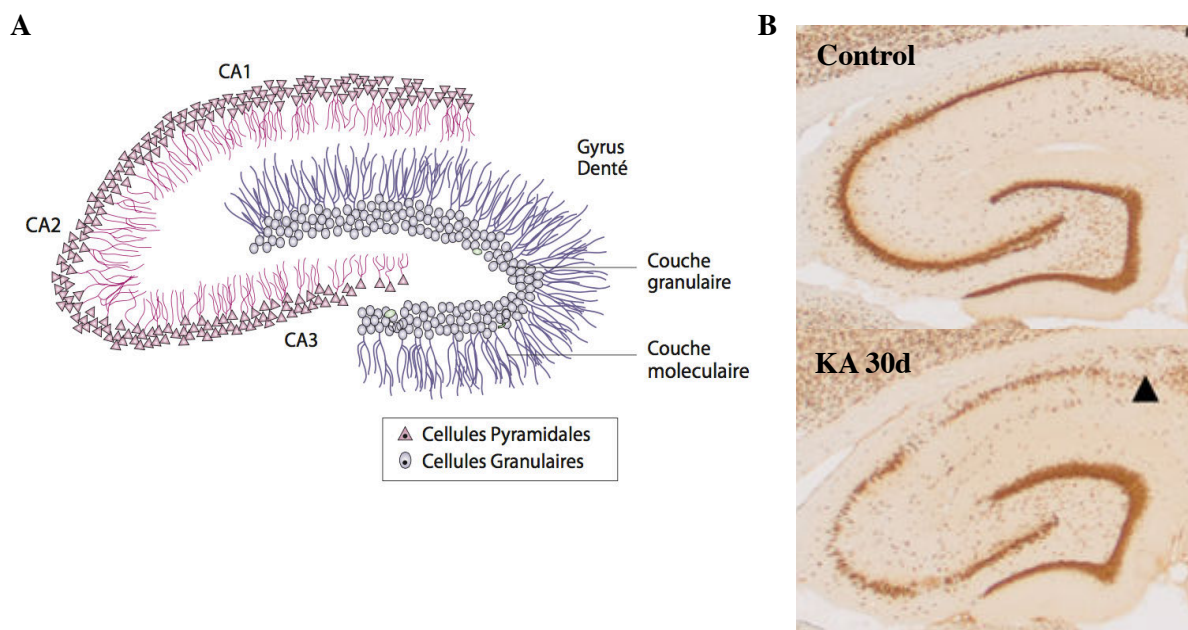


Figure 28. Schéma de l'anatomie cellulaire de l'hippocampe en condition contrôle et épileptique

(A) Schéma de l'anatomie cellulaire de l'hippocampe ; (B) Marquage de la densité neuronale en condition contrôle et 30 jours après l'induction du SE avec le kainate ; d'après Drexel et al, 2013.

La neurogenèse est une autre caractéristique typique du cerveau épileptique. Cependant, par rapport aux autres changements induits par le status epilepticus, elle est limitée à la zone sous-ventriculaire et à la zone sous-granulaire de l'hippocampe. Les crises sévères vont induire la prolifération de cellules progénitrices, entraînant une augmentation du nombre de cellules granulaires immatures dans l'hippocampe. Ces cellules vont alors se différencier en cellules matures et s'intégrer de manière anormale dans le réseau des cellules granulaires. Elles vont ainsi éventuellement remplacer les neurones perdus mais affecter la réorganisation du réseau neuronal (Scharfman et al., 2000).

Une autre altération morphologique remarquable dans l'épileptogénèse, est l'augmentation du bourgeonnement axonal (Houser et al., 1990). L'exemple classique est le bourgeonnement des fibres mossues du GD qui font des nouveaux contacts synaptiques avec les cellules de la couche moléculaire interne (Houser, 1999). Souvent, la perte neuronale et la réorganisation des fibres mossues coexistent mais le bourgeonnement peut aussi avoir lieu de manière isolé. Ces réarrangements qui ont lieu au niveau du GD induisent des connexions excitatrices récurrentes, à l'origine d'une augmentation de l'excitabilité (Esclapez et al., 1999).

Ainsi, les altérations morphologiques peuvent être à l'origine des crises et également dans certaines conditions les crises seront les causes de ces altérations. Ces altérations vont entraîner une réorganisation du réseau, notamment au niveau des connexions neuronales et les structures, qui laissent présager des changements au niveau des activités synaptiques.

3.2.3.1. Activité GABAergique et épilepsie

L'altération de la transmission GABAergique peut, plus spécifiquement, entraîner l'hyperexcitabilité du réseau et le développement des crises (Treiman, 1990), la signalisation GABAergique étant cruciale dans le maintien de l'activité de base et l'intégrité fonctionnelle du cerveau.

Ces modifications au sein du système GABAergique peuvent se produire à tous les niveaux d'intégrations, des récepteurs GABA au réseau des interneurones.

3.2.3.1.1. Modification des GABAARs.

A ce jour, il y a plusieurs résultats indiquant que les fonctions des GABA_ARs sont altérées dans les ELT chez l'homme (Isokawa, 1996; Shumate et al., 1998). Ces altérations incluent des modifications dans la composition en sous-unité du récepteur comme des différences d'expressions des sous-unités α qui pourraient être responsables de changement allostérique avec les benzodiazépines (Koepp et al., 1996; Loup et al., 2000). Chez le modèle animal pilocarpine, on retrouve également une telle modification pendant l'épileptogénèse : le messager $\alpha 1$ diminue et celui de $\alpha 4$ augmente (Brooks-Kayal et al., 1998). Ces altérations sont associées à une augmentation du nombre de récepteurs contenant $\alpha 4\gamma 2$ et une réduction de ceux contenant $\alpha 1\gamma 2$ et un changement d'emplacement des récepteurs contenant $\gamma 2$ d'une localisation synaptique à perisynaptique (Zhang et al., 2007). Au cours de l'épileptogénèse, il existe donc des différences d'expressions et de localisations des sous-unités α qui conduisent à des changements de composition au niveau synaptique des GABA_ARs. Ces modifications peuvent être impliquées dans une diminution de la sensibilité aux benzodiazépines, et une diminution de l'inhibition phasique et tonique (Figure 29) (A. S. Cohen et al., 2003; Ellender et al., 2014; Gibbs et al., 1997). Finalement, d'autres modifications, que le changement de composition en sous-unité, pourraient altérer les réponses induites par les GABAARs, telles que l'intervention de facteurs intracellulaires, comme les processus de phosphorylation, d'adressage ou d'ancrage des récepteurs à la membrane. Le SE dans lequel les crises se répètent régulièrement entraîne également une diminution des GABAARs synaptiques mais provoquée par une augmentation de l'endocytose (Goodkin et al., 2005; Naylor et al., 2005). Ceci a été observé chez les animaux chez lesquels a été induit le SE expérimentalement. La perte de ces GABAARs synaptiques sensibles aux benzodiazépines peut aussi expliquer le développement rapide de la pharmacorésistance chez les patients avec un SE. Une étude récente montre aussi que la phosphorylation de la sous-unité $\beta 3$ est fortement diminuée pendant le SE, et entraîne une augmentation de l'association des récepteurs avec l'adaptateur à la clathrine AP2 et l'endocytose du GABAAR (Terunuma et al., 2008).

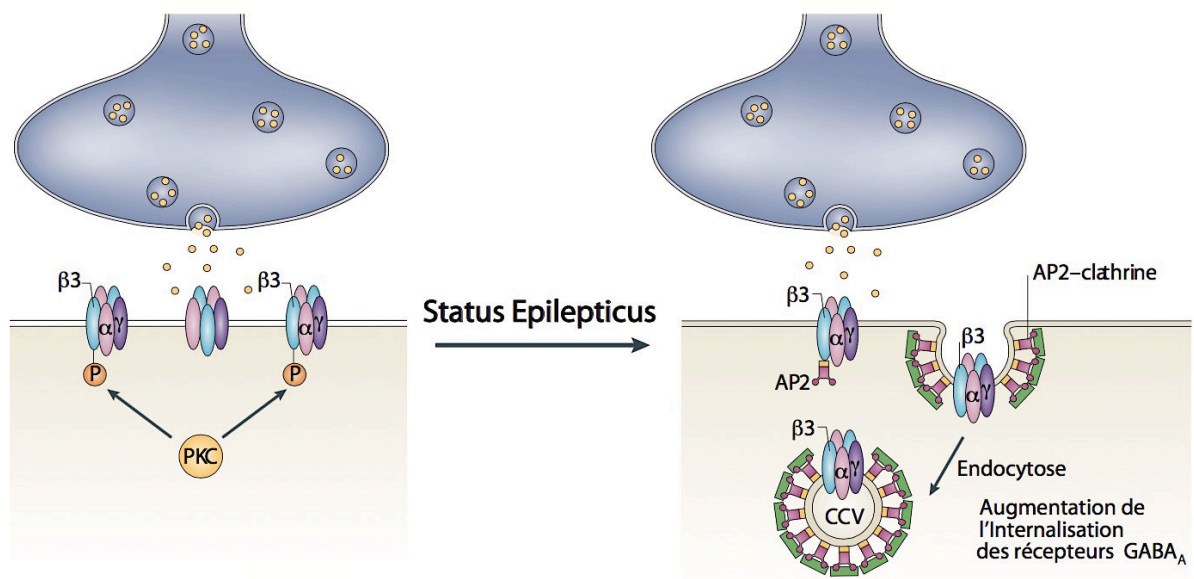


Figure 29. Défaut d'adressage des GABAARs dans l'épilepsie

La baisse de phosphorylation des GABAARs est responsable d'une augmentation de l'interaction des récepteurs avec la machinerie d'endocytose, provoquant une nette augmentation d'internalisation des récepteurs, d'après Jacob et al, 2008.

3.2.3.1.2. Renforcement de la transmission GABAergique.

Plusieurs études montrent que l'épilepsie peut être associée à une activité paroxystique de la transmission GABAergique. Dans différents modèles d'épilepsies, il existe une potentialisation de la réponse des synapses GABAergiques. Dans le modèle d'ELT pilocarpine, il est montré ainsi que certains interneurons GABAergiques de CA1 déchargent à une fréquence plus élevée (Cossart et al., 2001). Ce changement dans la transmission GABAergique peut être considéré soit comme une modification compensatoire à la diminution de l'inhibition ou s'il est associé avec un changement de la réponse GABAergique qui devient excitatrice à une source à part entière et directe pour l'hyperexcitabilité du réseau.

3.2.3.1.3. Homéostasie chlore et ELT.

La transmission GABAergique a la caractéristique unique de passer d'une action excitatrice à inhibitrice par un changement de la $[Cl^-]_i$ pendant le développement (Ben-Ari et al., 2007; C. Rivera et al., 1999). Des altérations de l'homéostasie

chlore ont été observées dans le tissu hippocampique épileptique chez les patients atteints d'ELT (I. Cohen et al., 2002) et dans les modèles animaux. Cette réponse dépolarisante, associée aux activités épileptiformes, provient d'un changement d'expression des co-transporteurs NKCC1 et KCC2 qui provoque une augmentation de la $[Cl^-]_i$ (Payne et al., 2003). Il est montré que les activités interictales diminuent l'expression de KCC2 et réduisent par conséquent la capacité d'extrusion du chlore des neurones (Figure 30). Il est également prouvé que les événements dépolarisants GABAergiques associés sont impliqués dans l'émergence de foyers épileptiques miroir (Khalilov et al., 2003; C. Rivera et al., 2004). Cette découverte peut expliquer en partie pourquoi les drogues agonistes du GABA sont inefficaces dans le traitement des ELT (Semah et al., 1998).

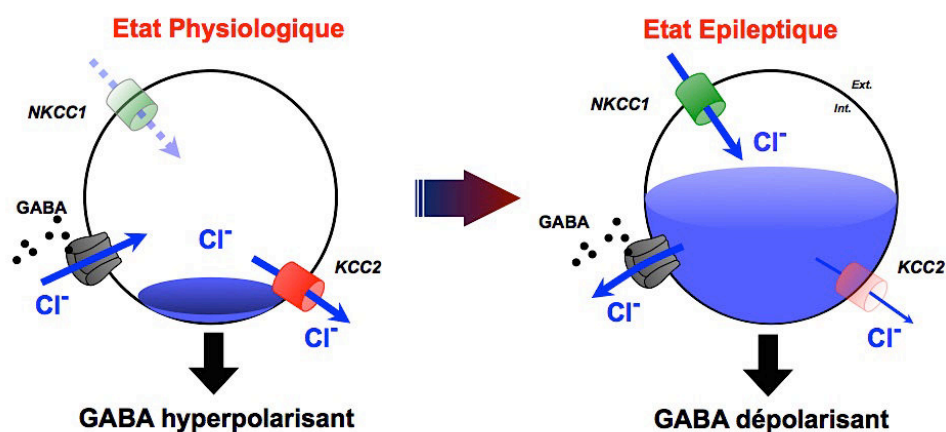


Figure 30. Switch de la réponse GABAergique dans l'épilepsie

Chez les animaux épileptiques, la baisse d'expression des co-transporteurs KCC2 entraîne une augmentation du chlore intracellulaire et une inversion de la polarité des réponses du GABA.

3.3. *mBDNF/proBDNF et épilepsie*

Plusieurs études ont montré que les neurotrophines et leurs récepteurs sont impliqués dans le développement de l'épilepsie et que leurs taux d'expression sont régulés par les crises. Différents mécanismes d'induction de crise, comme le kainate, la pilocarpine et le « kindling », induisent une augmentation du niveau de messenger du BDNF (Dugich-Djordjevic et al., 1992). Des analyses immunocytochimiques et protéiques montrent également qu'il y a un niveau élevé de proBDNF et mBDNF après crises dans l'hippocampe. Les crises augmentent

également l'expression de leurs récepteurs TrkB et p75NTR (Figure 31) (VonDran et al., 2014). L'augmentation du BDNF est principalement retrouvée dans les cellules pyramidales de l'hippocampe, les cellules granulaires du GD et dans les neurones des différentes couches corticales. La localisation d'expression du BDNF reste plutôt similaire dans les différents modèles, supportant le fait d'une réponse du BDNF conservée aux crises épileptiques. Chaque crise en elle-même est suffisante pour augmenter le taux de BDNF, bien que l'étendue de l'augmentation soit corrélée à la sévérité et à la durée des crises (Bengzon et al., 1993; Mhyre and Applegate, 2003; Rudge et al., 1998).

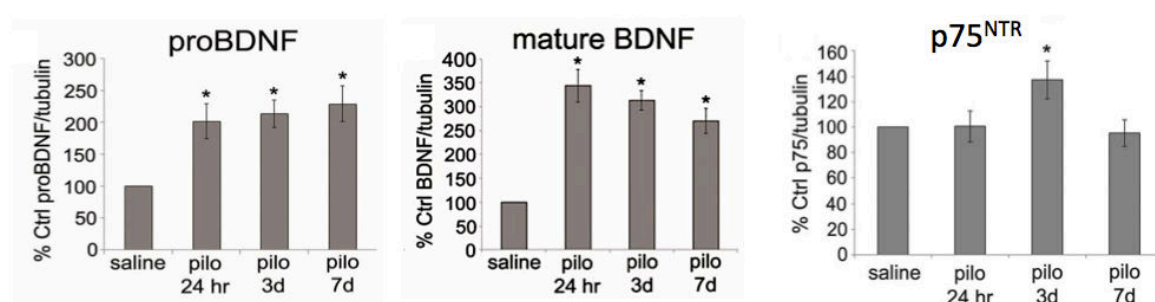


Figure 31. Niveau d'expression du proBDNF, mBDNF et p75NTR après crise

Les niveaux protéiques du BDNF sont élevés après 24h suivant l'injection de la pilocarpine et persistent jusqu'au septième jours. Les niveaux de p75NTR sont très élevés de manière aiguë à 3 jour, d'après VonDran, 2014.

Plusieurs mécanismes associés aux modifications morphofonctionnelles de l'épilepsie sont régulés par le BDNF dans le cerveau sain. Premièrement, la mort cellulaire, observée dans le cerveau épileptique et localisée à certaines régions, peut être due à l'activation du p75NTR préférentiellement par la forme immature de BDNF, le proBDNF. Il y a également les modifications axonales et dendritiques comme les mécanismes de synaptogenèse mis en place après les crises et où le BDNF est bien connu pour jouer un rôle que ce soit au niveau des régulations de la morphologie et de la croissance neuronale. Il pourrait ainsi être un élément important dans la réorganisation du réseau pendant l'épileptogenèse. Des études ont ainsi rapporté, que les souris mutantes hétérozygotes pour le BDNF avaient une suppression du développement d'embranchement par rapport aux souris contrôles, chez qui le blocage des voies de signalisation par un TrkB-IgG

réduisait également ce développement (Binder et al., 1999; He et al., 2002; Kokaia et al., 1995). Cependant, d'autres études montrent des résultats opposés, où l'infusion chronique de BDNF retarde l'apparition de l'embrasement et d'autres où l'application de shRNA BDNF aggrave les crises dans les modèles d'embrasement (Larmet et al., 1995; Reibel et al., 2000). Ces résultats sont donc convergents dans le fait que la voie de signalisation BDNF/TrkB est impliquée mais sont divergents sur les effets. De plus, il existe bien un autre niveau de complexité puisque le BDNF peut également être libéré et agir par son précurseur le proBDNF qui active son récepteur p75NTR. Il a notamment été montré récemment qu'un status epilepticus prolongé dans le modèle pilocarpine induisait une diminution d'expression de TrkB avec une augmentation concomitante de p75NTR et une augmentation résultante de la liaison avec proBDNF (Unsain et al., 2008). De plus, chez les souris KO p75NTR on retrouve, après induction de crises, une réduction de 80% du nombre de neurones en voie apoptotique, ce qui démontre le rôle significatif de ce récepteur dans la voie de mort neuronale (Troy et al., 2002).

Objectif de la thèse

Le GABA, principal neurotransmetteur inhibiteur, joue un rôle crucial dans le contrôle de l'excitabilité neuronale. Cependant, la transmission GABAergique est unique par son changement de polarité au cours du développement. Le GABA qui, en raison d'une concentration élevée de chlore intracellulaire dans les neurones immatures, va conduire à la dépolarisation et souvent à des actions excitatrices, au lieu d'une réponse hyperpolarisante et des actions inhibitrices dans les neurones matures. Ce changement de polarité de la réponse GABA, qui s'effectue de manière physiologique pendant le développement, peut également être modifié et inversé dans plusieurs conditions pathologiques. En effet, une altération du système GABAergique inhibiteur, qui passe d'inhibiteur à exciteur, a souvent été liée aux épilepsies. De nos jours, l'épilepsie est l'une des maladies neurologiques les plus fréquentes au monde, mais notre compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents reste incomplète. Les protocoles de traitements usuels se concentrent exclusivement sur la prévention ou la suppression des crises fournissant ainsi simplement des traitements symptomatiques sans combattre la cause de la maladie. Il y a un besoin urgent de trouver de nouveaux médicaments qui pourraient agir différemment sur les molécules cibles, ainsi que de nouveaux traitements qui viseraient à inhiber le processus de la genèse de l'épilepsie. L'épileptogenèse est l'ensemble des processus qui transforment un réseau neuronal sain en réseau épileptique chronique. Chez les patients atteints d'épilepsie et dans les modèles animaux, on observe plusieurs changements pathologiques dont la perte neuronale, la neurogenèse, le bourgeonnement axonal, et la réorganisation des réseaux neuronaux, qui font suite à une convulsion initiale. Ces réarrangements sont corrélés à un déséquilibre de la balance entre excitation et inhibition neuronale, pouvant expliquer les activités aberrantes épileptiformes. Nombre de ces modifications sont normalement régies par des facteurs de croissance neurotrophiques, en particulier le facteur neurotrophique dérivé du cerveau, le BDNF. En effet, les événements inauguraux, comme le status epilepticus dans le modèle animal, entraînent l'augmentation de l'expression de cette neurotrophine dans la phase d'épileptogenèse. De plus, certaines drogues antiépileptiques produisent une diminution de l'expression du BDNF dans le cerveau humain. Le BDNF peut être libéré par les neurones sous la forme de précurseur, le proBDNF ou sous sa forme mature, le mBDNF. Ces deux formes en agissant sur des

récepteurs membranaires distincts, respectivement le p75NTR et le TrkB, ont des actions physiologiques opposées. La littérature a montré largement les effets du mBDNF sur la transmission GABAergique. Cependant, il existe peu de données sur l'implication du proBDNF dans le système GABA mais il est fort possible qu'il puisse jouer un rôle important dans l'altération de l'activité GABAergique retrouvée dans l'épilepsie. Plus récemment, dans un contexte d'épilepsie du lobe temporal, il a été mis en évidence qu'une augmentation de proBDNF et de p75NTR apparaissait. Cependant, leurs effets sur le développement de l'épilepsie restent inconnus. Par conséquent, l'hypothèse à la base de mon projet de thèse est que le proBDNF et son récepteur, le p75NTR, seraient des candidats intéressants pour jouer un rôle dans l'épileptogenèse et dans la genèse des crises récurrentes qui font suite à la phase de latence. Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse s'est porté sur l'analyse des effets de l'accumulation de proBDNF *in vitro* et *in vivo* sur la transmission inhibitrice GABAergique et l'homéostasie chlore ainsi que sur les différents processus de l'épileptogenèse amenant à un réseau hyperexcitable.

Résultats

Article I :

**Pro-Brain-Derived Neurotrophic Factor inhibits
GABAergic neurotransmission by activating endocytosis
and repression of GABA_A receptors**

Pro-Brain-Derived Neurotrophic Factor Inhibits GABAergic Neurotransmission by Activating Endocytosis and Repression of GABA_A Receptors

Baptiste Riffault, Igor Medina,  Camille Dumon, Carine Thalman, Nadine Ferrand, Perrine Friedel, Jean-Luc Gaiarsa, and  Christophe Porcher

Aix-Marseille Université, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 901, and Institut de Neurobiologie de la Méditerranée, Parc Scientifique de Luminy, 13273 Marseille, France

GABA is the canonical inhibitory neurotransmitter in the CNS. This inhibitory action is largely mediated by GABA type A receptors (GABA_ARs). Among the many factors controlling GABAergic transmission, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) appears to play a major role in regulating synaptic inhibition. Recent findings have demonstrated that BDNF can be released as a precursor (proBDNF). Although the role of mature BDNF on GABAergic synaptogenesis and maintenance has been well studied, an important question still unanswered is whether secreted proBDNF might affect GABAergic neurotransmission. Here, we have used 14 d *in vitro* primary culture of hippocampal neurons and *ex vivo* preparations from rats to study the function of proBDNF in regulation of GABA_AR trafficking and activity. We demonstrate that proBDNF impairs GABAergic transmission by the activation of two distinct pathways: (1) a RhoA-Rock-PTEN pathway that decreases the phosphorylation levels of GABA_AR, thus affecting receptor function and triggering endocytosis and degradation of internalized receptors, and (2) a JAK-STAT-ICER pathway leading to the repression of GABA_AR synthesis. These effects lead to the diminution of GABAergic synapses and are correlated with a decrease in GABAergic synaptic currents. These results revealed new functions for proBDNF-p75 neurotrophin receptor signaling pathway in the control of the efficacy of GABAergic synaptic activity by regulating the trafficking and synthesis of GABA_ARs at inhibitory synapses.

Key words: BDNF; GABA_A receptors; intracellular trafficking; synaptic plasticity

Introduction

In the mature nervous system, the inhibitory action of GABA neurotransmitter is primarily mediated through GABA type A receptors (GABA_ARs). It has been reported that altered expression and function of GABA_ARs may contribute to major pathological conditions, including neurodegenerative diseases (Twelvetrees et al., 2010), cognitive disorders, addiction (Rudolph and Knoflach, 2011), and epilepsies (Ben-Ari et al., 2007), and to pharmacoresistance to benzodiazepines in epileptic patients (Tan et al., 2011). Additionally, enhancement of the inhibitory action of GABA_ARs has been widely used clinically for treatment of numerous neurological disorders, such as anxiety,

insomnia, agitation, seizures, muscle spasms, and alcohol withdrawal (Winsky-Sommerer, 2009; Rudolph and Knoflach, 2011; Tan et al., 2011; Skolnick, 2012). Therefore, understanding the mechanisms involved in regulation of cell-surface expression of GABA_ARs is of primary importance for both fundamental research and clinical application.

Among the many dependent regulators of the GABAergic system, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is of particular interest as it is released in response to GABAergic activity (Elmiah et al., 2004; Jovanovic et al., 2004; Carrasco et al., 2007; Porcher et al., 2011). In cultured hippocampal neurons, acute application of BDNF increases the cell-surface expression of GABA_ARs and enhances GABAergic synaptic transmission (Jovanovic et al., 2004; Porcher et al., 2011). In the hippocampal neuronal network, chronic release of BDNF enhances the formation and functional maturation of GABAergic synapses (Gubellini et al., 2005; Kuczewski et al., 2008b; Fiorentino et al., 2009). BDNF is expressed mainly by glutamatergic neurons and secreted through a regulated and constitutive pathway (Haubensak et al., 1998; Wu et al., 2004; Kuczewski et al., 2008a; Lessmann and Brigadski, 2009). BDNF is stored as proneurotrophin (proBDNF) within secretion vesicles (Lu, 2003). To produce mature BDNF (mBDNF), proBDNF is cleaved by furin in the *trans*-Golgi network (Mowla et al., 2001), or by extracellular plasmin or matrixmetalloprotease-7 once secreted (Lee et al.,

Received May 21, 2014; revised Aug. 1, 2014; accepted Aug. 28, 2014.

Author contributions: J.-L.G. and C.P. designed research; B.R., I.M., C.D., C.T., N.F., P.F., and C.P. performed research; B.R. and C.D. analyzed data; B.R., J.-L.G., and C.P. wrote the paper.

This work was supported by The National Institute of Health and Medical Research, the National Center for Scientific Research, and the National Agency for Research (Grant R07066AS 2008–2011). Confocal microscopy was performed at the imaging platform InMAGiC of the Institut de Neurobiologie de la Méditerranée (INSERM U901). We give special to Christophe Pellegrino for assistance in Western blotting, to François Michel for help with confocal microscopy, to Diabe Diabira for electrophysiology, and to the Tous Chercheurs Association for help with ELISA assays. We also thank Franck Chazal for critical reading of the manuscript.

The authors declare no competing financial interests.

Correspondence should be addressed to Christophe Porcher, INMED, INSERM U901, Parc scientifique de Luminy, BP 13, 13273 Marseille Cedex 09, France. E-mail: Christophe.porcher@inserm.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.2069-14.2014

Copyright © 2014 the authors 0270-6474/14/3413516-19\$15.00/0

2001). The proteolysis of proBDNF is regulated by neuronal activity that in turn determines the extracellular ratio between mBDNF and proBDNF (Lessmann and Brigadski, 2009; Nagapan et al., 2009; Yang et al., 2009). ProBDNF and mBDNF are assumed to produce opposing physiological responses mediated by the activation of two distinct classes of transmembrane receptors, the tropomyosin-related kinase receptor B (TrkB) and the p75 neurotrophin receptor (p75^{NTR}; Lee et al., 2001; Lu et al., 2005). Thus, the physiological action of BDNF is regulated by proteolytic cleavage, with proBDNF preferentially activating p75^{NTR} and mBDNF activating TrkB. Moreover, while the contribution of the mBDNF-TrkB signaling pathway to the development and maturation of GABAergic synapses is well established (Lessmann and Brigadski, 2009; Kuczewski et al., 2010), the questions of whether and how proBDNF/p75^{NTR} signaling affects GABAergic synapses are largely unanswered.

In this study we sought to examine the role of the proBDNF/p75^{NTR} signaling pathway in regulating GABAergic synaptic transmission by investigating GABA_AR $\beta_{2/3}$ subunit cell-surface stability, membrane trafficking, and GABAergic synaptic currents in primary culture of hippocampal neurons and acute hippocampal slices. Our results provide the first compelling evidence that proBDNF downregulates GABA_AR $\beta_{2/3}$ subunit surface expression through an increase in internalization and a decrease in synthesis.

Materials and Methods

All animal experiments were performed according to the guidelines set by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale animal welfare committee and the European Community Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC).

Primary cultures of rat hippocampal neurons. Hippocampal neurons from 18-d-old Wistar rat embryos were dissociated using trypsin and plated onto poly-ethylenimine-coated coverslips at a density of 70,000 cells per square centimeter in minimal essential medium (MEM) supplemented with 10% NU-Serum (BD Biosciences), 0.45% glucose, 1 mM sodium pyruvate, 2 mM glutamine, and 10 IU ml⁻¹ penicillin-streptomycin as previously described (Buerli et al., 2007). On days 10 and 13 of culture incubation, half of the medium was changed to MEM with 2% B27 supplement (Life Technologies).

Reagents and treatments. Primary hippocampal neuronal cultures (14 DIV) were treated with the following concentration of blockers and inhibitors, before being treated with an acute application of mBDNF or cleavage resistant proBDNF (CR-proBDNF): tetrodotoxine (TTX; 0.5 μ M, 1 h), 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfonyl-benzo[f]quinoxaline (NBQX; 5 μ M, 10 min), D-APV (40 μ M, 10 min). Cultures were then stimulated with CR-proBDNF (25 ng, 30 min) in the presence or absence of mBDNF (25 ng, 10 min). For sustained stimulation with endogenous proBDNF, cultures were treated with aprotinin (3 μ g/ml) alone. In some experiments, cultures were incubated for ≥ 40 min before stimulation with K252a (200 nM), TAT-pep5 (2 μ M), nifedipine (10 μ M), leupeptine (5 μ g/ml), AG490 (50 μ M), ROCK (Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase) inhibitor (ROCKi; 50 μ M) or Stattic (10 μ M). All reagents were applied directly from stock solutions into culture medium or artificial CSF (ACSF) for electrophysiological experiments.

ProBDNF immunoassay. To measure the release of proBDNF from hippocampal neuronal cultures, 2 ml fractions of the supernatant were collected. The fractions were concentrated using the Amicon Ultra concentration devices (4000 $\times$ g, 10 min; Millipore), with 100 μ l of final volume. The proBDNF Rapid ELISA Kit (Biosensis) was used to quantify the amount of proBDNF in the concentrated solutions following the manufacturer's protocol. Experiments and analysis were done blind.

Transfections. Transfections of 10 DIV neuronal cultures were performed as described previously (Buerli et al., 2007). For transfection of cultures in 35 mm dishes, 300 μ l of Opti-MEM media were mixed with 7 μ l of Lipofectamine 2000 reagent (Life Technologies), 1 μ l of Magneto-

fection CombiMag (OZ Biosciences), and 1.5 μ g of pcDNAs. The mixture was incubated 15 min at room temperature (RT) and thereafter distributed dropwise above the neuronal culture. Culture dishes were placed on a magnetic plate (OZ Biosciences) and incubated 45 min at 37°C. Transfection was terminated by the substitution of 80% of the incubation solution with fresh culture media. Neurons were used in experiments 4 d after transfection.

Electrophysiological recordings of mIPSCs on neuronal cultures. Electrophysiological recordings from neurons were performed at 14 DIV (4 d after transfection). At this age, cultured neurons achieved a developmental stage characterized by the steady-state level of the expression of GABA_ARs (Swanwick et al., 2006), the slowing of dendrite growth, and the beginning of spine formation (Huang et al., 2005). Neurons were continuously perfused with an extracellular solution containing the following (in mM): 150 NaCl, 2.5 KCl, 2.5 HEPES, 20 D-glucose, 2.0 CaCl₂, 2.0 MgCl₂, 0.001 TTX, 0.01 CNQX, pH 7.4, at 1 ml/min. Recording electrodes (4–6 M Ω) were filled with a solution containing the following (in mM): 140 CsCl, 10 HEPES, 2.5 MgCl₂, 4 Na₂-ATP (adenosine triphosphate), 0.4 Na-GTP (guanosine triphosphate), 10 mM sodium phosphocreatine, 0.6 mM EGTA, pH 7.2. Recordings were made using an Axopatch-200A amplifier and pCLAMP acquisition software (Molecular Devices). Series resistance was compensated electronically. Data were low-pass filtered at 2 kHz and acquired at 10 kHz. Miniature postsynaptic currents were analyzed blindly using Mini Analysis software (Synaptosoft). All experiments were performed at 22–24°C. Cumulative distributions were generated using 100 consecutive mIPSCs, averaged across all cells.

Western blotting. Neuronal cells and hippocampi were homogenized in RIPA buffer (150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 50 mM Tris HCl, pH 8, containing protease inhibitors (Complete Mini, Roche)). Lysates were centrifuged (10,000 $\times$ g for 10 min at 4°C) and the supernatant was heated at 90°C for 5 min with Laemmli loading buffer. Loading was 20 μ g of proteins as determined using a modified Bradford reaction (Bio-Rad Laboratories). Proteins were separated in 7–15% SDS-PAGE and electrophoretically transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked with 5% bovine serum albumin (BSA) in TBS 0.1% Tween 20 (TBST) for 2 h at RT, then incubated with primary antibodies diluted in TBST containing 3% BSA overnight at 4°C or 2 h at RT. Blots were probed with antibody against phospho-GABA_AR β_3 (pGABA_AR β_3 , rabbit, Ser408/409, PhosphoSolutions), GABA_AR β_3 (mouse, Millipore Bioscience Research Reagents), EEA1 (early endosome antigen 1; rabbit; Cell Signaling Technology), inducible cAMP early repressor (ICER; Crem1, rabbit; Santa Cruz Biotechnology), p75^{NTR} (mouse; Biosensis), tubulin (β -tubulin; mouse; Sigma-Aldrich), PTEN (phosphatase and tensin homolog on chromosome 10; mouse; Millipore), and phospho-PTEN (pPTEN; rabbit T366, Abcam). After washing with TBST, membranes were incubated with HRP-conjugated secondary antibodies diluted in TBST containing 3% BSA for 60 min, washed with TBST, and then developed using the G:BOX gel imaging system (Syngene). Expression levels were estimated by ImageJ software (National Institutes of Health, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Immunocytochemistry and confocal microscopy. Hippocampal cultures (75,000 cells/cm², DIV 14) were treated as described above and fixed in 4% PFA-sucrose for 10 min. Coverslips were washed in PBS for 15 min and incubated in 0.2 M glycine for 10 min. Blocking was done in 1% BSA/0.5% Triton X-100 in PBS for 30 min to permeabilize cells and reduce nonspecific binding. Cultures were washed and incubated with goat anti-p75^{NTR} (1:500; R&D Systems) or rabbit anti-caspase-3 cleaved (1:500; Cell Signaling Technology) or rabbit anti-EEA1 (1:500; Cell Signaling Technology) and anti- $\beta_{2/3}$ antibody (1:200; clone bd17; Millipore) coupled to chicken anti-MAP2 (anti-microtubule-associated protein 2; 1:2000; Sigma-Aldrich) antibodies in PBS overnight at 4°C. For analysis of cell-surface GABA_ARs and GABAergic synapses, nonpermeabilized neurons were first incubated with anti- $\beta_{2/3}$ antibody (1:200; clone bd17; Millipore) overnight at 4°C. Coverslips were washed in PBS for 15 min and permeabilized in 0.5% Triton–1% BSA in PBS for 10 min. Neurons were then incubated with primary antibodies using rabbit anti-VAMP1 (vesicle-associated membrane protein 1; 1:2000; Synaptic Systems) and donkey anti-MAP2 (1:2000; Sigma-Aldrich) for 2 h at RT.

Primary antibodies were visualized after staining with the appropriate goat anti-mouse, anti-rabbit, and anti-donkey IgG conjugated to Alexa488 (1:1000; FluorProbes), Alexa555 (1:1000; FluorProbes), and Cy5, respectively (1:2000, Millipore Bioscience Research Reagents), in 1% BSA/PBS for 60 min. Cultures were washed and coverslips mounted using Vectashield (Vector). Sequential acquisition of immunoreactivity of pyramidal-like cells was performed using laser scanning confocal microscope (Zeiss LSM 510 Meta) with a 40× or 63× oil-immersion objectives. In each set of images, laser light levels and detector gain and offset were adjusted to avoid any saturated levels. Confocal micrographs are digital composites of a Z-series scan of 4–6 optical sections through a depth of 4–5 μm .

Immunofluorescence analysis. For each experimental condition, the density, area, and colocalization of puncta were determined from confocal images using the ImageJ software. Immunopositive puncta were defined as immunoreactivity $>0.1 \mu\text{m}^2$ present along the soma and the first 20 μm length of the primary process. For GABA_AR $\beta_{2/3}$ cell-surface expression, the labeled area fraction of positive pixels for GABA_AR $\beta_{2/3}$ was measured and reported to the area fraction of positive pixels for MAP2. Colocalization was analyzed by determining the percentage of individual $\beta_{2/3}$ subunit-positive puncta that were in close apposition to VAMP1 immunoreactive puncta. This value was divided by the area fraction of positive pixels for MAP2. All of the images were analyzed blindly.

Phospho-cAMP response element-binding protein activation. The procedure for phospho-cAMP response element-binding protein (phospho-CREB) activation and immunocytochemistry was similar to that described previously (Kuczewski et al., 2008a). Cultures were stimulated with CR-proBDNF (30 min) in the absence or presence of mBDNF (10 min) with or without K252a. Thirty minutes after stimulation, neurons were fixed for 10 min with PFA-sucrose at 4°C and rinsed several times with PBS. Coverslips were then preincubated in 0.1% Triton, 3% goat serum, and PBS for 60 min at RT and incubated overnight with mouse anti-CREB (1:1000), rabbit anti-phospho-CREB (anti-pCREB; 1:1000; both from Cell Signaling Technology), and chicken anti-MAP2 (1:2000; Sigma-Aldrich) antibodies. Immunoreactivities for pCREB, CREB, and MAP2 were visualized and analyzed as described above using the laser scanning confocal microscope (Zeiss LSM 510 Meta). The optical sections were digitized (1024 × 1024 pixels) and processed using ImageJ software. For analysis of the intensity of pCREB staining in neuronal cells, we first created a binary mask from MAP2-positive cells and then analyzed pCREB intensity only in regions overlapping the binary mask. Acquisition parameters were the same for every set of experiments. The pCREB-to-CREB intensity ratio was expressed as the mean ratio of the pCREB-Alexa Fluor 488/CREB-Alexa Fluor 555 staining intensity. All data were expressed as percentage of control values obtained from sister nonstimulated cultures. All of the images were analyzed blindly.

ICER activation. Cultures (14 DIV) were stimulated overnight with aprotinin (12 h) or treated with CR-proBDNF (30 min) as described above, in the absence or presence of TAT-pep5. After stimulation, neurons were treated as previously described and incubated overnight with rabbit anti-CREB1 (1:100; ICER; Santa Cruz Biotechnology) and chicken anti-MAP2 (1:2000; Sigma-Aldrich) antibodies. Immunoreactivities for ICER and MAP2 were visualized and analyzed as described above. The intensity of ICER staining in neuronal cells was expressed as the mean ratio of the ICER-Alexa Fluor 555/MAP2-Alexa Fluor 488 staining intensity. All data were expressed as percentage of control values obtained from sister nonstimulated cultures. All of the images were analyzed blindly.

Determination of GABA_AR cell-surface levels using ELISA. Changes in surface and total levels of GABA_AR were analyzed using a cell-surface ELISA assay as described previously (Jovanovic et al., 2004; Porcher et al., 2011). Hippocampal neurons were cultured in 24-well plates at a density of 100,000 cells/cm² for 14 DIV. Cultures were treated as described above and fixed using 4% PFA/4% sucrose/PBS (4% PFA-sucrose) for 10 min. Cultures were washed with PBS followed by HBSS (Invitrogen). Nonspecific cell-surface binding of antibody was reduced by incubating cultures for 30 min in 1% BSA/10% rabbit serum/HBSS. In those cultures where total protein levels were evaluated, cells were permeabilized and nonspe-

cific binding blocked by incubating with 0.5% Triton/1% BSA/10% rabbit serum/HBSS for 30 min. Cultures were incubated with anti-GABA_AR $\beta_{2/3}$ antibody (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$; bd17 clone; Millipore) overnight at 4°C. After washing and nonspecific binding block as described above, cultures were incubated with anti-mouse IgG conjugated to HRP (1:5000, Pierce) for 60 min. Cultures were extensively washed and a color substrate 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (Sigma-Aldrich) reagent added for 15 min until sufficient color reaction had developed. Absorbances were read at $\lambda = 655 \text{ nm}$ using a spectrophotometer (Fluostar Optima, BMG Labtech). Controls lacking the primary antibody were routinely used to determine background levels of peroxidase and nonspecific binding of the secondary antibody.

Relative quantitative expression of mRNA transcripts. Hippocampal neuronal cultures were treated as described above. At 14 DIV, RNA was isolated using a Qiagen RNeasy kit following the manufacturer's instructions, quantified by reading the absorbance at 260 nm (NanoPhotometer, Implen), and converted to cDNA using 1 μg of RNA according to manufacturer's instructions (QuantiTect Reverse Transcription kit, Qiagen). PCR was performed with the LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche Applied Science) with 1 μl of cDNA using the following oligonucleotides (QuantiTect Primer Assays; Qiagen): GABA_AR β_3 subunit (*Gabra3*; QT00195902), cAMP responsive element modulator 1 (*Crem1*; QT00370370), p75^{NTR} (*Ngfr*; QT00181874), and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*; QT001199633). Relative mRNA values were calculated using the LC480 software by using *GAPDH* as the housekeeping gene. PCR was performed in replicates of three.

In vivo injection. Before intracerebroventricular injection, the rats of either sex were anesthetized at birth by 3% isoflurane mixed with pure oxygen and placed in a stereotaxic frame. Tissue-type plasminogen activator-Stop (tPA-Stop) was dissolved at 6 mM in 0.9% sodium chloride. A Hamilton syringe was inserted 3 mm deep, perpendicular to the skull surface and 5 mm rostral and 3 mm lateral from the lambda. Intracerebroventricular injection (3 μl) was administered over 60 s. The needle was kept immobilized for 2 min before withdrawal. Control animals received PBS with 0.4% BSA. The validity of injection was determined by using blue dye dissolved in the injected solution. After the injection, the animals were left for 48 h before starting electrophysiological recordings.

Slices preparation. Electrophysiological recordings from hippocampal slices were performed from 2-d-old rats (i.e., 2 d after intracerebroventricular injections of tPA-Stop) as previously described (Kuczewski et al., 2008b). Brains were removed and immersed into ice-cold (2–4°C) ACSF with the following composition (in mM): 126 NaCl, 3.5 KCl, 2 CaCl₂, 1.3 MgCl₂, 1.2 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, and 11 glucose, pH 7.4, equilibrated with 95% O₂ and 5% CO₂. Hippocampal slices (600 μm thick) were cut with a McIlwain tissue chopper and kept in ACSF at RT (25°C) for $\geq 1 \text{ h}$ before recording. Slices were then transferred to a submerged recording chamber perfused with ACSF (3 ml/min) at 34°C.

Electrophysiological recording on hippocampal slices. Whole-cell patch-clamp recordings of CA3 pyramidal neurons were performed with an Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices). Microelectrodes (4–8 M Ω) were filled with a recording solution with the following composition (in mM): 110 CsCl, 30 K-gluconate, 10 HEPES, 1.1 EGTA, 0.1 CaCl₂, 4 MgATP, and 0.3 NaGTP. Series resistance was assessed repetitively in response to a 5 mV pulse and compensated up to 70% throughout the recording. Cells exhibiting $>20\%$ change in series resistance were excluded from analysis. mIPSCs were isolated in the presence of the ionotropic glutamatergic receptor antagonists (5 μM NBQX, 40 μM D-APV) and TTX (1 μM) and recorded at a holding potential of -70 mV . In some experiments, the identity of the mIPSCs was confirmed by exogenous application of gabazine (5 μM) at the end of the recording session. The currents were recorded with Axoscope 8.1 software (Molecular Devices) and analysis of mIPSCs was performed blindly using the Mini Analysis Program 6.0 software (Synaptosoft). The absence of false-positive events was confirmed by visual inspection of each experiment. Cumulative distributions were generated using 100 consecutive mIPSCs, averaged across all cells. One hundred random points selected from each cell were concatenated to describe the cumulative distributions of events in each condition and then compared by Kolmogorov–Smirnov test.

Statistical analysis. If not stated otherwise, all population data are expressed as mean $\pm$ SEM. Paired Student's *t* test was used to compare statistical significance between groups in ELISA experiments and unpaired Student's *t* test was used to examine the statistical significance of the differences between groups in microscopy and qRT-PCR analysis; ANOVA was used for multiple comparisons. Cumulative distributions were compared using the Kolmogorov–Smirnov two-sample test. Significantly different values (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) are indicated in figures with asterisks.

Drugs. TTX was purchased from Abcam; ROCKi (Y-27632) was purchased from Millipore; tPA-Stop was purchased from American Diagnostica; k252a, TAT-pep5, and Stattic were purchased from Calbiochem; nifedipine, aprotinin, leupeptin, and AG490 were purchased from Sigma-Aldrich; CR-proBDNF recombinant (*Escherichia coli*) mutated human and mBDNF were purchased from Alomone Labs. NBQX, CNQX, and D-APV were obtained from the Molecular, Cellular, and Genomic Neuroscience Research Branch of the National Institute of Mental Health.

Results

Exogenous CR-proBDNF decreases cell-surface expression of GABA_AR clusters

As a first attempt to determine whether proBDNF may affect the stability of GABA_ARs at the cell surface, we examined the effect of an acute application of exogenous CR-proBDNF. At 14 DIV, hippocampal cultures were preincubated with TTX (1 h, 0.5 μ M), NBQX (10 min, 5 μ M) and D-APV (10 min, 40 μ M) to reduce regulated secretion of endogenous BDNF triggered by spontaneous activity. This treatment was followed by the addition of CR-proBDNF (25 ng/ml) for 30 min. Immunohistochemistry using the GABA_AR $\beta_{2/3}$ -specific antibody, in combination with anti-MAP2 antibody, allowed a semiquantitative analysis of GABA_AR $\beta_{2/3}$ levels at the surface of pyramidal-like neurons in which the ratio GABA_AR $\beta_{2/3}$ /MAP2 and the average GABA_AR $\beta_{2/3}$ perimeter were quantified in the somatic and proximal dendritic regions. The application of CR-proBDNF resulted in a significant decrease of GABA_AR $\beta_{2/3}$ surface levels ($47.40 \pm 3.7\%$ surface ratio; $p = 0.0003$ compared with control, 35 neurons analyzed, $n = 4$; Fig. 1*A,B*). This effect was abolished in the presence of TAT-pep5 (2 μ M), a cell-permeable inhibitor of p75^{NTR} signaling ($109.02 \pm 3.5\%$ surface ratio compared with control; $p = 0.167$, 35 neurons analyzed, $n = 4$; Fig. 1*A,B*). The average perimeter of GABA_AR $\beta_{2/3}$ clusters was also decreased in response to CR-proBDNF ($0.29 \pm 0.02 \mu\text{m}^2$ in control vs $0.18 \pm 0.01 \mu\text{m}^2$ in CR-proBDNF; $p = 0.0005$ compared with control, 35 neurons analyzed, $n = 4$; Fig. 1*C*), an effect prevented by TAT-pep5 ($0.27 \pm 0.03 \mu\text{m}^2$; $p = 0.298$ compared with control, 35 neurons analyzed, $n = 4$; Fig. 1*C*).

Reductions in the perimeter of GABA_AR $\beta_{2/3}$ clustering at the cell surface observed with CR-proBDNF treatment may be due to an increased lateral mobility from synaptic sites to extrasynaptic sites (Thomas et al., 2005; Goffin et al., 2010; Luscher et al., 2011), without decrease in the total membrane levels. It also may reflect an internalization of the cell-surface receptors to the cytoplasm, and/or a decrease in addressing receptors into the cell membrane. To confirm decrease in membrane expression, we performed a quantitative measurement of these changes using cell-surface ELISA experiments with the same GABA_AR $\beta_{2/3}$ -specific antibody (Jovanovic et al., 2004; Porcher et al., 2011). Addition of CR-proBDNF (25 ng/ml, 30 min) led to a decrease in cell-surface expression of the $\beta_{2/3}$ subunit ($78.37 \pm 4.9\%$ of control non-stimulated cultures, $p = 0.0008$, $n = 4$; Fig. 1*D*). This effect was dependent on the activation of p75^{NTR} by the CR-proBDNF as it was abolished in the presence of TAT-pep5 (2 μ M, $104.23 \pm 3.8\%$

compared with control, $p = 0.314$, $n = 4$; Fig. 1*D*). No significant difference was observed in the total levels of GABA_AR $\beta_{2/3}$ subunit between control and treated cultures (Fig. 1*E*).

We also investigated, by qRT-PCR analysis, whether the application of CR-proBDNF could affect the level of mRNA transcripts encoding for GABA_AR subtypes containing β_3 subunits. No significant differences were found between GABA_AR β_3 mRNA levels in control and proBDNF-treated cultures (Fig. 1*F*).

Thus, a continuous 30 min activation of p75^{NTR} by exogenous application of CR-proBDNF leads to a significant decrease in cell-surface expression and perimeter of GABA_AR $\beta_{2/3}$ and does not change the level of GABA_AR transcripts and proteins.

Endogenous accumulation of proBDNF decreases the density of GABAergic synapses and the size of GABA_AR $\beta_{2/3}$ clusters

To examine whether endogenous proBDNF modulates GABAergic synaptic connectivity, we investigated the effects of aprotinin (3 μ g/ml, 12 h), a serine protease inhibitor that blocks plasmin activity and prevents the extracellular cleavage of proBDNF into mBDNF (Lee et al., 2001). To confirm that aprotinin prevents conversion of proBDNF into mBDNF, we measured the concentration of proBDNF in hippocampal neuronal culture supernatants in control and aprotinin conditions using an ELISA proBDNF immune-detection assay. As illustrated in Figure 2*A*, endogenous proBDNF levels upon treatment with aprotinin (3 μ g/ml, 12 h) increased significantly (57.45 ± 0.39 pg/ml) compared with control (4.0 ± 1.15 pg/ml; $p < 0.0001$, $n = 3$).

To identify functional GABAergic synapses, we performed double immunostaining against synaptobrevin (VAMP1), a marker of functional presynaptic membranes (Weber et al., 1998) and postsynaptic cell-surface expression of GABA_AR $\beta_{2/3}$ clusters (Chih et al., 2005; Yu et al., 2007; Goffin et al., 2010). We counted the density of presynaptic and postsynaptic marker apposition at the somatodendritic level of MAP2-positive neurons. The level of colocalized clusters between VAMP1 and GABA_AR $\beta_{2/3}$ of MAP2-positive cells was estimated in control condition ($33.8 \pm 3.4\%$, 35 neurons analyzed, $n = 4$; Fig. 2*B,C*). After 12 h treatment with aprotinin, we observed a significant decrease in the colocalization between GABA_AR $\beta_{2/3}$ clusters expressed at the cell-surface and VAMP1-positive presynaptic terminals ($25.2 \pm 1.6\%$, $p = 0.0007$ compared with control, 35 neurons analyzed, $n = 4$; Fig. 2*B,C*). This decrease in colocalized puncta between postsynaptic GABA_AR $\beta_{2/3}$ and presynaptic VAMP1 staining was prevented by treatment of cell cultures with TAT-pep5 before application of aprotinin ($30.8 \pm 2.1\%$, $p = 0.216$ compared with control, 35 neurons analyzed, $n = 4$; Fig. 2*B,C*).

The observed reduction in the density of GABAergic synapses may reflect a decrease in postsynaptic cell-surface expression of GABA_AR clusters, as observed previously during acute application of CR-proBDNF, and/or a reduction in the number of presynaptic terminals. To evaluate these possibilities, we performed detailed quantitative analysis of the area fraction of VAMP1 and GABA_AR $\beta_{2/3}$ puncta of MAP2-positive neurons, following treatment with aprotinin. Our analysis revealed a significant decrease in the area fraction and average perimeter of surface GABA_AR $\beta_{2/3}$ -positive puncta following activation of the proBDNF/p75^{NTR} pathway. After treatment with aprotinin, the area fraction and perimeter were respectively $49.9 \pm 6.4\%$ and $51.4 \pm 8.6\%$ of control ($p = 0.0009$, 35 neurons analyzed, $n = 4$; Fig. 2*B,D,E*). Both effects were prevented by TAT-pep5 ($p = 0.345$ compared with control, 35 neurons analyzed, $n = 4$; Fig. 2*B,D,E*).

To assess changes in presynaptic terminals, we analyzed the area fraction of VAMP1-positive puncta of MAP2-positive neu-

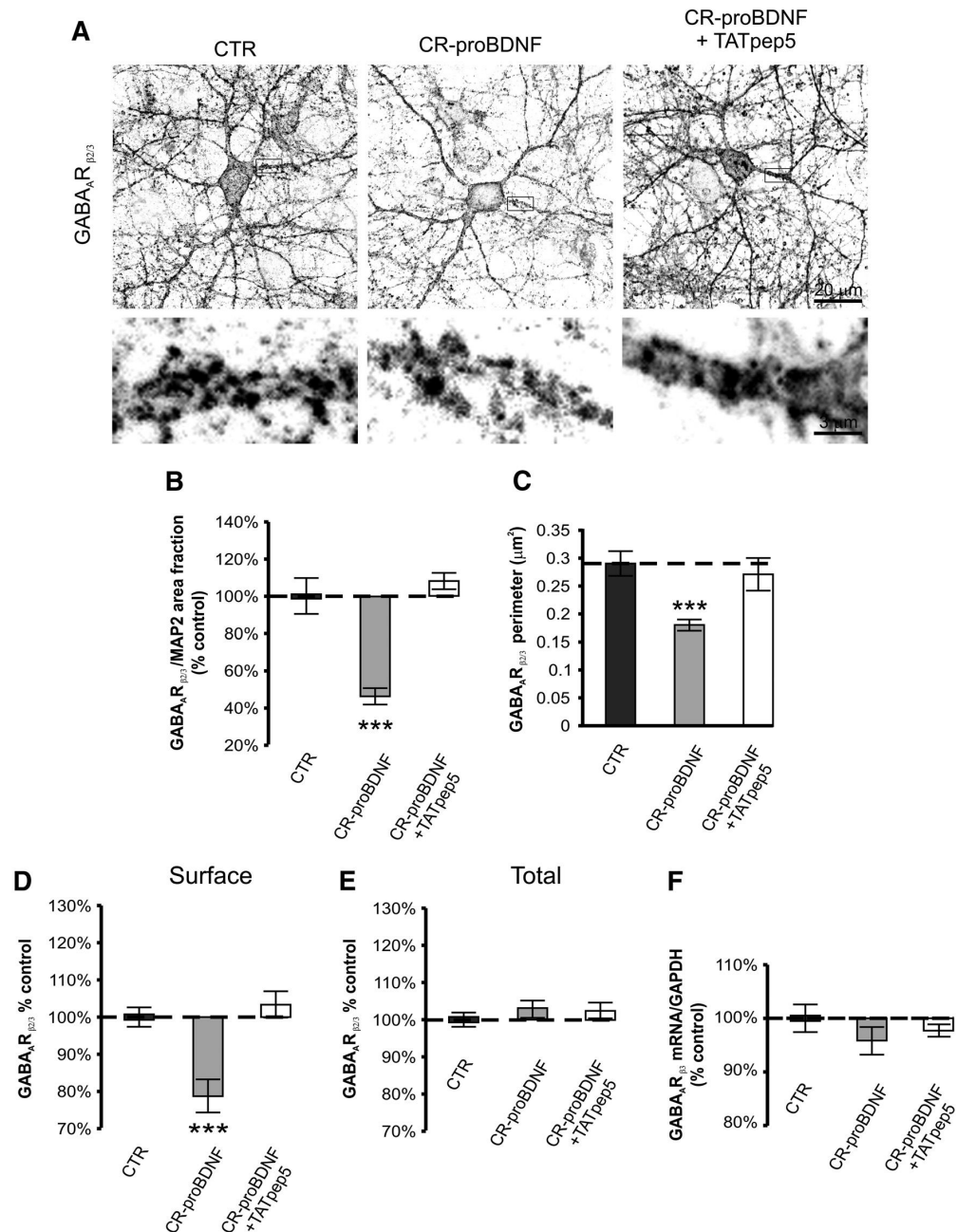


Figure 1. Exogenous application of CR-proBDNF downregulates GABA_A cell-surface expression. **A**, Cultured neurons (14 DIV), in control conditions (CTR), or treated with CR-proBDNF (CR-proBDNF) or CR-proBDNF plus TAT-pep5 (CR-proBDNF + TAT-pep5) and immunolabeled with GABA_Aβ_{2/3} subunit-specific mouse monoclonal antibody to reveal expression at the cell surface, and following permeabilization, immunolabeled with anti-MAP2 chicken polyclonal antibody (data not shown) to reveal neuronal cells. Scale bars: top, 20 μm; bottom, 3 μm. **B**, **C**, Quantification of surface GABA_Aβ_{2/3}/intracellular MAP2 fluorescence ratio (**B**) and the average perimeter of GABA_Aβ_{2/3} clusters (**C**) at the cell surface in the proximal dendrites and soma of MAP2-positive neurons, treated with CR-proBDNF alone (25 ng, 30 min), or CR-proBDNF plus TAT-pep5 (CR-proBDNF + TAT-pep5; 2 μM), in comparison with the vehicle-treated control (CTR). Thirty-five neurons analyzed per condition, $n = 4$; *** $p < 0.001$. **D**, Cell-surface levels of GABA_ARs measured using ELISA assays with GABA_Aβ_{2/3} subunit-specific antibody in neurons treated with CR-proBDNF alone (25 ng, 30 min), or in the presence of TAT-pep5 (CR-proBDNF + TAT-pep5; 2 μM), and expressed as a percentage of vehicle-treated controls (CTR). **E**, Total GABA_Aβ_{2/3} subunit expression normalized to control nontreated conditions. The total level of β_{2/3} subunit levels remains unchanged. $n = 4$; *** $p < 0.001$. **F**, Relative expression of GABA_Aβ₃ gene in neurons treated with CR-proBDNF alone (25 ng, 30 min), or in the presence of TAT-pep5 (CR-proBDNF + TAT-pep5; 2 μM), and expressed as a percentage of vehicle-treated controls (CTR). GABA_Aβ₃ gene expression was normalized to the expression of the housekeeping gene, GAPDH, in the same RNA preparation. $n = 6$; $p > 0.05$.

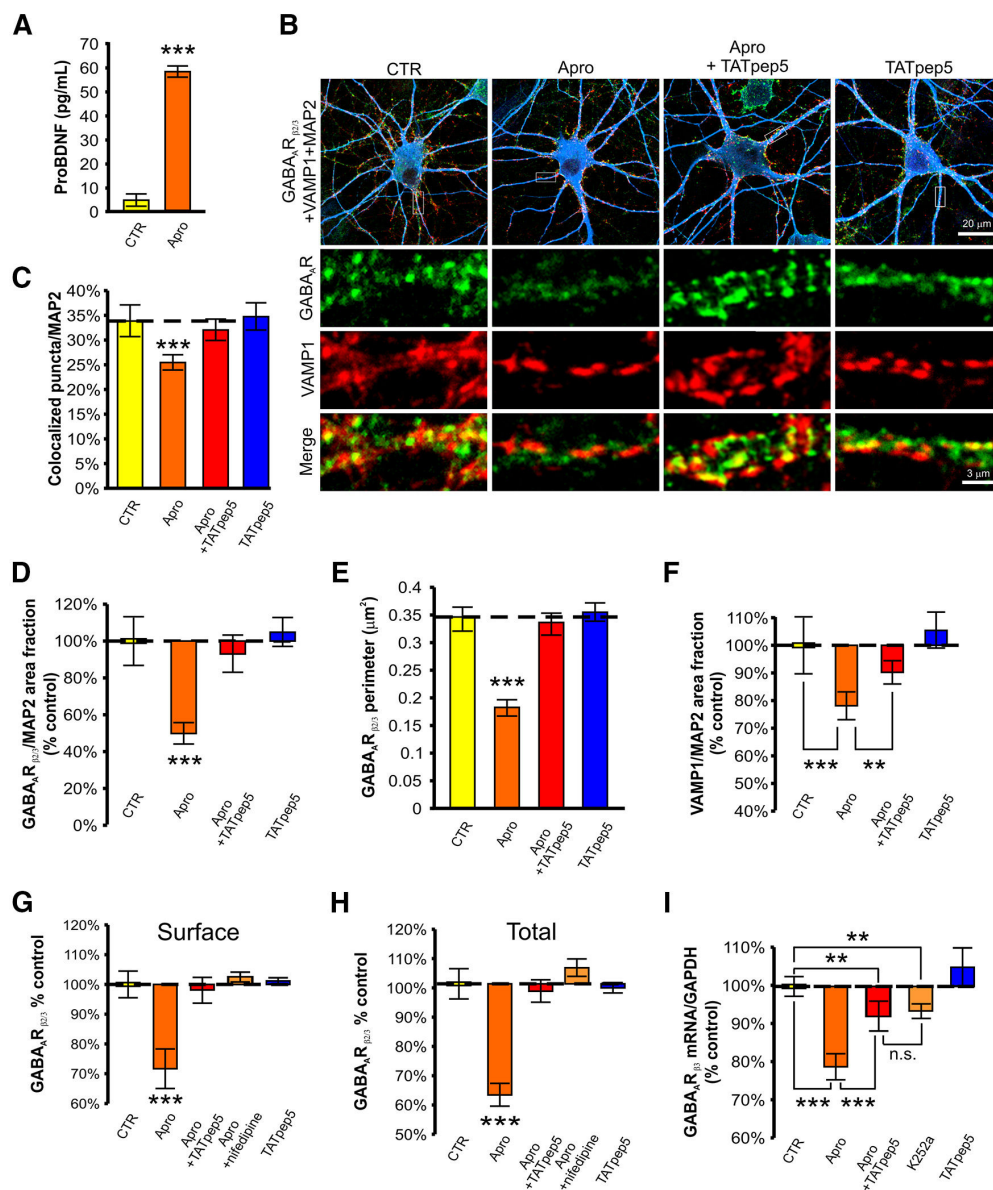


Figure 2. Endogenous proBDNF decreases the colocalization of postsynaptic GABA_A β_{2/3} clusters with presynaptic VAMP1 puncta. **A**, proBDNF protein levels in hippocampal culture supernatants in control and aprotinin conditions. Treatment with aprotinin (Apro; 3 μg/ml, 12 h) increases significantly the concentration of proBDNF in the supernatant compared with control (CTR). *n* = 3; ****p* < 0.001. **B**, Hippocampal cultures (14 DIV) were treated for 12 h with vehicle (CTR), aprotinin (Apro), aprotinin plus TAT-pep5 (Apro + TATpep5), or TAT-pep5 alone, and stained for GABA_A β_{2/3} subunit (green), VAMP1 (red), and MAP2 (blue). Scale bars: top, 20 μm; bottom, 2 μm. **C**, The percentage of β_{2/3} subunit-positive clusters that colocalized with VAMP1 puncta/intracellular MAP2 fluorescence ratio was significantly reduced in cultures treated with aprotinin (3 μg/ml, 12 h). **D**, **E**, Aprotinin (Apro) significantly decreased the average β_{2/3} subunit-positive area fraction/intracellular MAP2 fluorescence ratio (**D**) and the average perimeter of GABA_A β_{2/3} clusters (**E**) at the cell surface of MAP2-positive neurons, in comparison with the vehicle-treated control (CTR), in the presence of TAT-pep5 (Apro + TATpep5) or TAT-pep5 alone (TATpep5). Thirty-five neurons analyzed per condition, *n* = 4; ****p* < 0.001. **F**, Quantification of surface VAMP1/MAP2 fluorescence ratio, in neurons treated with aprotinin alone (Apro), aprotinin plus TAT-pep5 (Apro + TATpep5), or TAT-pep5 alone (TATpep5; 2 μm), in comparison with the vehicle-treated control (CTR). Thirty-five neurons analyzed per condition, per experiment; *n* = 4; ****p* < 0.001, ***p* < 0.01. **G**, Cell-surface levels of GABA_ARs measured using ELISA assays with GABA_A β_{2/3} subunit-specific antibody in neurons treated with aprotinin alone (Apro; 3 μg/ml, 12 h), with Apro in the presence of TAT-pep5 (Apro + TATpep5; 2 μm), with Apro and nifedipine (Apro + nifedipine; 10 μm), and only in the presence TAT-pep5 (TAT-pep5; 10 μm), and expressed as a percentage of vehicle-treated controls (CTR). **H**, Total GABA_A β_{2/3} subunit expression normalized to control nontreated conditions. *n* = 6; ****p* < 0.001. **I**, Relative expression of GABA_A β_{2/3} mRNA transcripts in neurons treated with aprotinin (Apro; 3 μg/ml, 12 h), with aprotinin and TAT-pep5 (Apro + TATpep5; 2 μm), with K252a alone (200 nM), or with TAT-pep5 alone (2 μm), and expressed as a percentage of vehicle-treated controls (CTR). GABA_A β_{2/3} subunit gene expression was normalized to the expression of the housekeeping gene, GAPDH, in the same RNA preparation. *n* = 6; ****p* < 0.001.

rons. After a 12 h treatment with aprotinin, a significant reduction in the average area fraction of VAMP1 puncta was observed ($78.5 \pm 4.7\%$ compared with control, $p = 0.0006$, 35 neurons analyzed, $n = 4$ experiments; Fig. 2*B,F*). This change of VAMP1-positive puncta under treatment with aprotinin was sensitive to TAT-pep5 ($90.4 \pm 3.8\%$ compared with control, $p = 0.067$, 35 neurons analyzed, $n = 4$; Fig. 2*B,F*).

We next used ELISA experiments to evaluate the cell-surface and cytoplasmic expression of GABA_AR $\beta_{2/3}$ subunits after treatments with aprotinin. We observed that aprotinin reduces the expression of GABA_ARs at the membrane ($71.8 \pm 3.6\%$ compared with control; $p = 0.0008$, $n = 9$; Fig. 2*G*) and cytoplasmic ($59.0 \pm 4.1\%$ compared with control; $p = 0.0005$, $n = 9$; Fig. 2*H*) levels. These effects were prevented by TAT-pep5 ($98.4 \pm 3.5\%$ and 97.5 ± 8.3 respectively, compared with control, $p = 0.274$, $n = 6$; Fig. 2*G,H*).

To investigate whether the endogenous release of proBDNF depends on the regulated secretory pathway (Haubensak et al., 1998; Zhou et al., 2004; Yang et al., 2009), we analyzed the effect of aprotinin in the presence of nifedipine ($10 \mu\text{M}$), an inhibitor of L-type VGCCs, which are known to prevent dendritic release of BDNF (Kuczewski et al., 2008a). In the presence of nifedipine, aprotinin failed to decrease the expression of GABA_AR $\beta_{2/3}$ subunits at the membrane ($103.1 \pm 2.2\%$ compared with control, $p = 0.363$, $n = 6$; Fig. 2*G*) and cytoplasmic ($108.2 \pm 3.1\%$ compared with control, $p = 0.416$, $n = 6$; Fig. 2*H*) levels.

To further determine whether the diminution of GABA_AR $\beta_{2/3}$ subunits induced by aprotinin reflects modulation of gene transcription, we performed qRT-PCR analysis of GABA_AR β_3 subunit mRNA levels following treatment with aprotinin. We found significant differences in GABA_AR β_3 subunit mRNA levels between control and aprotinin-treated cultures ($78.8 \pm 3.1\%$ compared with control; $p = 0.0003$, $n = 6$; Fig. 2*I*). This change in GABA_AR β_3 subunit levels was significantly attenuated by TAT-pep5 compared with aprotinin alone ($p = 0.0007$; Fig. 2*I*).

The levels remained, however, reduced compared with control ($91.3 \pm 3.3\%$ compared with control; $p = 0.008$, $n = 6$; Figure 2*I*), this difference might be due to the lack of TrkB activation by mBDNF during treatment with aprotinin. To test this hypothesis, we next treated the cultures with K252a (200 nM), a membrane-permeable inhibitor of protein tyrosine kinase coupled to the Trk receptor family. In the presence of K252a, the level of GABA_AR β_3 mRNAs was similar to treatment with aprotinin in the presence of TAT-pep5 ($92.8 \pm 2.2\%$ compared with control; $p = 0.004$, $n = 6$; Fig. 2*I*).

In all experiments, treatment of neuronal cultures with TAT-pep5 alone did not produce any detectable effect on GABA_AR protein and mRNA levels (Fig. 2*B–I*).

Together, these data indicate that endogenous activation of p75^{NTR} significantly reduces both the density of functional GABAergic synapses and the synthesis of GABA_AR β_3 mRNA transcripts.

CR-proBDNF-Cherry altered miniature GABAergic synaptic activity

To further show that the effects of chronic treatment with aprotinin are linked to activity-dependent secretion of proBDNF, we transfected neurons with a CR-proBDNF tagged with Cherry (CR-proBDNF Cherry). In this model, Cherry-tagged proBDNF can be targeted into dendritic secretory granules of the regulated pathway of secretion, and released from the postsynaptic target cells during spontaneous network activity (Haubensak et al., 1998; Kuczewski et al., 2008a).

We first confirmed that expression of CR-proBDNF in transfected cells leads to a similar decrease in GABA_AR surface expression similar to those observed in CR-proBDNF and aprotinin-treated cultures. To this end, we labeled surface GABA_ARs using the GABA_AR $\beta_{2/3}$ subunit antibody. Neurons were costained with MAP2. As illustrated (Fig. 3*A,B*), GABA_AR $\beta_{2/3}$ surfaces were significantly reduced in transfected neurons with CR-proBDNF-Cherry compared with control Cherry neurons (control Cherry: $44.5 \pm 5.6\%$ and $25.2 \pm 7.1\%$ in CR-proBDNF-Cherry transfected cells, $p = 0.0008$, 15 neurons analyzed per condition, normalized to MAP2, $n = 3$).

We then performed whole-cell patch-clamp recordings of GABA_AR mIPSCs in pyramidal-like cells transfected at 10 DIV after plating. At 14 DIV, mIPSCs were observed in >80% of both CR-proBDNF and control neurons. At this age, neurons overexpressing CR-proBDNF (CR-proBDNF Cherry) exhibited a striking difference in mIPSC interevent intervals ($1.2 \pm 0.04 \text{ s}$ in CR-proBDNF, 14 neurons analyzed, $n = 4$) and amplitude ($57 \pm 1.1 \text{ pA}$ in CR-proBDNF, 14 neurons analyzed, $n = 4$) compared with Cherry-expressing neurons ($0.5 \pm 0.02 \text{ s}$, $p < 0.001$, and $74.3 \pm 1.4 \text{ pA}$, $p < 0.001$, 14 neurons analyzed, $n = 4$; Fig. 3*C–F*). The kinetic properties of mGABA_A PSCs were unchanged (Fig. 3*G,H*). The membrane capacitance of the recorded cells, an indicator of neuronal size (Colin-Le Brun et al., 2004), was not different between CR proBDNF-Cherry-expressing and Cherry-expressing neurons (Fig. 3*I*). Therefore, these results show that proBDNF downregulates GABA_AR function at the synapse.

Together, these results indicate that proBDNF leads to a decrease of GABA_AR surface density, which is associated with the reduction of GABA_AR mIPSC frequency and amplitude.

Apoptosis is not triggered by proBDNF

To explore the possibility that the decrease of GABAergic synapses mediated by proBDNF/p75^{NTR} signaling might be due to cellular loss, we performed double immunostaining for cleaved caspase-3, a marker for cell apoptosis (Logue and Martin, 2008) and MAP2, and quantified the ratio of cleaved caspase-3-positive neurons to total MAP2-positive neuronal number. A comparison of the number of cleaved caspase-3-positive neurons to the total of MAP2-positive neuronal number showed that the number of apoptotic neurons did not increase with overexpression of CR-proBDNF Cherry or with exogenous application of CR-proBDNF (Fig. 4*B*), or with treatment with aprotinin (Fig. 4*B*; $p > 0.05$ compared with control, 15 neurons analyzed per condition, $n = 3$; Fig. 4*C*).

Thus, the previously observed diminutions of GABA_ARs at the morphological and functional levels are not due to an apoptotic mechanism triggered by proBDNF.

ProBDNF activates the RhoA-ROCK-PTEN pathway and promotes GABA_AR dephosphorylation and endocytosis

Cell-surface stability of GABA_ARs is regulated by phosphosensitive interactions of a β subunit where dephosphorylation of β_3 Ser408/409 facilitates clathrin-mediated endocytosis of GABA_ARs (Jovanovic et al., 2004; Kittler et al., 2005). Because CR-proBDNF application leads to a decrease in cell-surface expression of GABA_ARs, we next sought to determine whether any changes in the levels of GABA_AR phosphorylation state occurred upon the activation of p75^{NTR} by exogenous application of CR-proBDNF.

By immunoblotting neuronal lysates with an anti-phospho- β_3 subunit antibody, we detected a significant CR-proBDNF/p75^{NTR}-dependent decrease in the phosphorylation state of

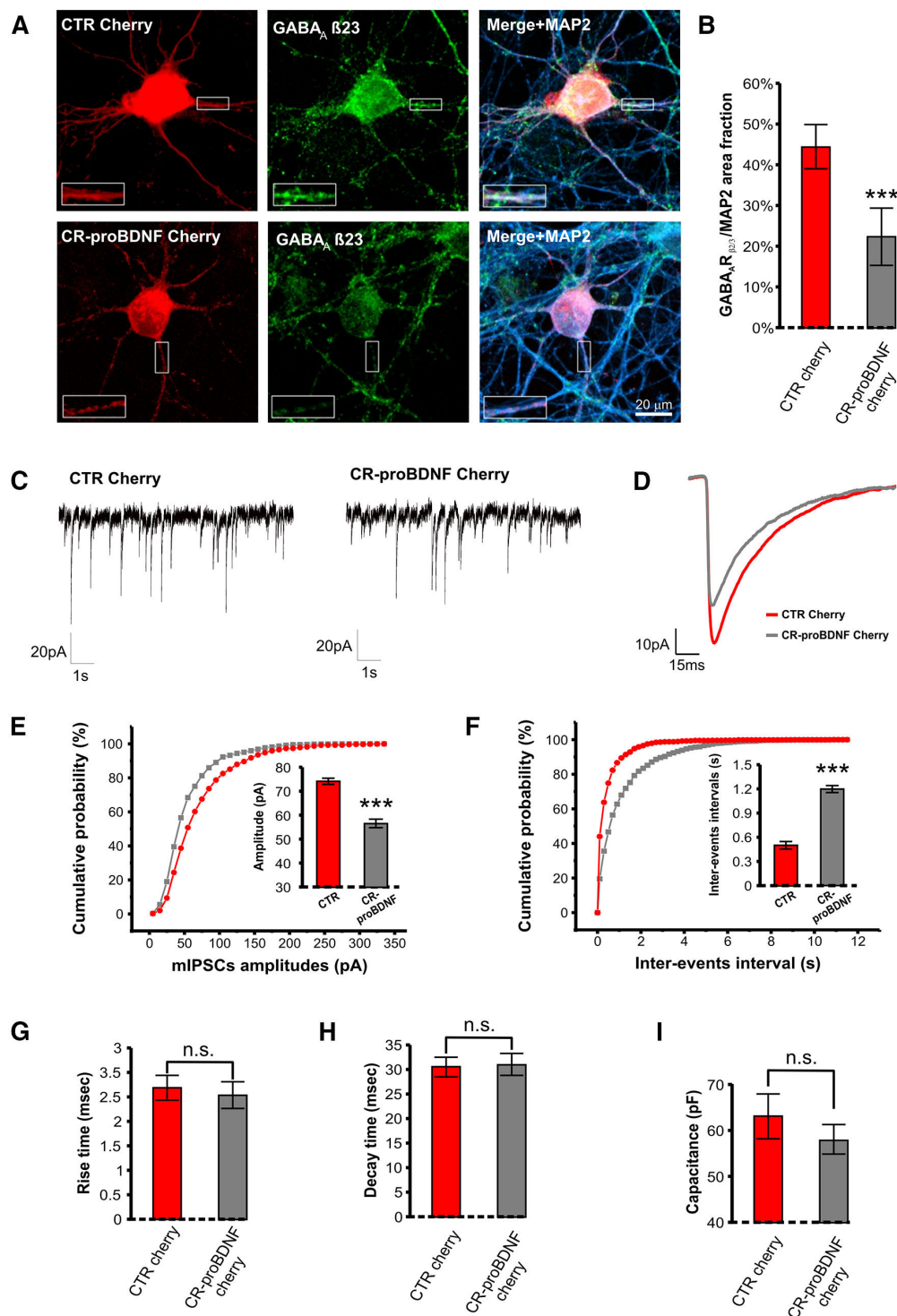


Figure 3. GABA_AR currents in neurons transfected with CR-ProBDNF and neurons transfected with Cherry. **A**, Transfected neurons with Cherry (CTR Cherry; top), or CR-proBDNF Cherry (bottom) and immunolabeled with GABA_AR β_{2/3} subunit-specific mouse monoclonal antibody to reveal expression at the cell surface, and following permeabilization, immunolabeled with anti-MAP2 rabbit polyclonal. Scale bar, 20 μm. **B**, Quantification of surface GABA_AR β_{2/3}/intracellular MAP2 fluorescence ratio. Fifteen neurons analyzed per condition, $n = 3$; *** $p < 0.001$. **C**, Representative recordings of mIPSCs from neurons transfected with Cherry (left) and CR-ProBDNF Cherry (right). **D**, Illustration of average amplitude in neurons transfected with Cherry (red) and CR-ProBDNF Cherry (gray). **E**, **F**, Cumulative distributions of mIPSC amplitudes and interevent intervals. Insets in **E** and **F** display the mean $\pm$ SEM amplitude and interevent intervals respectively (Kolmogorov–Smirnov test, *** $p < 0.001$ for amplitude and interevent interval). **G**, **H**, Rise time (**G**) and decay time (**H**). **I**, Plot illustrates mean of neuron capacitance. $n = 14$ neurons per condition.

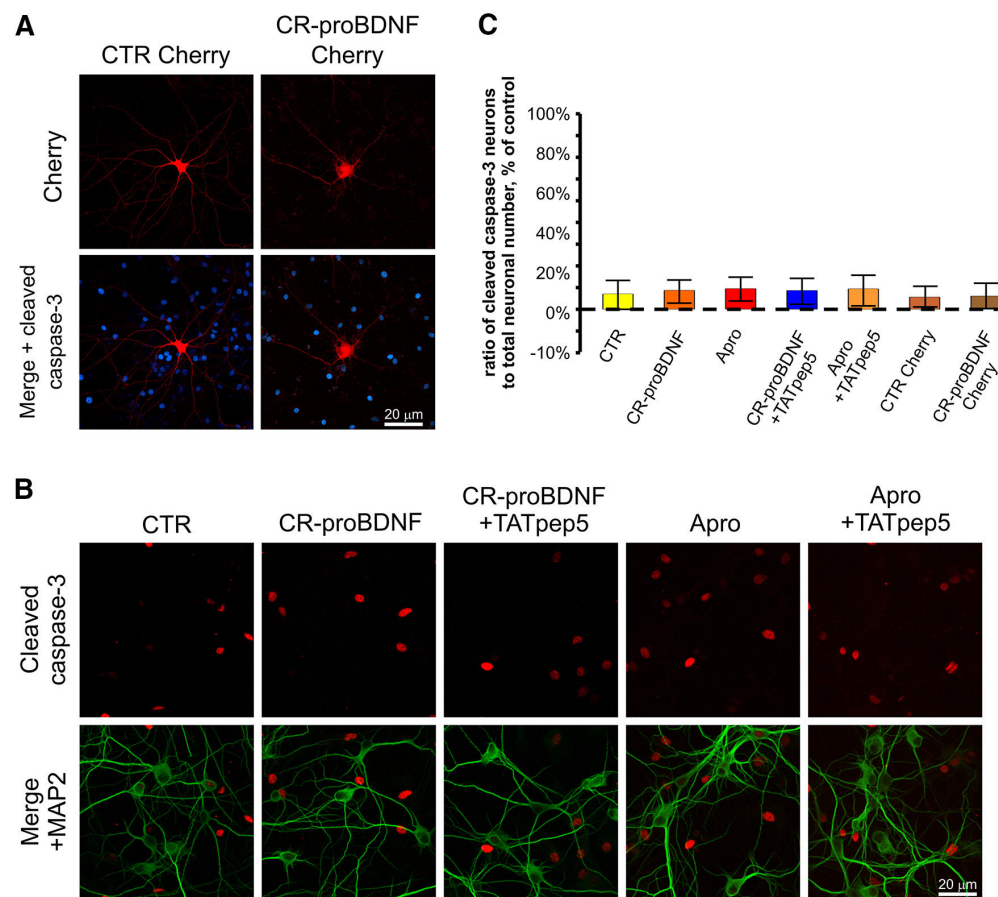


Figure 4. Apoptosis is not triggered by proBDNF. **A**, Image of hippocampal neurons transfected at 10 DIV with the CR-proBDNF Cherry (in red) and/or Cherry (in red), and costained at 14 DIV with the cleaved caspase-3 (in blue). **B**, Cultured hippocampal neurons (14 DIV) in control conditions (CTR), or treated with CR-proBDNF (25 ng, 30 min), or CR-proBDNF plus TAT-pep5 (CR-proBDNF + TAT-pep5; 2 μ M), or aprotinin (Apro; 3 μ g/ml, 12 h), or aprotinin plus TAT-pep5 (Apro + TAT-pep5; 2 μ M), and immunolabeled with cleaved caspase-3 antibody (red), and costained with anti-MAP2 antibody (green). **C**, Ratio of cleaved caspase-3-positive (apoptotic) neuronal number to total MAP2-positive cells, and expressed as a percentage of vehicle-treated controls (CTR). Overexpression of CR-proBDNF (CR-proBDNF Cherry), or exogenous application of CR-proBDNF (CR-proBDNF) or treatment with aprotinin (Apro) did not increase the number of apoptotic neurons compared with control (CTR). Fifty neurons analyzed per condition, per experiment; $n = 4$; $p > 0.05$.

GABA_A β_3 subunits ($63.36 \pm 5.6\%$ of control nonstimulated cultures, $p = 0.007$, $n = 6$; Fig. 5A). This effect was significantly attenuated by the p75^{NTR} signaling inhibitor TAT-pep5 ($87.2 \pm 2.5\%$ compared with control, $p = 0.422$, $n = 6$; Fig. 5A). We next investigated the contribution of RhoA and JAK2 and their respective signaling pathways in the control of GABA_AR trafficking and synthesis that might be activated by proBDNF/p75^{NTR}. We found that the decrease in the phosphorylation state of GABA_ARs was prevented by the inhibitor of Rho kinase (ROCKi; $99.70 \pm 5.2\%$ of control nonstimulated cultures, $p = 0.470$, $n = 5$; Fig. 5A), the downstream effector of the small GTPase RhoA (Yamashita and Tohyama, 2003). However, it was unaffected by the presence of Janus kinase 2 (JAK2) inhibitor AG490 ($58.05 \pm 7.8\%$ of control nonstimulated cultures, $p = 0.005$, $n = 4$; Fig. 5A), and the STAT3 inhibitor Stattic ($69.63 \pm 8.1\%$ of control nonstimulated cultures, $p = 0.031$, $n = 4$; Fig. 5A). In all experiments, the total level of GABA_A β_3 remained stable (Fig. 5A). ELISA immunoassays confirmed the role of the RhoA-ROCK pathway by a decrease in the cell-surface expression of GABA_A $\beta_{2/3}$ subunits induced by the CR-proBDNF (Fig. 1). Thus, ROCKi abolished the decrease in cell-surface expression of

GABA_ARs induced with the CR-proBDNF ($104.2 \pm 5.7\%$ compared with control, $p = 0.483$, $n = 3$; Fig. 5B). No significant difference was observed in the total levels of GABA_A $\beta_{2/3}$ subunit (Fig. 1; CR-proBDNF with ROCKi, $103.25 \pm 1.9\%$; ROCKi alone, $102.2 \pm 5.8\%$, compared with control).

To further decipher the molecular mechanism underlying the proBDNF-p75^{NTR}-RhoA-ROCK-mediated downregulation of GABA_ARs, we analyzed the expression of PTEN. PTEN, which negatively regulates membrane expression of GABA_ARs (Liu et al., 2010), is a dual protein/lipid phosphatase expressed downstream of the p75^{NTR}-RhoA-ROCK pathway (Li et al., 2005; Song et al., 2010). Western blotting analysis performed on hippocampal neurons treated with CR-proBDNF showed an increase in PTEN levels (Fig. 5C). The level of pPTEN did not change significantly. Thus the increase of total PTEN relative to pPTEN indicates an increase in the dephosphorylated form of PTEN ($72.5 \pm 5.3\%$ compared with control, $p = 0.021$, $n = 5$; Fig. 5C), which is the active form of the phosphatase (Vazquez et al., 2000; Maccaario et al., 2007). To confirm the role of the RhoA-ROCK pathway in proBDNF-induced PTEN activity, we treated cultured hippocampal neurons with ROCKi. In the presence of ROCKi, CR-

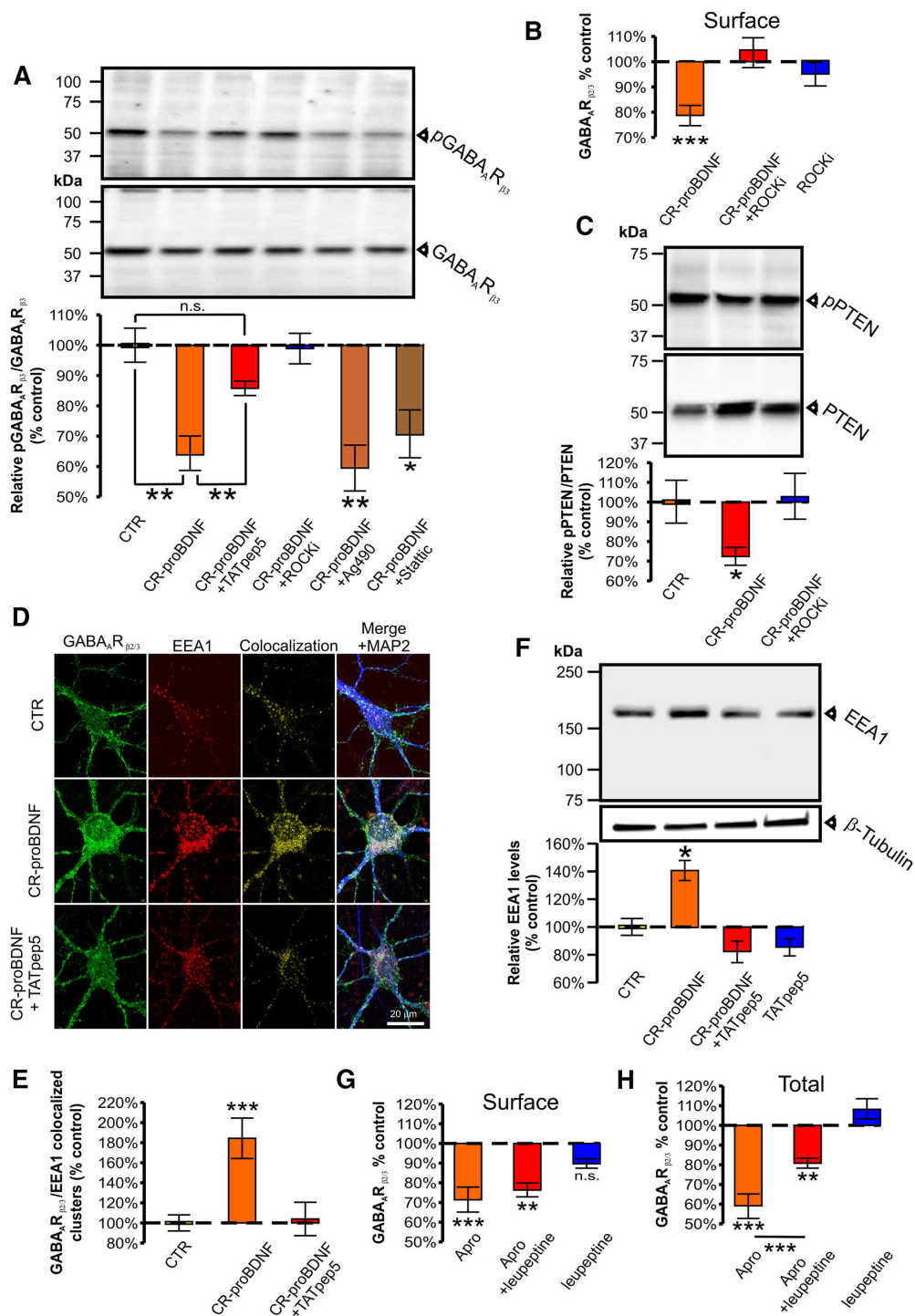


Figure 5. ProBDNF activates the RhoA-ROCK-PTEN pathway and promotes GABA_AR dephosphorylation and endocytosis. **A**, CR-proBDNF decreases the phosphorylation of Ser408/409 in the GABA_AR_{β3} subunit (pGABA_AR_{β3}). Total cellular proteins were analyzed using Western blot with polyclonal GABA_AR_{β3} subunit and pGABA_AR_{β3} subunit antibodies. Hippocampal neurons were treated with vehicle (CTR), CR-proBDNF (25 ng, 30 min), CR-proBDNF plus TAT-pep5 (CR-proBDNF + TAT-pep5; 2 μM), CR-proBDNF plus ROCKi (CR-proBDNF + ROCKi; 50 μM), CR-proBDNF plus Ag490 (CR-proBDNF + Ag490; 50 μM), or CR-proBDNF plus Stattic (CR-proBDNF + Stattic; 10 μM). Proteins were visualized using ECL following incubation with HRP-conjugated secondary antibody. Normalized data (pGABA_AR_{β3}/GABA_AR_{β3}) are expressed as percentage change with respect to vehicle-treated cultures (defined as 100%). Levels of total GABA_AR_{β3} subunits were used as internal control. *n* = 4–6 experiments; **p* < 0.05, ***p* < 0.01. **B**, Cell-surface levels of GABA_AR_{β3} subunit were measured using ELISA assays with GABA_AR_{β3} subunit-specific antibody in neurons treated with CR-proBDNF alone (25 ng, 30 min) with CR-proBDNF in the presence of ROCKi (CR-proBDNF + ROCKi; 50 μM), or with ROCKi alone (50 μM), and expressed as a (Figure legend continues.)

proBDNF no longer induced a decrease of the pPTEN/PTEN ratio ($102.6 \pm 14.2\%$ compared with control, $p = 0.401$, $n = 5$; Fig. 5C).

These results suggest a signaling mechanism in which proBDNF binding to p75^{NTR} activates the RhoA-ROCK-PTEN pathway, which negatively regulates phosphorylation levels and membrane expression of GABA_ARs.

To determine whether dephosphorylated receptors are indeed endocytosed, we next measured, by Western blotting, the level of a marker protein for early endosomes (EEA1) on neuronal lysates. We found that activation of p75^{NTR} signaling by CR-proBDNF significantly increases the amount of EEA1 proteins compared with control nonstimulated neurons ($140.3 \pm 7.8\%$ compared with control, $p = 0.013$; $n = 5$, Fig. 5D). This effect was abolished in the presence of TAT-pep5 ($84.8 \pm 8.5\%$ compared with control, $p = 0.378$, $n = 5$; Fig. 5D). We then wanted to confirm the presence of internalized receptors in the endosomal compartment by quantifying colocalization of GABA_A $\beta_{2/3}$ subunits with EEA1. After 30 min treatment with CR-proBDNF (25 ng/ml), internalized GABA_A $\beta_{2/3}$ subunits colocalized extensively in a punctate pattern with EEA1 ($184.5 \pm 20.5\%$ of control nonstimulated cultures, $p = 0.0003$; 35 neurons analyzed, $n = 4$; Fig. 5E,F). The colocalization of GABA_A $\beta_{2/3}$ subunits with EEA1 is blocked when CR-proBDNF is applied in the presence of TAT-pep5 ($100.6 \pm 16.5\%$ of control nonstimulated cultures, $p = 0.497$, $n = 35$ neurons analyzed; $n = 4$; Fig. 5E,F).

After endocytosis, internalized proteins can be sorted into various compartments, which go through a recycling endosomal pathway or lysosomal degradation pathway (Jacob et al., 2008; Luscher et al., 2011). To determine the contribution of lysosomal degradation in the diminution of cytoplasmic GABA_A $\beta_{2/3}$ levels observed in aprotinin (Fig. 2), cultures were treated with aprotinin in the presence of the lysosomal protease inhibitor leupeptin (5 μ g/ml). ELISA experiments show that in the presence of leupeptin, aprotinin still induced a decrease in cell-surface expression of the $\beta_{2/3}$ subunits ($76.7 \pm 3.1\%$ compared with control; $p = 0.009$, $n = 9$; Fig. 5G), but significantly dimin-

ished the aprotinin-induced reduction in the cytoplasmic levels of GABA_A $\beta_{2/3}$ ($p = 0.0004$ compared with aprotinin alone, $n = 9$; Fig. 5H). During treatments with aprotinin and in the presence of leupeptin, the cytoplasmic levels of $\beta_{2/3}$ subunits remain reduced ($81.0 \pm 2.6\%$ compared with control; $p = 0.004$, $n = 9$; Fig. 5F), suggesting the inhibition of GABA_A $\beta_{2/3}$ synthesis, mediated by p75^{NTR} (Fig. 2H).

Together, our results demonstrate that the proBDNF/p75^{NTR}/Rho-ROCK signaling pathway triggers a dephosphorylation of β_3 subunits containing GABA_ARs, followed by endocytosis and lysosomal degradation of GABA_ARs $\beta_{2/3}$.

ProBDNF has no effect on phospho-CREB activation but induces ICER expression via the JAK2/STAT3 signaling cascade

BDNF plays a critical role in regulating gene expression by activation of different downstream signaling pathways, which most commonly leads to the phosphorylation of CREB (Ghosh et al., 1994; Hu et al., 2008; Lund et al., 2008). pCREB dimerizes and binds to cAMP response element (CRE) motifs to initiate gene transcription (Zhang et al., 2005; Grabenstatter et al., 2012). To determine whether proBDNF can bind to TrkB, we used an indirect approach based on an increase in BDNF/TrkB/ERK-dependent pCREB (Ghosh et al., 1994; Kuczewski et al., 2008a). We tested whether the addition of CR-proBDNF or aprotinin induces an increase in pCREB immunoreactivity in MAP2-positive neurons. Hippocampal neuronal cultures were stimulated, and the immunofluorescence ratio between pCREB and CREB was quantified. Application of CR-proBDNF does not lead to the phosphorylation of CREB ($p = 0.128$, 45 neurons analyzed, $n = 4$; Fig. 6A,B). We observed that the addition of mBDNF during application of CR-proBDNF induces a significant increase in the levels of pCREB ($350 \pm 11\%$ compared with control; $p = 0.0001$, 45 neurons analyzed, $n = 4$; Fig. 6A,B). This increase was prevented by K252a, demonstrating that under these conditions, only the mature form of BDNF activates TrkB ($p = 0.161$, 45 neurons analyzed, $n = 4$; Fig. 6A,B). This result further shows that the proBDNF-p75^{NTR} pathway does not interfere with TrkB or its downstream signaling pathway.

Alternatively, CRE can be regulated by other CREB isoforms, such as cAMP response element modulator (CREM) and ICER. ICER can homodimerize or heterodimerize with CREB and downregulate the action of CREB (Molina et al., 1993; Lund et al., 2008; Grabenstatter et al., 2012). Therefore, we next determined whether induction of ICER might occur in response to proBDNF treatment and contribute to the repression of GABA_A β_3 synthesis. Hippocampal neuronal cultures were incubated with CR-proBDNF (30 min) in the presence or absence of TAT-pep5. Immunohistochemistry using the CREM1 (ICER) antibody, in combination with anti-MAP2 antibody, was performed. To normalize the results obtained between different cultures, the ICER/MAP2 intensity ratio was quantified. Relative to control neurons, CR-proBDNF treatment significantly increased the expression of ICER ($152.3 \pm 7.4\%$, $p = 0.0004$, compared with control; 45 neurons analyzed, $n = 4$; Fig. 6C,D). This increase of ICER was completely blocked by TAT-pep5 ($104.7 \pm 6.4\%$, $p = 0.099$, compared with control; 45 neurons analyzed, $n = 4$; Fig. 6C,D). In contrast, after 12 h treatment with CR-proBDNF, ICER no longer increased and returned to control levels ($110.1 \pm 8.2\%$, $p = 0.065$, compared with control; 45 neurons analyzed, $n = 4$; Fig. 6C,D).

To confirm the transient increase of ICER proteins after exposition to CR-proBDNF, Western blotting analysis was per-

←
(Figure legend continued.) percentage of vehicle-treated controls. C, CR-proBDNF decreases the phosphorylation of T366 in the PTEN (pPTEN). Total cellular proteins were analyzed using Western blot with polyclonal PTEN and pPTEN antibodies. Hippocampal neurons were treated with vehicle (CTR), CR-proBDNF (25 ng, 30 min), CR-proBDNF plus ROCKi (CR-proBDNF + ROCKi; 50 μ M), or ROCKi alone (50 μ M). Proteins were visualized using ECL following incubation with HRP-conjugated secondary antibody. Normalized data (pPTEN/PTEN) are expressed as percentage change with respect to vehicle-treated cultures (defined as 100%). Levels of total PTEN were used as internal control. $n = 5$ experiments; * $p < 0.05$. D, Neurons were permeabilized and immunolabeled with anti-GABA_A $\beta_{2/3}$ subunit-specific antibody (green), anti-EEA1 rabbit polyclonal antibody (red), and anti-MAP2 chicken polyclonal antibody (blue) to reveal the intracellular distribution of these proteins. GABA_A $\beta_{2/3}$ subunits and EEA1 colocalization appear yellow in merge panels (right). Scale bar, 20 μ m. E, The percentage of $\beta_{2/3}$ subunit-positive clusters that colocalized with EEA1 puncta/intracellular MAP2 fluorescence ratio was significantly increased in cultures treated with CR-proBDNF (25 ng, 30 min). Thirty-five neurons analyzed per condition, $n = 4$; *** $p < 0.001$. F, Western blot analysis with the antibody to EEA1. EEA1 expression was upregulated after treatment with CR-proBDNF (25 ng, 30 min). Proteins were visualized using ECL following incubation with HRP-conjugated secondary antibody. Normalized data (EEA1/ β -Tubulin) are expressed as percentage change with respect to vehicle-treated cultures (defined as 100%). $n = 5$ experiments; * $p < 0.05$. G, Cell-surface levels of GABA_ARs measured using ELISA assays with GABA_A $\beta_{2/3}$ subunit-specific antibody in neurons treated with aprotinin (Apro; 3 μ g/ml, 12 h) in the presence or absence of leupeptine (5 μ g/ml), or with leupeptine alone (5 μ g/ml), and expressed as a percentage of vehicle-treated controls (CTR). H, Total GABA_A $\beta_{2/3}$ subunit expression normalized to control non-treated conditions. $n = 9$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

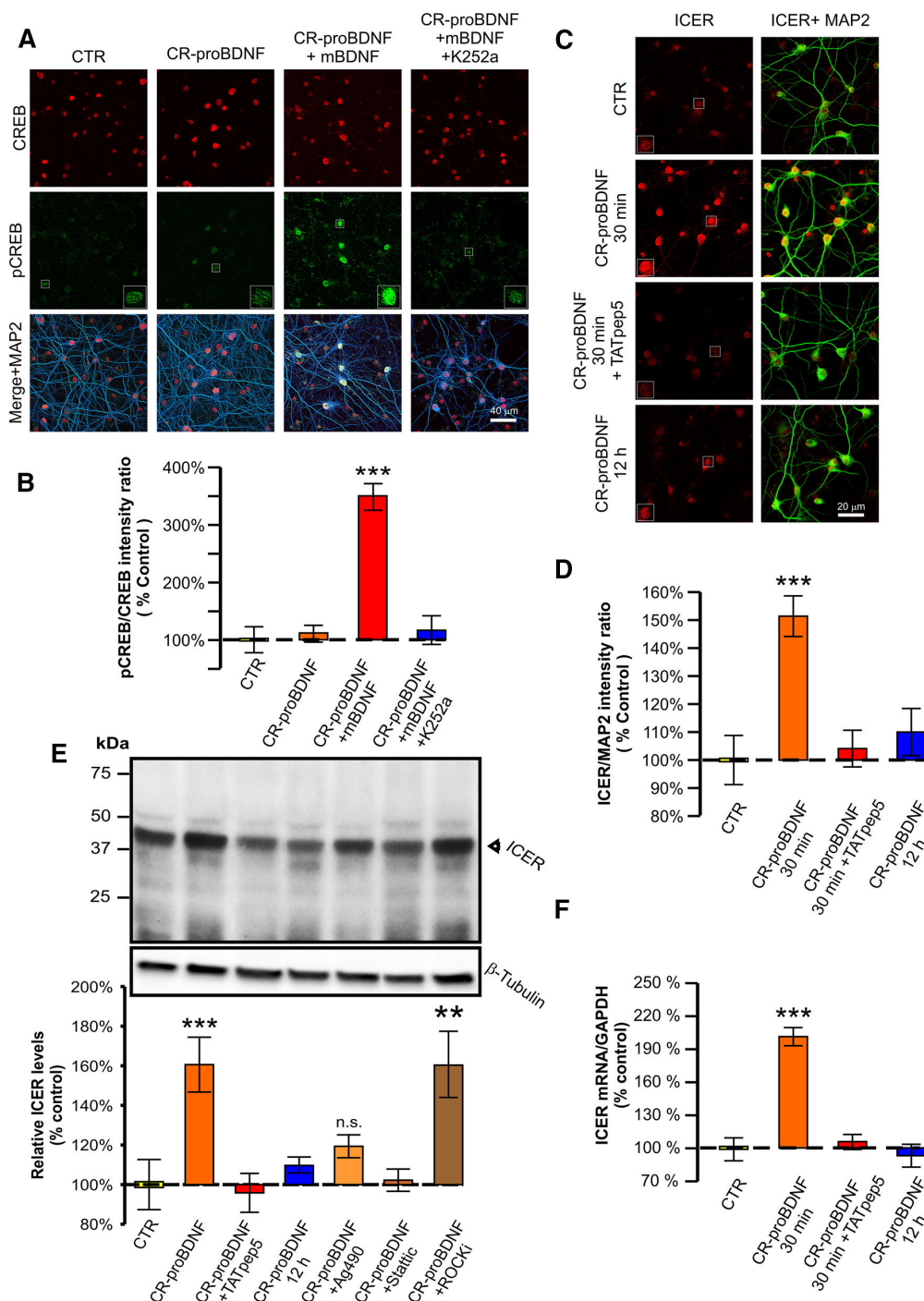


Figure 6. ProBDNF has no effect on phospho-CREB activation but induces ICER expression via the JAK2/STAT3 signaling cascade. **A**, Immunofluorescence signal of CREB (red, top), pCREB (green, middle) in hippocampal neurons in control conditions (CTR), or treated with CR-proBDNF alone (25 ng; CR-proBDNF), or CR-proBDNF plus mBDNF (CR-proBDNF + mBDNF; 25 ng), or CR-proBDNF plus mBDNF in the presence of K252a (CR-proBDNF + mBDNF + K252a; 200 nM). Right, Merged images with MAP2 staining (blue). Scale bar, 40 μ m. **B**, Average ratio of pCREB/CREB in the different conditions normalized to control. $n = 15$ neurons analyzed per treatment in $n = 3$ independent experiments; *** $p < 0.001$. **C**, Immunofluorescence signal of ICER (red, top) in hippocampal neurons in control conditions (CTR), or treated with CR-proBDNF (25 ng) for 30 min (CR-proBDNF 30 min), for 12 h (CR-proBDNF 12 h), or for 30 min in the presence of TAT-pep5 (CR-proBDNF 30 min + TATpep5; 2 μ M), following a costaining with anti-MAP2 chicken polyclonal antibody (green; bottom) to reveal neuronal cells. Scale bar: 20 μ m. **D**, Average fluorescence intensity ratio of ICER/MAP2 in the different conditions normalized to control. Forty-five neurons analyzed per condition, $n = 4$; *** $p < 0.001$. **E**, Western blot analysis with the antibody to ICER. ICER expression was upregulated after acute treatment with CR-proBDNF (25 ng, 30 min) but not with chronic application of CR-proBDNF (25 ng, 12 h). The increase of ICER was antagonized by TAT-pep5 (2 μ M), AG490 (50 μ M), and Stattic (10 μ M). This increase was insensitive to ROCKi (50 μ M). Proteins were visualized using ECL following incubation with HRP-conjugated secondary (Figure legend continues.)

formed on neuronal lysates. We found that activation of the p75^{NTR} pathway by CR-proBDNF treatment induces an increase in the total amount of ICER proteins ($160.68 \pm 13.4\%$, $p = 0.0002$, compared with control; $n = 6$; Fig. 6E). This effect was antagonized with TAT-pep5 ($94.0 \pm 10.7\%$, $p = 0.237$, compared with control; $n = 6$; Fig. 6E). Treatment of neuronal cell cultures with CR-proBDNF (12 h) or TAT-pep5 alone did not produce any detectable effect on ICER protein levels (Fig. 6E). Previous studies have shown that BDNF activates the JAK2/STAT3 signaling cascade, which in turn drives ICER expression (Lund et al., 2008; Grabenstatter et al., 2014). In our study, we investigated the JAK2/STAT3 and RhoA-ROCK pathways in an attempt to isolate downstream signaling proteins interacting with p75^{NTR} and identify potential cell-specific proBDNF/p75^{NTR}-related mechanisms responsible for ICER induction. The CR-proBDNF/p75^{NTR}-dependent increases in ICER level was significantly attenuated by AG490 ($119.62 \pm 5.9\%$ of control nonstimulated cultures, $p = 0.484$, $n = 4$; Fig. 6E) and Stattic ($102.07 \pm 5.0\%$ of control nonstimulated cultures, $p = 0.288$, $n = 4$; Fig. 6E). Interestingly, this increase was insensitive to ROCKi ($160.84 \pm 16.9\%$ of control nonstimulated cultures, $p = 0.005$, $n = 4$; Fig. 6E).

To investigate whether proBDNF/p75^{NTR} pathway would also regulate ICER gene expression, ICER mRNA levels were measured using qRT-PCR. As illustrated in Figure 6F, acute treatment with CR-proBDNF shows a robust increase of ICER mRNA levels ($202.1 \pm 7.4\%$, $p = 0.0004$, compared with control; $n = 6$), which returned to basal levels after 12 h treatment with proBDNF ($97.2 \pm 9.8\%$, $p = 0.381$, compared with control; $n = 6$; Fig. 6F) with kinetics similar to those of ICER proteins. This increase was blocked by TAT-pep5 ($105.3 \pm 4.7\%$, $p = 0.437$, compared with control; $n = 6$; Fig. 6F).

Thus, these data show that ICER is induced in neuronal cultures by proBDNF/p75^{NTR} signaling via the JAK2/STAT3 pathway. Moreover, induction of ICER following activation of the p75^{NTR} pathway precedes the downregulation of GABA_A β_3 gene expression, suggesting that ICER might be a repressor of GABA_A β_3 transcription.

Treatment with proBDNF induced upregulation of p75^{NTR} expression

So far, we have shown that the consequence of treatment with CR-proBDNF or aprotinin is mediated by p75^{NTR} activation. To further investigate the role of p75^{NTR} in GABAergic downregulation, we next wanted to determine whether treatment of cultures with proBDNF influenced the levels of p75^{NTR} expression.

Hippocampal neuronal cultures were incubated with aprotinin in the presence or absence of TAT-pep5. Immunohistochemistry using an antibody against p75^{NTR}, which recognizes the extracellular domain of the receptor, in combination with anti-MAP2 antibody was performed. To normalize the results obtained between different cultures, the p75^{NTR}/MAP2 intensity ratio was quantified. Relative to control neurons, treatment with

aprotinin significantly increased the expression of p75^{NTR} ($210.7 \pm 14.9\%$, $p = 0.0001$, compared with control; 35 neurons analyzed, $n = 4$; Fig. 7A,B). This effect was abolished by application of TAT-pep5 before treatment with aprotinin ($62.3 \pm 18.2\%$, $p = 0.159$, compared with control; 35 neurons analyzed, $n = 4$; Fig. 7A,B).

To confirm the increase of p75^{NTR} proteins after treatment with aprotinin, Western blotting analysis was performed on hippocampal neuronal lysates. We found that aprotinin induces an increase in the total amount of p75^{NTR} proteins ($159.17 \pm 19.6\%$, $p = 0.046$, compared with control; $n = 4$; Fig. 7C). This effect was antagonized with TAT-pep5 (Fig. 7C). Incubation of neuronal cells with TAT-pep5 alone did not differ from that of control samples (Fig. 7C).

To further investigate whether proBDNF would also regulate p75^{NTR} gene expression, p75^{NTR} mRNA levels were measured using qRT-PCR. As illustrated in Figure 7D, treatment with aprotinin shows a significant increase of p75^{NTR} mRNA levels ($165.4 \pm 5.1\%$, $p = 0.008$, compared with control; $n = 6$; Fig. 7D).

Thus the present data indicate that treatment with aprotinin triggers the activation of p75^{NTR} gene expression. This increase in p75^{NTR} mRNAs is followed by an upregulation of p75^{NTR} protein levels. This positive feedback loop might reinforce the action of proBDNF.

Endogenous accumulation of proBDNF *in vivo* decreases GABAergic synaptic activity

We next placed our observations obtained on cell cultures in an integrated context by determining whether endogenous accumulation of proBDNF could lead to a deficit of GABAergic activity *in vivo*. For this purpose, we performed intracerebroventricular injection of tPA-Stop, an inhibitor of proteolytic processing of proBDNF in mBDNF by plasminogen (Bozdagi et al., 2008) at P0. Two days after injection, GABA_A mIPSCs were recorded under whole-cell voltage clamp ($V_h = -70$ mV) from rat CA3 pyramidal neurons. These data were then compared with those obtained from control animals. GABA_A mIPSCs recorded from hippocampi treated with tPA-Stop exhibited a striking difference in mIPSC interevent intervals (9.69 ± 0.84 s in tPA-STOP, 13 neurons analyzed, $n = 5$; $p < 0.001$) and amplitude (41.35 ± 4.2 pA in tPA-Stop, 13 neurons analyzed, $n = 5$; $p < 0.001$) compared with controls (2.92 ± 0.17 s and 64.25 ± 8.3 pA in controls 13 neurons analyzed, $n = 5$; Fig. 8A–C). The kinetic properties of mGABA_A PSCs were unchanged (Fig. 8D,E). The membrane capacitance of the recorded cells was not different between control and tPA-Stop hippocampi (23.42 ± 4.8 pF in control vs 22.08 ± 5.5 pF in tPA-Stop; $p = 0.262$). We next determined whether the treatment with tPA-Stop leads to a decrease in GABA_A β_3 phosphorylation levels and an upregulation of p75^{NTR} similar to those observed in cell cultures. To this end, we measured, by Western blotting, the phosphorylation state of GABA_A β_3 subunits and the level of p75^{NTR} proteins. Our results showed that treatment with tPA-Stop decreases the phosphorylation state of GABA_A β_3 subunits ($63.80 \pm 13.5\%$ of control nonstimulated hippocampi, $p = 0.017$, $n = 5$; Fig. 8F) and upregulates the total amount of p75^{NTR} proteins ($225.74 \pm 58.1\%$, $p = 0.029$, compared with control; $n = 5$; Fig. 8G). Therefore, these results are in agreement with those obtained in cultures showing that endogenous proBDNF *in vitro* and *in vivo* downregulates GABAergic synaptic activity, inhibits the phosphorylation levels of GABA_A β_3 subunits, and increases p75^{NTR} expression.

(Figure legend continued.) antibody. Normalized data (ICER/ β -Tubulin) are expressed as percentage change with respect to vehicle-treated cultures (defined as 100%). $n = 4$ –6 experiments; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. F, Relative expression of ICER mRNA transcripts in neurons treated with CR-proBDNF for 30 min (CR-proBDNF 30 min), with CR-proBDNF for 12 h (CR-proBDNF 12 h; 25 ng), or with CR-proBDNF plus TAT-pep5 for 30 min (CR-proBDNF 30 min + TAT-pep5; 2 μ M), and expressed as a percentage of vehicle-treated controls (CTR). ICER gene expression was normalized to the expression of the housekeeping gene, GAPDH, in the same RNA preparation. $n = 6$; *** $p < 0.001$.

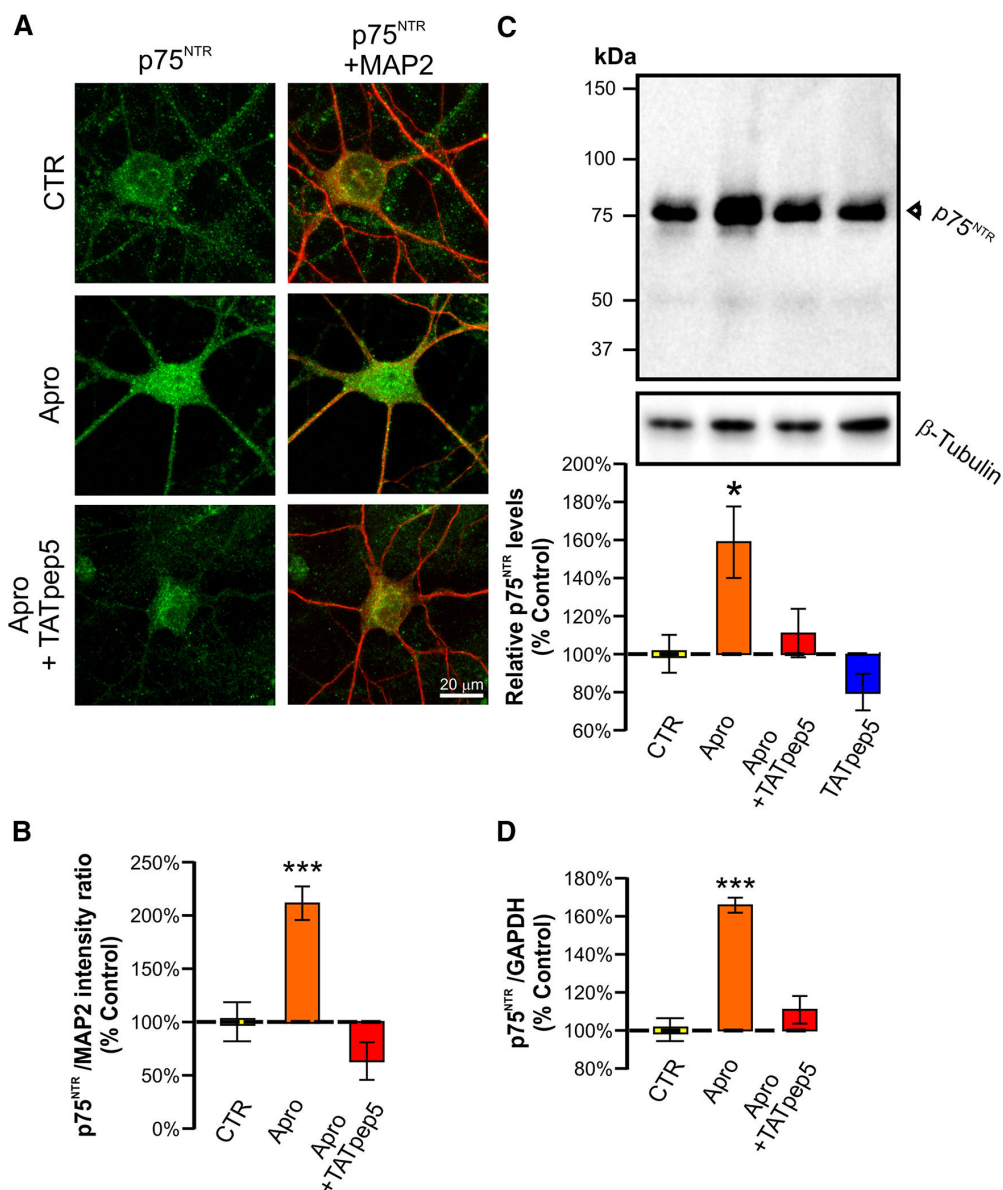


Figure 7. p75^{NTR} is upregulated upon chronic treatment with aprotinin. **A**, Cultured neurons (14 DIV), in control conditions (CTR), or treated with aprotinin in the absence of TAT-pep5 (Apro; 3 μg/ml, 12 h) or with aprotinin in the presence of TAT-pep5 (Apro + TAT-pep5; 2 μM) and immunolabeled with p75^{NTR}-specific rabbit polyclonal antibody (green; left), following a costaining with anti-MAP2 chicken polyclonal antibody (red; right) to reveal neuronal cells. Scale bar, 20 μm. **B**, Average fluorescence intensity ratio of p75^{NTR}/MAP2 in the different conditions normalized to control (CTR). n = 35 neurons analyzed per condition, per experiment; n = 4; ***p < 0.001. **C**, Western blot analysis with the antibody to p75^{NTR}. p75^{NTR} expression was upregulated after treatment with aprotinin (Apro; 3 μg/ml, 12 h). This increase was blocked by TAT-pep5. Proteins were visualized using ECL following incubation with HRP-conjugated secondary antibody. Normalized data (p75^{NTR}/β-Tubulin) are expressed as percentage change with respect to vehicle-treated cultures (defined as 100%). n = 4 experiments; *p < 0.05. **D**, Relative expression of p75^{NTR} mRNA transcripts in neurons treated with aprotinin in the absence of TAT-pep5 (Apro; 3 μg/ml, 12 h), or with aprotinin in the presence of TAT-pep5 (Apro + TAT-pep5; 2 μM), and expressed as a percentage of vehicle-treated controls (CTR). p75^{NTR} gene expression was normalized to the expression of the housekeeping gene, GAPDH, in the same RNA preparation. n = 6; ***p < 0.001.

Discussion

BDNF is initially expressed in a precursor form (proBDNF) and is cleaved to form mBDNF. While the regulatory role of BDNF on the expression and membrane turnover of GABA receptors is well established, the proBDNF–GABA_AR relationship remains obscure. Here, using developing hippocampal neuronal cultures

and immature *ex vivo* acute hippocampal slices, we show that the activation of p75^{NTR} downregulates GABAergic synaptic transmission. Whether decrease of synaptic contacts is induced by proBDNF or secondary to the loss of surface GABA_ARs remained to be determined. We further provided evidence that the down-regulation of GABAergic transmission relies on the activation of

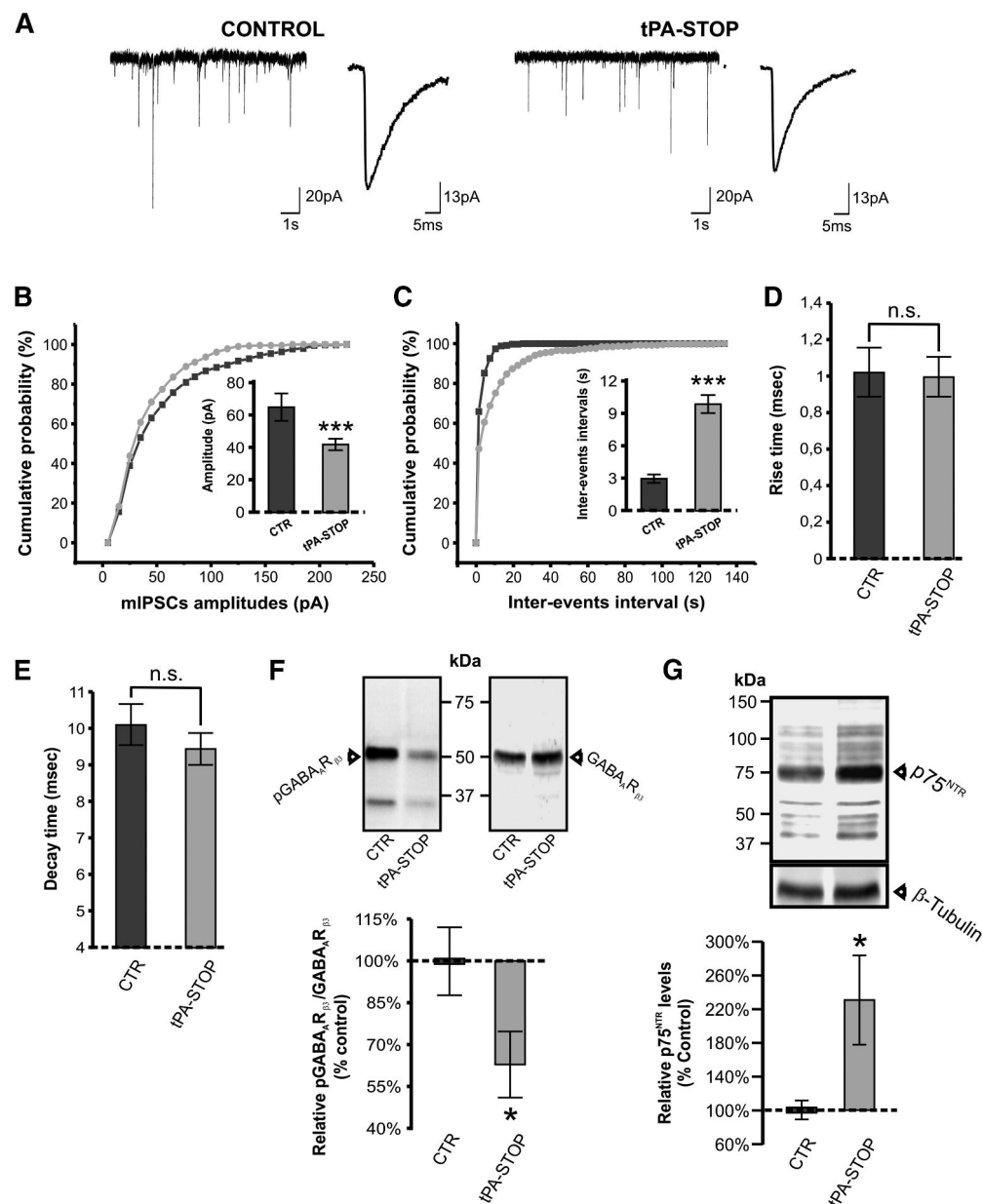


Figure 8. *In vivo* tPA-Stop injection decreases GABAergic synaptic activity. **A**, Upper traces, Representative recordings of GABA_A mIPSCs illustrating the decrease in events frequency and amplitude after intracerebroventricular injection of tPA-Stop at postnatal day 0. Average mGABA PSCs are shown at a higher scale. **B**, **C**, Cumulative distributions of mIPSC amplitudes and interevent intervals. Insets in **B** and **C** display the mean $\pm$ SEM amplitude and interevent intervals respectively (Kolmogorov–Smirnov test, *** $p < 0.001$ for amplitude and interevent interval). **D**, **E**, Rise time (**D**) and decay time (**E**). $n = 13$ neurons per condition. **F**, *In vivo* tPA-Stop administration decreases the phosphorylation of Ser408/409 in the GABA_A R β_3 subunit (pGABA_A R β_3). Total cellular proteins were analyzed using Western blot with polyclonal GABA_A R β_3 subunit and pGABA_A R β_3 subunit antibodies. Proteins were visualized using ECL following incubation with HRP-conjugated secondary antibody. Normalized data (pGABA_A R β_3 /GABA_A R β_3) are expressed as percentage change with respect to vehicle-treated animals (defined as 100%). Levels of total GABA_A R β_3 subunits were used as internal control. $n = 5$ experiments; * $p < 0.05$. **G**, *In vivo* tPA-Stop administration increases p75^{NTR} expression. Total cellular proteins were analyzed using Western blot with the antibody to p75^{NTR}. Proteins were visualized using ECL following incubation with HRP-conjugated secondary antibody. Normalized data (p75^{NTR}/β-Tubulin) are expressed as percentage change with respect to vehicle-treated animals (defined as 100%). $n = 5$ experiments; * $p < 0.05$.

two distinct downstream pathways: a RhoA-ROCK-PTEN pathway leading to dephosphorylation/endocytosis/degradation of GABA_ARs, and a JAK2-STAT3-ICER pathway leading to decrease synthesis.

ProBDNF-p75^{NTR} signaling activates the dephosphorylation and internalization of GABA_ARs

GABA_ARs constantly cycle between synaptic sites and endocytic structures. The endocytosis/exocytosis of GABA_ARs depends on

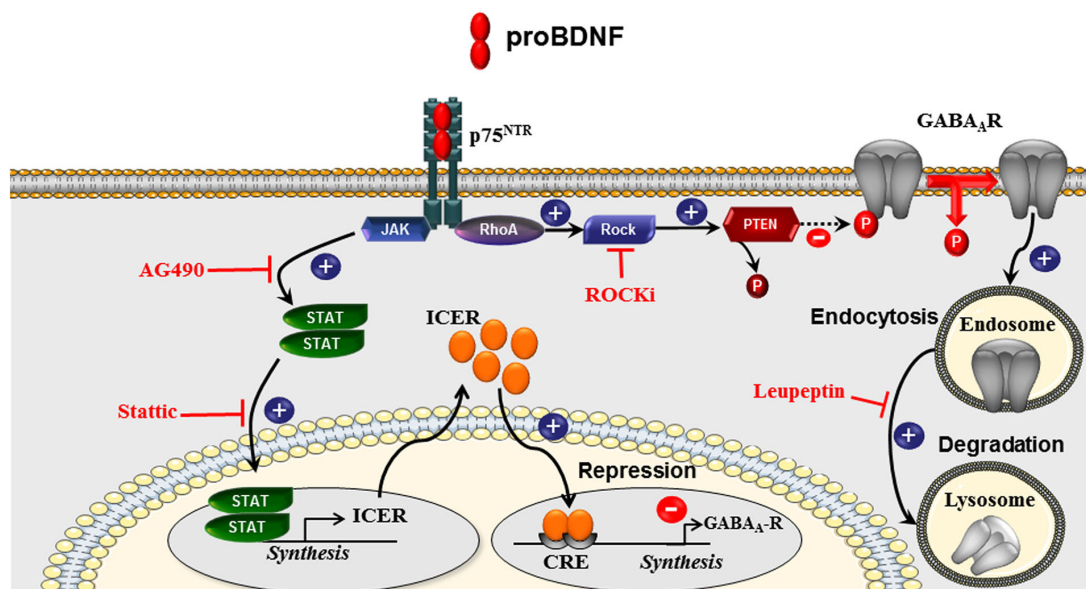


Figure 9. ProBDNF negatively regulates GABA_AR expression. Activation of p75^{NTR} by proBDNF impairs GABA_ARs through two distinct pathways: (1) a RhoA/ROCK/PTEN pathway that decreases the phosphorylation levels of GABA_ARs and thus triggers endocytosis and degradation of internalized receptors; and (2) a JAK2/STAT3/ICER pathway that leads to the repression of GABA_AR synthesis.

their phosphorylation state (Jovanovic et al., 2004). Dephosphorylation of the GABA_AR β_3 at Ser408/409 residues unmasks docking sites with the clathrin AP2 adaptor, which induces the endocytosis of GABA_ARs (Brandon et al., 2000; Kittler et al., 2000, 2005, 2008; Jovanovic et al., 2004). Conversely, phosphorylation of the receptors prevents internalization. Thus, it is very likely that the activation of receptor endocytosis by proBDNF described here occurs due to a decrease in GABA_AR phosphorylation and the subsequent interaction with the AP2 complex. Accordingly, we found that p75^{NTR} activation leads to a dephosphorylation and internalization of GABA_ARs via the RhoA-ROCK-PTEN pathway (Fig. 9). Thus, we found that p75^{NTR} activation leads to a dephosphorylation, and hence an activation of PTEN, and that this effect, as well as the dephosphorylation and internalization of GABA_ARs, was abolished by ROCKi. Previous studies indicated that proneurotrophins activate the RhoA-ROCK pathway and PTEN through p75^{NTR} (Gehler et al., 2004; Song et al., 2010). Interestingly, the increase of PTEN activity is followed by a decrease of GABA_AR cell-surface expression in hippocampal neurons (Liu et al., 2010). How PTEN dephosphorylates and downregulates GABA_ARs is presently unknown, but may likely implicate the protein phosphatase 2A (PP2A), a downstream target of phosphoinositide-3 kinase (Vasudevan et al., 2011) involved in the dephosphorylation of GABA_AR β_3 (Jovanovic et al., 2004).

In agreement with this, the inhibition of GABA_AR endocytosis may involve PI3K-mediated inhibition of PP2A function via TrkB. (Jovanovic et al., 2004; Porcher et al., 2011). BDNF is known to inhibit PTEN and, in contrast, PTEN activated via p75^{NTR} can block PI3K (Song et al., 2010), thereby suggesting that PTEN activates the endocytosis of GABA_ARs by inhibiting the PI3K signaling pathway. These findings suggest that the endocytosis of GABA_ARs could be determined by the competition between TrkB and p75^{NTR} on the PI3K-mediated regulation of PP2A activity via PTEN.

After endocytosis, internalized receptors can be sorted into various compartments, which go through a recycling endosomal or lysosomal degradation pathway (Jacob et al., 2008; Luscher et al., 2011). The observation that leupeptin leads to a cytoplasmic accumulation of internalized GABA_ARs indicates that the fate of endocytosed receptors is via the lysosomal pathway, hence leading to a decrease in the total level of GABA_ARs. Although we cannot exclude the possible contribution of other proneurotrophins in the effects mediated by aprotinin treatment, our results demonstrate that p75^{NTR} activation downregulates GABA_ARs by two different mechanisms and signaling pathways.

All together, the observations obtained here may reflect the functional antagonism between p75^{NTR} and TrkB receptor signaling (Lu, 2003; Yang et al., 2014). BDNF, acting via the TrkB receptor, has different modulatory effects on the efficacy of GABAergic synapses and transmission. BDNF has been shown to increase cell-surface expression of GABA_ARs by inhibiting receptor endocytosis, enhancing cell-surface stability (Joshi and Kapur, 2009; Porcher et al., 2011), and promoting GABAergic synaptogenesis (Rico et al., 2002; Elmariah et al., 2004, 2005).

Underlying mechanisms of decreased GABA_AR synthesis

In the current study, we further investigated the subcellular mechanisms triggered by proBDNF at the gene transcription level. The results obtained here indicate that mRNA levels for β_3 subunits of the GABA_AR are downregulated in neuronal cultures following treatment with proBDNF. Furthermore, we provided evidence that proBDNF-induced inhibition of GABA_AR synthesis relies on a mechanism coupling the p75^{NTR} and JAK2 pathways. This finding sheds light on a critical role of the proBDNF/p75^{NTR}/JAK2/STAT3 cascade in regulating the expression of GABA_AR subunits. Interestingly, in a model of epileptogenesis, similar functions had also been described for BDNF in the regulation of different gene transcripts encoding GABA_ARs (Lund et al., 2008). In this model, the authors then demonstrated that the

seizure-induced decrease in GABA_A α_1 is mediated by the JAK/STAT pathway regulated by BDNF. The activation of the BDNF/JAK/STAT pathway causes an increase in pCREB and ICER, which mediate the repression of GABA_A α_1 gene transcription through CRE site binding (Hu et al., 2008; Lund et al., 2008), where the consensus sequence TGACGTAC is contained (Molina et al., 1993; Grabenstatter et al., 2012). We show that ICER is induced in primary cultured hippocampal neurons after treatment with proBDNF. This induction precedes the decreases of GABA_A β_3 subunits. Whether proBDNF-induced ICER is directly responsible for the repression of β_3 gene expression mRNA still remains to be identified, but the binding CRE motif on GABA_A β_3 promoter has been predicted by the computational analysis of functional CRE (Zhang et al., 2005), suggesting that ICER might directly decrease β_3 subunit mRNA levels.

In our study, the increase in ICER mRNA and protein appear within 1 h following treatment with proBDNF and returns to baseline within 12 h. ICER is an alternative product of the CREM gene but the increase in ICER mRNA appears to be specific to ICER transcripts. Indeed, proBDNF does not increase the ratio of pCREB/CREB. This result indicates that in our model, ICER expression can be activated in a nondependent CRE manner (Lund et al., 2008). Moreover, it is known that after induction, ICER can compete with CREB for the ICER promoter (Molina et al., 1993), suppressing its own transcription in a negative feedback loop, thus explaining the transient activation of ICER observed here.

Upregulation of p75^{NTR} and pathophysiological consequences

P75^{NTR} is widely expressed in the developing CNS, with the highest levels during the first postnatal weeks, a time of synapse formation and elimination, and downregulated in the adult brain (Balkowiec and Katz, 2002; Yang et al., 2009). P75^{NTR} is also upregulated in pathological conditions, including stroke, ischemia, axotomy, mechanical damages, seizures, and Alzheimer's disease (Nykjaer et al., 2005; Underwood and Coulson, 2008). Among these pathophysiological processes, deficits on GABAergic neurotransmission in neurodegenerative and epileptic tissues have been reported (Sperk et al., 2004; Ben-Ari et al., 2007; Drexel et al., 2013). Interestingly, in our *in vitro* and *ex vivo* models, we found that accumulation of proBDNF in the extracellular space impaired GABAergic neurotransmission and induced upregulation of p75^{NTR}. We hypothesize that this positive feedback mechanism operating between proBDNF and p75^{NTR} could be involved in the observed upregulation of p75^{NTR} in pathological conditions and neurodegenerative diseases (Zheng et al., 2010; Zeng et al., 2011; Shulga et al., 2012).

Our *in vivo* approach enabled us to investigate the consequences of endogenous accumulation of proBDNF. Thus, the expected outcomes are the demonstration that *in vivo*, a significant proportion of BDNF is secreted as a precursor, and that the extracellular proBDNF/mBDNF ratio modulates the strength of GABAergic synapses. Pathological alterations in BDNF processing have been reported in several cognitive dysfunctions in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders (Barnes and Thomas, 2008; Unsain et al., 2008; Volosin et al., 2008; Carlino et al., 2011; Yang et al., 2011; Shulga et al., 2012). Because patients with cognitive disorders have abnormal GABA levels, it is plausible that alterations in BDNF processing produce a disturbance of GABAergic synaptic activity. This may then lead to an impaired neuronal network and may have an additive and/or multiplicative effect on neurological diseases.

In summary, our results provide evidence that the proBDNF/p75^{NTR} downstream signaling pathway inhibits the GABAergic system. In previous studies, it was shown that secreted BDNF at neuromuscular junctions can cause a stabilization or retraction of presynaptic terminals acting respectively on TrkB and p75^{NTR} (Yang et al., 2009; Je et al., 2012, 2013). Those authors suggest a model in which BDNF can be either the punishment or the reward signal, depending on the proteolytic conversion. Our results suggest that proBDNF released from the target cells might serve also as a reward or punishment signal for synaptic elimination in the CNS and consequently play a major role in shaping patterns of neuronal connections. These results are particularly interesting in light of the recent demonstration that endogenously expressed proBDNF regulates neuronal morphology and synaptic plasticity in hippocampus, effects that are distinct from those of mBDNF (Yang et al., 2014). This function of proBDNF in shaping neuronal connectivity is supported by the observation that regulated secretion of proBDNF can lead to either a TrkB-dependent increase (Kuczewski et al., 2008b) or a p75^{NTR}-dependent decrease (Langlois et al., 2013) in GABAergic synapses in the developing hippocampus.

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. [Medline](#)
- Barnes P, Thomas KL (2008) Proteolysis of proBDNF is a key regulator in the formation of memory. *PLoS One* 3:e3248. [CrossRef Medline](#)
- Ben-Ari Y, Gaiarsa JL, Tyzio R, Khazipov R (2007) GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol Rev* 87:1215–1284. [CrossRef Medline](#)
- Bozdagi O, Rich E, Tronel S, Sadahiro M, Patterson K, Shapiro ML, Alberini CM, Huntley GW, Salton SR (2008) The neurotrophin-inducible gene *Vgf* regulates hippocampal function and behavior through a brain-derived neurotrophic factor-dependent mechanism. *J Neurosci* 28:9857–9869. [CrossRef Medline](#)
- Brandon NJ, Delmas P, Kittler JT, McDonald BJ, Sieghart W, Brown DA, Smart TG, Moss SJ (2000) GABAA receptor phosphorylation and functional modulation in cortical neurons by a protein kinase C-dependent pathway. *J Biol Chem* 275:38856–38862. [CrossRef Medline](#)
- Buerli T, Pellegrino C, Baer K, Lardi-Studler B, Chudotvorova I, Fritschy JM, Medina I, Fuhrer C (2007) Efficient transfection of DNA or shRNA vectors into neurons using magnetofection. *Nat Protoc* 2:3090–3101. [CrossRef Medline](#)
- Carlino D, Leone E, Di Cola F, Baj G, Marin R, Dinelli G, Tongiorgi E, De Vanna M (2011) Low serum truncated-BDNF isoform correlates with higher cognitive impairment in schizophrenia. *J Psychiatr Res* 45:273–279. [CrossRef Medline](#)
- Carrasco MA, Castro P, Sepulveda FJ, Tapia JC, Gatica K, Davis ML, Aguayo LG (2007) Regulation of glycinergic and GABAergic synaptogenesis by brain-derived neurotrophic factor in developing spinal neurons. *Neuroscience* 145:484–494. [CrossRef Medline](#)
- Chih B, Engelman H, Scheiffele P (2005) Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins. *Science* 307:1324–1328. [CrossRef Medline](#)
- 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. [CrossRef Medline](#)
- Drexel M, Kirchmair E, Sperk G (2013) Changes in the expression of GABAA receptor subunit mRNAs in parahippocampal areas after kainic acid induced seizures. *Front Neural Circuits* 7:142. [Medline](#)
- Elmariah SB, Crumling MA, Parsons TD, Balice-Gordon RJ (2004) Postsynaptic TrkB-mediated signaling modulates excitatory and inhibitory neurotransmitter receptor clustering at hippocampal synapses. *J Neurosci* 24:2380–2393. [CrossRef Medline](#)
- Elmariah SB, Oh EJ, Hughes EG, Balice-Gordon RJ (2005) Astrocytes regulate inhibitory synapse formation via Trk-mediated modulation of postsynaptic GABA_A receptors. *J Neurosci* 25:3638–3650. [CrossRef Medline](#)

- 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. [CrossRef Medline](#)
- Gehler S, Gallo G, Letourneau PC (2004) P75 neurotrophin receptor signaling regulates growth cone filopodial dynamics through modulating RhoA activity. *J Neurosci* 24:4363–4372. [Medline](#)
- Ghosh A, Ginty DD, Bading H, Greenberg ME (1994) Calcium regulation of gene expression in neuronal cells. *J Neurobiol* 25:294–303. [CrossRef Medline](#)
- Goffin D, Ali AB, Rampersaud N, Harkavyi A, Fuchs C, Whitton PS, Nairn AC, Jovanovic JN (2010) Dopamine-dependent tuning of striatal inhibitory synaptogenesis. *J Neurosci* 30:2935–2950. [CrossRef Medline](#)
- Grabenstatter HL, Russek SJ, Brooks-Kayal AR (2012) Molecular pathways controlling inhibitory receptor expression. *Epilepsia* 53 [Suppl 9]:71–78. [CrossRef Medline](#)
- Grabenstatter HL, Del Angel YC, Carlsen J, Wempe MF, White AM, Cogswell M, Russek SJ, Brooks-Kayal AR (2014) The effect of STAT3 inhibition on status epilepticus and subsequent spontaneous seizures in the pilocarpine model of acquired epilepsy. *Neurobiol Dis* 62:73–85. [CrossRef Medline](#)
- 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. [CrossRef Medline](#)
- Haubensack W, Narz F, Heumann R, Lessmann V (1998) BDNF-GFP containing secretory granules are localized in the vicinity of synaptic junctions of cultured cortical neurons. *J Cell Sci* 111: 1483–1493. [Medline](#)
- Huang Z, Zang K, Reichardt LF (2005) The origin recognition core complex regulates dendrite and spine development in postmitotic neurons. *J Cell Biol* 170:527–535. [CrossRef Medline](#)
- Hu Y, Lund IV, Gravielle MC, Farb DH, Brooks-Kayal AR, Russek SJ (2008) 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. *J Biol Chem* 283:9328–9340. [CrossRef Medline](#)
- Jacob TC, Moss SJ, Jurd R (2008) GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat Rev Neurosci* 9:331–343. [CrossRef Medline](#)
- Je HS, Yang F, Ji Y, Nagappan G, Hempstead BL, Lu B (2012) Role of brain-derived neurotrophic factor (proBDNF) to mature BDNF conversion in activity-dependent competition at developing neuromuscular synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:15924–15929. [CrossRef Medline](#)
- Je HS, Yang F, Ji Y, Potluri S, Fu XQ, Luo ZG, Nagappan G, Chan JP, Hempstead B, Son YJ, Lu B (2013) ProBDNF and mature BDNF as punishment and reward signals for synapse elimination at mouse neuromuscular junctions. *J Neurosci* 33:9957–9962. [CrossRef Medline](#)
- Joshi S, Kapur J (2009) Slow intracellular accumulation of GABA(A) receptor delta subunit is modulated by brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience* 164:507–519. [CrossRef Medline](#)
- Jovanovic JN, Thomas P, Kittler JT, Smart TG, Moss SJ (2004) Brain-derived neurotrophic factor modulates fast synaptic inhibition by regulating GABA_A receptor phosphorylation, activity, and cell-surface stability. *J Neurosci* 24:522–530. [CrossRef Medline](#)
- Kittler JT, Delmas P, Jovanovic JN, Brown DA, Smart TG, Moss SJ (2000) Constitutive endocytosis of GABA_A receptors by an association with the adaptin AP2 complex modulates inhibitory synaptic currents in hippocampal neurons. *J Neurosci* 20:7972–7977. [Medline](#)
- Kittler JT, Chen G, Honing S, Bogdanov Y, McAinsh K, Arancibia-Carcamo IL, Jovanovic JN, Pangalos MN, Haucke V, Yan Z, Moss SJ (2005) Phospho-dependent binding of the clathrin AP2 adaptor complex to GABAA receptors regulates the efficacy of inhibitory synaptic transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:14871–14876. [CrossRef Medline](#)
- Kittler JT, Chen G, Kukhtina V, Vahedi-Faridi A, Gu Z, Tretter V, Smith KR, McAinsh K, Arancibia-Carcamo IL, Saenger W, Haucke V, Yan Z, Moss SJ (2008) Regulation of synaptic inhibition by phospho-dependent binding of the AP2 complex to a YECL motif in the GABAA receptor gamma2 subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:3616–3621. [CrossRef Medline](#)
- Kuczewski N, Porcher C, Ferrand N, Fiorentino H, Pellegrino C, Kolarow R, Lessmann V, Medina I, Gaiarsa JL (2008a) Backpropagating action potentials trigger dendritic release of BDNF during spontaneous network activity. *J Neurosci* 28:7013–7023. [CrossRef Medline](#)
- Kuczewski N, Langlois A, Fiorentino H, Bonnet S, Marissal T, Diabira D, Ferrand N, Porcher C, Gaiarsa JL (2008b) Spontaneous glutamatergic activity induces a BDNF-dependent potentiation of GABAergic synapses in the newborn rat hippocampus. *J Physiol* 586:5119–5128. [CrossRef Medline](#)
- 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. [CrossRef Medline](#)
- Langlois A, Diabira D, Ferrand N, Porcher C, Gaiarsa JL (2013) NMDA-dependent switch of proBDNF actions on developing GABAergic synapses. *Cereb Cortex* 23:1085–1096. [CrossRef Medline](#)
- Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL (2001) Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294:1945–1948. [CrossRef Medline](#)
- Lessmann V, Brigadski T (2009) Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: an update. *Neurosci Res* 65:11–22. [CrossRef Medline](#)
- Li Z, Dong X, Dong X, Wang Z, Liu W, Deng N, Ding Y, Tang L, Hla T, Zeng R, Li L, Wu D (2005) Regulation of PTEN by Rho small GTPases. *Nat Cell Biol* 7:399–404. [CrossRef Medline](#)
- Liu B, Li L, Zhang Q, Chang N, Wang D, Shan Y, Li L, Wang H, Feng H, Zhang L, Brann DW, Wan Q (2010) Preservation of GABAA receptor function by PTEN inhibition protects against neuronal death in ischemic. *Stroke* 41:1018–1026. [CrossRef Medline](#)
- Logue SE, Martin SJ (2008) Caspase activation cascades in apoptosis. *Biochem Soc Trans* 36:1–9. [CrossRef Medline](#)
- Lu B (2003) Pro-region of neurotrophins: role in synaptic modulation. *Neuron* 39:735–738. [CrossRef Medline](#)
- Lu B, Pang PT, Woo NH (2005) The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci* 6:603–614. [CrossRef Medline](#)
- Lund IV, Hu Y, Raol YH, Benham RS, Faris R, Russek SJ, Brooks-Kayal AR (2008) BDNF selectively regulates GABAA receptor transcription by activation of the JAK/STAT pathway. *Sci Signal* 1:ra9. [CrossRef Medline](#)
- Luscher B, Fuchs T, Kilpatrick CL (2011) GABAA receptor trafficking-mediated plasticity of inhibitory synapses. *Neuron* 70:385–409. [CrossRef Medline](#)
- Maccario H, Perera NM, Davidson L, Downes CP, Leslie NR (2007) PTEN is destabilized by phosphorylation on Thr366. *Biochem J* 405:439–444. [CrossRef Medline](#)
- Molina CA, Foulkes NS, Lalli E, Sassone-Corsi P (1993) Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. *Cell* 75:875–886. [CrossRef Medline](#)
- Mowla SJ, Farhadi HF, Pareek S, Atwal JK, Morris SJ, Seidah NG, Murphy RA (2001) Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem* 276:12660–12666. [CrossRef Medline](#)
- 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. [CrossRef Medline](#)
- Nykjaer A, Willnow TE, Petersen CM (2005) p75^{NTR}—Live or let die. *Curr Opin Neurobiol* 15:49–57. [CrossRef Medline](#)
- Porcher C, Hatchett C, Longbottom RE, McAinch K, Sihra TS, Moss SJ, Thomson AM, Jovanovic JN (2011) Positive feedback regulation between gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptor signaling and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) release in developing neurons. *J Biol Chem* 286:21667–21677. [CrossRef Medline](#)
- Rico B, Xu B, Reichardt LF (2002) TrkB receptor signaling is required for establishment of GABAergic synapses in the cerebellum. *Nat Neurosci* 5:225–233. [CrossRef Medline](#)
- Rudolph U, Knoflach F (2011) Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABAA receptor subtypes. *Nat Rev Drug Discov* 10:685–697. [CrossRef Medline](#)
- Shulga A, Magalhães AC, Autio H, Plantman S, di Lieto A, Nykjaer A, Carlstedt T, Risling M, Arumäe U, Castrén E, Rivera C (2012) The loop diuretic bumetanide blocks posttraumatic p75^{NTR} upregulation and rescues injured neurons. *J Neurosci* 32:1757–1770. [CrossRef Medline](#)
- Skolnick P (2012) Anxiolytic anxiolytics: on a quest for the Holy Grail. *Trends Pharmacol Sci* 33:611–620. [CrossRef Medline](#)
- Song W, Volosin M, Cragolini AB, Hempstead BL, Friedman WJ (2010) ProNGF induces PTEN via p75^{NTR} to suppress Trk-mediated survival signaling in brain neurons. *J Neurosci* 30:15608–15615. [CrossRef Medline](#)

- Sperk G, Frittinger S, Schwarzer C, Pirker S (2004) GABA and its receptors in epilepsy. *Adv Exp Med Biol* 548:92–103. [CrossRef Medline](#)
- Swanwick CC, Murthy NR, Mtchedlishvili Z, Sieghart W, Kapur J (2006) Development of gamma-aminobutyric acidergic synapses in cultured hippocampal neurons. *J Comp Neurol* 495:497–510. [CrossRef Medline](#)
- Tan KR, Rudolph U, Lüscher C (2011) Hooked on benzodiazepines: GABAA receptor subtypes and addiction. *Trends Neurosci* 34:188–197. [CrossRef Medline](#)
- Thomas P, Mortensen M, Hosie AM, Smart TG (2005) Dynamic mobility of functional GABAA receptors at inhibitory synapses. *Nat Neurosci* 8:889–897. [CrossRef Medline](#)
- Twelvetrees AE, Yuen EY, Arancibia-Carcamo IL, MacAskill AF, Rostaing P, Lumb MJ, Humbert S, Triller A, Saudou F, Yan Z, Kittler JT (2010) Delivery of GABAARs to synapses is mediated by HAP1-KIF5 and disrupted by mutant huntingtin. *Neuron* 65:53–65. [CrossRef Medline](#)
- Underwood CK, Coulson EJ (2008) The p75 neurotrophin receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 40:1664–1668. [CrossRef Medline](#)
- Unsain N, Nuñez N, Anastasia A, Mascó DH (2008) Status epilepticus induces a TrkB to p75 neurotrophin receptor switch and increases brain-derived neurotrophic factor interaction with p75 neurotrophin receptor: an initial event in neuronal injury induction. *Neuroscience* 154:978–993. [CrossRef Medline](#)
- Vasudevan NT, Mohan ML, Gupta MK, Hussain AK, Naga Prasad SV (2011) Inhibition of protein phosphatase 2A activity by PI3K γ regulates β -adrenergic receptor function. *Mol Cell* 41:636–648. [CrossRef Medline](#)
- Vazquez F, Ramaswamy S, Nakamura N, Sellers WR (2000) Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function. *Mol Cell Biol* 20:5010–5018. [CrossRef Medline](#)
- Volosin M, Trotter C, Cragolini A, Kenchappa RS, Light M, Hempstead BL, Carter BD, Friedman WJ (2008) Induction of proneurotrophins and activation of p75^{NTR}-mediated apoptosis via neurotrophin receptor-interacting factor in hippocampal neurons after seizures. *J Neurosci* 28:9870–9879. [CrossRef Medline](#)
- Weber T, Zemelman BV, McNew JA, Westermann B, Gmachl M, Parlati F, Söllner TH, Rothman JE (1998) SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* 92:759–772. [CrossRef Medline](#)
- Winsky-Sommerer R (2009) Role of GABAA receptors in the physiology and pharmacology of sleep. *Eur J Neurosci* 29:1779–1794. [CrossRef Medline](#)
- Wu YJ, Krüttgen A, Möller JC, Shine D, Chan JR, Shooter EM, Cosgaya JM (2004) Nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin-3 are sorted to dense-core vesicles and released via the regulated pathway in primary rat cortical neurons. *J Neurosci Res* 75:825–834. [CrossRef Medline](#)
- Yamashita T, Tohyama M (2003) The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI. *Nat Neurosci* 6:461–467. [CrossRef Medline](#)
- Yang J, Siao CJ, Nagappan G, Marinic T, Jing D, McGrath K, Chen ZY, Mark W, Tessarollo L, Lee FS, Lu B, Hempstead BL (2009) Neuronal release of proBDNF. *Nat Neurosci* 12:113–115. [CrossRef Medline](#)
- Yang J, Harte-Hargrove LC, Siao CJ, Marinic T, Clarke R, Ma Q, Jing D, Lafrancois JJ, Bath KG, Mark W, Ballon D, Lee FS, Scharfman HE, Hempstead BL (2014) proBDNF negatively regulates neuronal remodeling, synaptic transmission, and synaptic plasticity in hippocampus. *Cell Rep* 7:796–806. [CrossRef Medline](#)
- Yang M, Lim Y, Li X, Zhong JH, Zhou XF (2011) Precursor of brain-derived neurotrophic factor (proBDNF) forms a complex with Huntingtin-associated protein-1 (HAP1) and sortilin that modulates proBDNF trafficking, degradation, and processing. *J Biol Chem* 286:16272–16284. [CrossRef Medline](#)
- Yu W, Jiang M, Miralles CP, Li RW, Chen G, de Blas AL (2007) Gephyrin clustering is required for the stability of GABAergic synapses. *Mol Cell Neurosci* 36:484–500. [CrossRef Medline](#)
- Zeng F, Lu JJ, Zhou XF, Wang YJ (2011) Roles of p75^{NTR} in the pathogenesis of Alzheimer's disease: a novel therapeutic target. *Biochem Pharmacol* 82:1500–1509. [CrossRef Medline](#)
- Zhang X, Odom DT, Koo SH, Conkright MD, Canettieri G, Best J, Chen H, Jenner R, Herbolzheimer E, Jacobsen E, Kadam S, Ecker JR, Emerson B, Hogenesch JB, Unterman T, Young RA, Montminy M (2005) Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:4459–4464. [CrossRef Medline](#)
- Zheng Z, Sabirzhanov B, Keifer J (2010) Oligomeric amyloid- β inhibits the proteolytic conversion of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), AMPA receptor trafficking, and classical conditioning. *J Biol Chem* 285:34708–34717. [CrossRef Medline](#)
- Zhou XF, Song XY, Zhong JH, Barati S, Zhou FH, Johnson SM (2004) Distribution and localization of pro-brain-derived neurotrophic factor-like immunoreactivity in the peripheral and central nervous system of the adult rat. *J Neurochem* 91:704–715. [CrossRef Medline](#)

Article II :

**proBDNF-mediated p75^{NTR} activation promotes
depolarizing GABA and increases susceptibility to
epileptic seizures**

proBDNF-mediated p75^{NTR} activation promotes depolarizing GABA and increases susceptibility to epileptic seizures

Baptiste Riffault^{1,2,3}, Nazim Kourdougli^{1,2,3}, Camille Dumon^{1,2,3}, Nadine Ferrand^{1,2,3}, Caroline Chambon^{1,4}, Claudio Rivera^{1,2,3}, Jean-Luc Gaiarsa^{1,2,3}, and Christophe Porcher^{1,2,3}

¹Aix-Marseille Université, Parc Scientifique de Luminy, 13273 Marseille, France.

²INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale) Unité 901, Marseille, Parc Scientifique de Luminy, 13273 Marseille, France. ³INMED (Institut de Neurobiologie de la Méditerranée), Parc Scientifique de Luminy, 13273 Marseille, France. ⁴UMR CNRS6149 Pôle 3C, Laboratoire de Neurobiologie Intégrative & Adaptative, Université de Provence, 3place Victor Hugo, 13331 Marseille cedex03, France

Corresponding author: Christophe Porcher, INMED, INSERM U901, Parc scientifique de Luminy, BP 13, 13273 Marseille Cedex 09, France; Phone: 33 4 91 82 81 29; Fax: 33 4 91 82 81 01; E-mail: Christophe.porcher@inserm.fr

Acknowledgements: This work was supported by The National Institute of Health and Medical Research (INSERM), the National Center for Scientific Research (CNRS) and the National Agency for Research (ANR, grant number R07066AS 2008-2011) We thank F. Michel at InMAGIC (INMED Imaging

Centre) and E. Buhler and F. Schaller at PPGI (INMED Post-genomic facility).

Abstract

The Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) is synthesized as a precursor, namely proBDNF, which can be processed into mature BDNF (mBDNF). Evidences suggest that proBDNF signaling through $p75^{\text{NTR}}$ may account for the emergence of neurological disorders. These findings support the view that the relative availability of mBDNF and proBDNF forms is an important mechanism underlying brain circuit formation and cognitive functions. Here we describe novel insights into the proBDNF/ $p75^{\text{NTR}}$ mechanisms and function *in vivo* in modulating neuronal circuit and synaptic plasticity during the first postnatal weeks in rats. Moreover, our results suggest that proBDNF/ $p75^{\text{NTR}}$ to mBDNF/TrkB ratio may control the timing of the developmental GABAergic switch from depolarizing to hyperpolarizing responses in cortical and hippocampal neurons. Following Status Epilepticus, proBDNF via $p75^{\text{NTR}}$ alters the excitatory/inhibitory equilibrium thereby enhancing neuronal activity through the inhibition of KCC2 expression and function. The aberrant proBDNF/ $p75^{\text{NTR}}$ signaling ultimately led to increased seizure susceptibility that was abolished by *in vivo* blockade of $p75^{\text{NTR}}$. Altogether, our study shed light on how proBDNF/ $p75^{\text{NTR}}$ signaling can orchestrate the GABA excitatory/inhibitory developmental sequence leading to depolarizing and excitatory actions of GABA in adulthood and subsequent epileptic disorders.

Introduction

The brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is an activity-dependent secreted synaptic molecule that plays an important role in brain development and synaptic plasticity (Park and Poo, 2013). BDNF is synthesized as a 32-kDa precursor (proBDNF) that can be processed *intracellularly* to the 14-kDa mature form (mBDNF) by furin, or by extracellular plasmin or matrixmetalloprotease-7 once secreted (Nagappan et al., 2009; Yang et al., 2009). ProBDNF and mBDNF are assumed to produce opposing physiological responses mediated by the activation of two distinct classes of transmembrane receptors, the TrkB and the p75^{NTR} respectively (Lu et al., 2005). The proteolysis of the precursor (proBDNF) is crucial for cognitive functions (Bramham and Messaoudi, 2005; Cohen-Cory et al., 2010; Lu, 2003). Moreover, both in human and animal models accumulating evidences indicate that impairment of proBDNF processing may account for the emergence of neurodevelopmental and neurodegenerative disorders, including schizophrenia, autism and seizures (Binder et al., 2001; Carlino et al., 2011; Garcia et al., 2012). Altogether, these findings support the view that biosynthesis of mBDNF and proBDNF forms is an important mechanism underlying brain remodeling and cognitive functions; thereby its impairment may lead to impaired neuronal network remodeling and subsequently to severe and highly prevalent neurological diseases. Based on such premises, we recently showed that alteration in BDNF maturation triggers an up-regulation of p75^{NTR}, which produces a decrease of GABAergic synaptic activity (Riffault et al., 2014). Abnormalities in inhibitory synaptic neurotransmission have often been linked to epileptic activity (Kaila et al., 2014). Moreover, under epileptic conditions, depolarizing and excitatory GABAergic responses, sustained by a functional decrease of the K⁺ -

Cl⁻ co-transporter KCC2, have been reported (Bragin et al., 2009; Huberfeld et al., 2007a; Pallud et al., 2014; Pathak et al., 2007) Ben-Ari et al., 2012; Blaesse et al., 2009; Kahle et al., 2014; Shulga et al., 2012). Interestingly, BDNF upregulation has been involved in the development of epilepsy (McNamara and Scharfman, 2012; Puranam et al., 2015) but recent evidence also indicates that the proBDNF and p75^{NTR} expression increase after seizures (Unsain et al., 2008; Volosin et al., 2008; VonDran et al., 2014). In the latter study, this increased level of proneurotrophins to seizures occurs independently of cell death (VonDran et al., 2014). These observations suggest that proneurotrophins may participate to the mechanisms of epileptogenesis. However it is currently unknown whether the proBDNF/p75^{NTR} signaling might be involved for a defective chloride homeostasis on GABA_A receptor mediated responses. Due to the primordial role of neurotrophins in brain development and repair, the question of whether and how proBDNF/p75^{NTR} signaling affects neuronal connectivity could be of clinical significance. Furthermore, the expression patterns of proBDNF and p75^{NTR} within the first postnatal weeks suggest that p75^{NTR} activation by proBDNF plays an important role in modulating neuronal circuits during this critical developmental time window (Menshanov et al., 2015). Thus, this ligand-receptor system may be a key regulator in shaping early neural circuitry and synaptic plasticity. This also suggests that imbalance of pro- and mature- BDNF effects may then lead to an impaired neuronal network and to the emergence of neurological disorders at adulthood. The present study aims at elucidating how increased levels of proBDNF during the developmental period leads to the emergence of pathological disorders at later stages. Our results provide the first compelling evidence that proBDNF disrupts the GABA excitatory/inhibitory developmental sequence

leading to depolarizing and excitatory actions of GABA in adulthood, which then favors the emergence of epileptic disorders.

Material and methods

All animal experiments were carried out according to the guidelines set by the INSERM animal welfare through the local committee (project number 02087.02) and the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC). Wistar rats had access to food and water ad libitum and were housed under a 12 h light/dark cycle at 22-24°C.

Reagents and treatments - The following reagents were purchased from the indicated sources: 1,2,3,4-Tetrahydro-6-nitro-2,3-dioxo-benzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide (NBQX) was obtained from the Molecular, Cellular and Genomic Neuroscience Research Branch of the National Institute of Mental Health. TTX was purchased from abcam (Cambridge, UK). Isoguvacine and bicuculline were purchased from Tocris Cookson (Bristol, UK). Strychnine from Sigma (St-Louis, Missouri, USA).

***In utero* electroporation** - *In utero* injections and electroporations were performed as previously described (Carabalona et al., 2012) in embryos from timed pregnant rats (embryonic day 15) that were anaesthetized with ketamine (100 mg/kg) / xylazine (10 mg/kg). Wistar rats (Janvier, France) were raised and mated at INMED Post Genomic Platform (PPGI) animal facility in agreement with the European Union and French legislations. The uterine horns were exposed, and a lateral ventricle of each embryo was injected using pulled glass capillaries and a microinjector (Picospritzer II; General Valve Corporation,

Fairfield, NJ, USA) with Fast Green (2 mg/ml; Sigma, St Louis, MO, USA) combined with the following DNA constructs encoding CR-proBDNF and/or Cl-Sensor (ratio 1:2). Plasmids were further electroporated by discharging a 4000 mF capacitor charged to 50 V with a BTX ECM 830 electroporator (BTX Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). The voltage was discharged in five electrical pulses at 950 ms intervals via 5 mm electrodes placed on the head of the embryo across the uterine wall. We performed *in utero* electroporation in embryonic rats at E15, corresponding to an active period of both radial and tangential migration of newborn neurons in the cortex.

proBDNF immunoassay – To measure the release of proBDNF from cortical slices, 6 ml fractions of the medium were collected. The fractions were concentrated using the Amicon Ultra concentration devices (4000g, 10 min; Millipore Corp., Ireland), with 100 µl final volume. The proBDNF Rapid ELISA Kit (Biosensis Pty Ltd., Thebarton, SA, Australia) was used to quantify the amount of proBDNF in the concentrated solutions following the manufacturer's protocol. Experiments and analysis were done blind.

Western blotting – Rat cerebral cortex were homogenized in RIPA buffer (150 mM NaCl, 1% Triton X100, 0,1% SDS, 50 mM Tris HCl, pH 8, containing protease inhibitors (Complete Mini; Roche). Lysates were centrifuged (10.000g for 10 min at 4°C) and the supernatant was heated at 90°C for 5 min with Laemmli loading buffer. Loading was 20 µg of proteins as determined using a modified Bradford reaction (BioRad Laboratories). Proteins were separated in 7–

15% SDS-PAGE and electrophoretically transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked with 5% Bovine Serum Albumin (BSA) in TBS 0,1% Tween 20 (TBST) for 2h at RT, then incubated with primary antibodies diluted in TBST containing 3% BSA overnight at 4°C or 2h at RT. Blots were probed with antibody against KCC2 (1:2000; rabbit, US Biological), NKCC1 (1:1000; mouse, Chemicon), p75^{NTR} (1:1000; mouse, biosensis) and tubulin (1:10.000; β -tubulin, mouse, Sigma). After washing with TBST, membranes were incubated with HRP-conjugated secondary antibodies diluted in TBST containing 3% BSA for 60 min, washed with TBST and then developed using the G:BOX gel imaging system (Syngene) and expression levels were estimated by Image J software (NIH, Bethesda, MD; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Immunocytochemistry and confocal microscopy - Under deep anesthesia with chloral hydrate, P10 electroparated rats were intracardially perfused with PBS followed by 4% PFA in PBS. Brains were removed, post-fixed overnight at 4°C and rinsed in PBS. Coronal cortical sections (70 μ m thick) were obtained using a vibratome (Microm HM 650V). Sections were incubated first for 1 h in PBS with 1% BSA and 0.3% Triton X-100, then overnight at 4°C with chicken anti-proBDNF (1:000, Chemicon MAB351) or rabbit anti-p75^{NTR} (1:500; Abcam 8874) or rabbit anti-caspase-3 cleaved (1:500, Cell Signaling) or rabbit anti-panKCC2 (1:4000; non commercial) or mouse anti-NeuN (1:1000; chemicon MAB377). Sections were rinsed in PBS and incubated for 2h with the corresponding Cy5 or Cy3-conjugated secondary antibodies diluted in PBS (1:1000; Chemicon). Sequential acquisition of immunoreactivity of GFP positive pyramidal-like cells was performed using laser scanning confocal microscope

(Zeiss LSM 510 Meta) with a x40 or x63 oil-immersion objectives. In each set of images, laser light levels and detector gain and offset were adjusted to avoid any saturated levels. Optical sections were digitized (1024 × 1024 pixels) and processed using Image J software (W.S. Rasband, National Institute of Health).

Quantification. KCC2 analysis was performed in blind. Intensity and distribution analyses of KCC2 fluorescence associated with the membrane or cytosolic regions in control, in CR-proBDNF rats, CR-proBDNF vehicle-treated rats and CR-proBDNF p75^{NTR} Fc-treated rats were performed using 40X objective and Plot analysis from Fiji software. The same straight-line length was applied from the nucleus to the external cell compartment of 30 cells from each condition. The plot profile values were analyzed and calculated the S.E.M. (error bars)

Relative Quantitative Expression of mRNA transcripts – Expressions of p75^{NTR}, NKCC1 and KCC2 mRNA were measured by real-time quantitative RT-PCR. Total RNAs were isolated from cerebral cortices (P20 rats) using Mini RNeasy kit (Qiagen), then converted to cDNA using 1 µg RNA and a QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions. PCR was carried out with the LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche Applied Science) with 1 µL cDNA using the following oligonucleotides (QuantiTect Primer Assays, Qiagen): p75^{NTR} (Ngfr; QT00181874), KCC2 (Slc12a5; QT01792413), NKCC1 (Slc12a2; QT00187173) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; QT001199633). Quantitative RT-PCR was performed with a Roche LC480 Light Cycler (Roche Applied Science) following the

manufacturer's instructions. Relative mRNA values were calculated using the LC480 software and GAPDH as the housekeeping gene. PCR was performed in replicates of 3.

Slices preparation - Electrophysiological recordings from cortical slices were performed from P30 rats. Brains were removed and immersed into ice-cold (2–4°C) ACSF with the following composition (in mM): 126 NaCl, 3.5 KCl, 2 CaCl₂, 1.3 MgCl₂, 1.2 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃ and 11 glucose, pH 7.4 equilibrated with 95% O₂ and 5% CO₂. Hippocampal slices (600 µm thick) were cut with a McIlwain tissue chopper and kept in ACSF at room temperature (25°C) for at least one hour before recording. Slices were then transferred to a submerged recording chamber perfused with ACSF (3 mL/min) at 34°C.

Electrophysiological recording - Whole cell patch-clamp recordings of L4/5 cortical pyramidal neurons were performed with an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments, Union City, CA, USA). Microelectrodes (4–8 MΩ) were filled with the following solution (in mM): caesium gluconate, 120; CsCl, 14; Hepes, 10; EGTA, 1.1; CaCl₂, 0.1; Na₂GTP, 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 mV. Field potentials were recorded using a DAM80 Amplifier (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) using a 1–3 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 mV, $R_i > 400$ M Ω and $R_s < 25$ M Ω . Analysis of spontaneous GABA_A (sIPSCs) and glutamate (sEPSCs) receptor-mediated synaptic activity was performed with Mini Analysis 6.0 software (Synaptosoft, Decatur, GA, USA). The absence of false positive events was confirmed by visual inspection of each experiment. For average data, statistical analysis was performed using Student's paired *t* test.

Spiking activity and data analysis - Extracellular field potential recordings were performed using metal electrodes of 50 μ m diameter (California Fine Wire, Grover Beach, CA, USA). Electrodes were positioned in the LIII/V cortical pyramidal cell layer of the transfected area. Recordings were digitized (10 kHz) online with an analogue-to-digital converter (Digidata 1322A; Axon Instruments) and analysed off-line with the Axon package MiniAnalysis program (Jaejin Software, Leonia, NJ, USA) and Origin 5.0 (Microcal Software, Northampton, MA, USA). Group measures are expressed as means $\pm$ SEM; error bars also indicate SEM. The statistical significance of differences was assessed with Students *t*-test. The level of significance was set at $P < 0.05$. To determine the developmental changes in the GABA_A signaling, we used isoguvacine, a specific GABA_A receptor agonist (Krogsgaard-Larsen and Johnston, 1978). In extracellular recordings, the response to isoguvacine (10 μ M for 2 min) was associated with a transient change in the spiking frequency, that is, action potentials recorded from tens to hundreds of neurons in the vicinity of the recording electrode (Cohen and Miles, 2000). We determined the effect of

isoguvacine on spiking frequency as a ratio of the spiking frequency at the peak of the isoguvacine response to the spiking frequency in control. For the purposes of fit we normalized the effect of isoguvacine by assigning values +1 and -1 for all values >100% (excitation) and <100% (inhibition), respectively.

***In vivo* electrophysiological recordings.** Cortical electroencephalographic (EEG) recordings were performed in freely-moving rats. To implant recording electrodes, rats were anaesthetized with 4.5% isoflurane and maintained at 2.5%, placed in stereotaxic frame and prepared for aseptic surgery. A hole was drilled 2 mm posterior and 1.5 mm right to bregma. A screw connected to EEG transmitter was placed in the skull, and reference electrode was placed rostrally in the cerebellum. The screws were attached to the skull with dental cement and scalp closed. After surgery, rats were kept warm and received saline (0.9% NaCl, s.c.), and analgesic buprenorphine (0.03 mg/kg, s.c.) was administered to minimize animal pain after surgery. After a 24h recovery, EEG (amplified (1000X), filtered at 0.16–97 Hz pass, acquired at 500 Hz) was monitored using a telemetric system (Data Sciences International, St. Paul, MN) for 5 days, 24 h per day; food and water were given ad libitum. Recordings were analyzed offline using Spike2 8.0. Tonic seizures were defined on the EEG as single or multiple 5-30Hz poly-spike of 5 fold SD amplitude and 10-30 s duration.

Non-invasive monitoring of intracellular chloride - To perform a non-invasive monitoring of $[Cl^-]_i$ we used a ratiometric genetically-encoded Cl^- -sensitive probe called Cl^- -Sensor (Markova et al., 2008; Waseem et al., 2010) that was co-

expressed into the cells of interest together with other constructs as described above. The acquisition of fluorescence images was performed using a customized imaging set-up and consecutive cells excitation at 430 and 500 nm as described previously (Friedel et al., 2013). The frequency of acquisition was 0.05 Hz. The duration of excitation was selected for each cell type and was selected to avoid use-dependent bleaching of the signal as described (Friedel et al., 2013).

Cl⁻-Sensor fluorescence recordings from brain slices - Experiments were performed on acute cortical slices derived from *in utero* electroporated rat pups on postnatal days P10 and P30. Brains were removed from anaesthetized (350mgkg⁻¹ chloral hydrate I.P.) animals and immersed into ice-cold (2–4°C) artificial cerebrospinal fluid (ACSF) composed of (mM): NaCl, 126; KCl, 3.5; CaCl₂, 2; MgCl₂, 1.3; NaH₂PO₄, 1.2; NaHCO₃, 25; and glucose, 11; pH 7.4, when equilibrated with 95% O₂ and 5% CO₂. Cortical transverse slices (350 µm) were cut using a Vibratome (VT1000E; Leica, Nussloch, Germany) and maintained in oxygenated (95% O₂ and 5% CO₂, pH 7.3) ACSF at room temperature for at least 1 hour before use. Individual slices were transferred to a specially designed recording chamber where they were fully submerged and superfused with oxygenated ACSF [complemented with 1 µM tetrodotoxin, 1 µM strychnine, and 10 µM NBQX to prevent spontaneous neuronal activity and noncontrolled [Cl⁻]_i changes at 30–32°C at a rate of 2–3 ml/min. The Cl⁻-Sensor fluorescence recordings were performed using the same filter sets and acquisition procedure as described above for cultured cells. The acquisition of fluorescence images was performed using a customized imaging setup and consecutive cell excitation at 430 and 500 nm as described previously (Friedel et al., 2013). The frequency of

acquisition was 0.05 Hz. The duration of excitation was selected to avoid use-dependent bleaching of the signal and was identical for all experiments (Friedel et al., 2013). The applications of the ACSF solution containing isoguvacine (30 μ M) or KCl (25 μ M) + isoguvacine (30 μ M) were performed with a perfusion system. The recovery of fluorescence after Cl^- overload produced by KCl + isoguvacine was recorded in ACSF containing 10 mM bicuculline in addition to the abovementioned blockers to avoid Cl^- efflux through GABA_AR .

Seizure induction with PTZ - To evaluate the susceptibility to seizures in controls rats (GFP-transfected brains) and in CR-proBDNF animals at P20, PTZ (25 mg/kg; Sigma) was administered via intraperitoneal injections every 10 min until generalized seizures occurred. Rats were placed in a plexiglass cage and the time to the onset of the generalized seizure was video-recorded. There was no significant difference in weight or sex-ratio between groups of animals. Experiments were blind: the phenotype of animals was established by morphological analysis after PTZ induction.

Rat model of temporal lobe epilepsy - Six week old male rats were treated with pilocarpine hydrochloride (360 mg/kg, i.p.; Sigma-Aldrich) 30 minutes after scopolamine methyl nitrate (0.5mg/kg, i.p.; Sigma-Aldrich). This pilocarpine dose was chosen because it elicited the most severe seizures with limited mortality, as previously described by other investigators (Escalpez et al., 1999). Animals were continuously monitored to identify the onset of *Status Epilepticus* (SE). Pilocarpine injections resulted in continuous, repetitive behavioral seizures

(defined as SE). Behavioral rating of seizures used the Racine scale (Esclapez et al., 1999) (Racine, 1972). The onset of SE was defined as the time when animals experienced continuous stage 5 seizures on Racine scale. Rats that did not fulfill this criteria for SE were not included in analyses. After 3h of SE, convulsions were suppressed with diazepam (8mg/kg, i.p.; Roche) and saline solution (0.9% NaCl; Sigma-Aldrich) was administrated subcutaneously for re-hydration of the animals. The injection of diazepam was repeated as needed to help terminate behavioral seizures up to 12h after the end of SE.

p75^{NTR} blocking antibody infusion – Osmotic minipumps and cannulae were implanted to focally and continuously deliver a p75^{NTR} functional blocking antibody (p75^{NTR} Ab; 1:500; AB1554; Millipore) to the somatosensory cortex or to the dorsal, left dentate gyrus. Rats were anaesthetized with 4.5% isoflurane and maintained with 2.5% isoflurane for surgery. Rats were placed in a stereotaxic apparatus, a scalp incision was made, and a 0.8 mm diameter hole was drilled through the skull (cortex: A/P 1; L/M -3; D/V -1) or (dentate gyrus: A/P -3.8; L/M +2.5; D/V 3.0) and a 3.0 mm long 28 gauge cannula (Alzet brain infusion kit, Charles River) was inserted and secured to the skull with dental cement. An osmotic mini-pump (Alzet mini-pumps 2002, Charles River) and tubing connected to the cannula were implanted subcutaneously over the back. Mini-pumps contained vehicle solution containing PBS (1M, pH 7.4) supplemented with IgG (1:500, sc-2027, Santa Cruz) or p75^{NTR} Ab solution containing a p75^{NTR} functional blocking antibody diluted (1:500) in PBS (1M, pH7.4). After surgery, rats were kept warm, received saline (0.9% NaCl, s.c.), and analgesic buprenorphine (0.03 mg/kg, s.c.) was administrated to minimize animal pain after

surgery. In all experiments, infusions began at two days post Status Epilepticus and last for 5 days with a delivery rate of $0.5\mu\text{l}/\text{hour} \pm 0.05 \mu\text{l}$ at body temperature.

Statistical analysis - If not stated otherwise, all population data are expressed as mean $\pm$ SEM. Paired Student's *t*-test was used to compare statistical significance between groups in ELISA experiments and unpaired Student's *t*-test was used to examine the statistical significance of the differences between groups in microscopy and QRT-PCR analysis; ANOVA was used for multiple comparisons. Significantly different values (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$) are indicated in figures with asterisks.

Results

Cortical expression of CR-proBDNF

Recent studies have shown that proBDNF is the most abundant isoform expressed in the immature cortex (Menshanov et al., 2015; Perovic et al., 2013). These findings suggest that proBDNF may play an important role in the developing brain. In order to evaluate the functions of proBDNF *in vivo*, a proteolytic cleavage-resistant proBDNF (CR-proBDNF) was synthesized (GeneCust, France) by replacing arginine with alanine that contains a mutated proconvertase/furin cleavage site (Fig. 1A), and previously validated *in vitro* (Riffault et al., 2014). We next inserted the proBDNF mutated sequence in a bicistronic plasmid vector co-expressing CR-proBDNF-mCherry and green fluorescent protein (GFP), under the control of two ubiquitin promoters (Figure 1A). We used *in utero* electroporation of plasmids to express GFP, as a control, or GFP-CR-proBDNF-mCherry (referred as CR-proBDNF) in the neocortex at embryonic day 15 (E15). Coronal sections of CR-proBDNF electroporated brains from P10 to P30 rats were immunolabeled for NeuN, a mature neuronal marker, to assist in the histological identification of cortical layers (Fig. 1C). In CR-proBDNF brains, the GFP and Cherry fluorescence intensity profiles showed that E15 generated neurons were distributed similarly to GFP control rats (Fig. 1C). The high density of CR-proBDNF in Layers III-V corresponded to the region where most GFP positive neurons were located, as shown in Fig. 1B. Our data is consistent with previous reports showing that layers (III-V) rat cortical neurons are generated between E15-E17 (Kriegstein and Noctor, 2004). Thus our CR-proBDNF and GFP positive neurons electroporated at E15 most likely represent

the layer IV/V neurons and some of the first generated Layer II/III neurons. Therefore, layering of upper cortical projection neurons is not affected in GFP control or CR-proBDNF rats. These data indicates that proBDNF did not altered neuronal migration. Moreover, our plasmid vector allowed us to identify the “donor neuron” that co-expressed proBDNF and GFP and “recipient neurons” that expressed mCherry alone (Fig. 1C, left column) (Horch and Katz, 2002). Indeed, in donor neurons, GFP was expressed uniformly in the cytosol and nucleus (Fig. 1C, middle column), whereas CR-proBDNF-mCherry was localized to the cytosol as granule-like structures in both “donor” and “recipient” neurons. These results show that CR-proBDNF can also act in a paracrine manner to affect nearby neurons.

The expression of the receptor-ligand complex proBDNF/p75^{NTR} are increased in CR-proBDNF electroporated cortex

To confirm that mutation of the proteolytic cleavage site prevents conversion of proBDNF into mBDNF, we measured the levels of proBDNF expression in cortical neurons by using primary antibodies directed against the immature form of the BDNF. The intensity of immunostaining for proBDNF was significantly increased in CR-proBDNF (297.22 ± 9.46 % of proBDNF intensity compared to GFP control tissues; $p < 0.001$, 40 neurons analyzed, $n = 4$; Fig. 2A and B). We next measured the concentration of proBDNF in cortical tissues in control, GFP and in the ipsilateral and contralateral hemispheres in CR-proBDNF rats at P20 using an ELISA proBDNF immuno-detection assay. As illustrated in Figure 2C, proBDNF levels in the ipsilateral hemisphere of CR-proBDNF rats

increased significantly (239 ± 4 pg/mL) compared with the contralateral hemisphere (134 ± 3 pg/mL) or with control (125 ± 1 pg/mL) or with rats electroporated with GFP (119 ± 5 pg/mL; $p < 0.01$, $n = 4$). We have recently demonstrated that endogenous or exogenous accumulation of proBDNF triggers an upregulation of p75^{NTR} expression in a positive feedback mechanism operating between proBDNF and its receptor (Riffault et al., 2014). In this study, we have used p75^{NTR} expression levels as a biological marker for the release of proBDNF. As observed for proBDNF immunostaining, we found that the intensity of staining for p75^{NTR} was robustly increased in CR-proBDNF (342.11 ± 5.82 % of p75^{NTR} intensity compared to GFP control tissues; $p < 0.001$, 54 neurons analyzed, $n = 4$; Fig. 2D and F). To confirm the increase of p75^{NTR} proteins in CR-proBDNF tissues, Western blotting analysis was performed on cortical neuronal lysates. We found that proBDNF induces an increase in the total amount of p75^{NTR} proteins (135.29 ± 1.2 %, $p < 0.05$, compared with control; $n = 6$; Fig. 2F). To further investigate whether proBDNF would also regulate p75^{NTR} gene expression, p75^{NTR} mRNA levels were measured using qRT-PCR. As illustrated in Figure 2F, CR-proBDNF cortices show a significant increase of p75^{NTR} mRNA levels (GFP: 7.62 ± 0.21 A.U.; $n = 5$ versus CR-proBDNF: 20.07 ± 0.59 A.U.; $p < 0.05$, $n = 4$; Fig. 2G).

The importance of both mature- and pro- forms of BDNF in the regulation of cortical cell survival (Canals et al., 2001; Menshanov et al., 2015), suggest that an increase in the expression of p75^{NTR} and changes in the levels of proBDNF, could underlie a decrease in the number of cortical neurons. In an attempt to identify a possible decrease in the density of cortical neuron, we quantified the cortical cell number using the expression of the mature neuronal marker NeuN at

P20. The density of NeuN-positive cells was not different between CR-proBDNF and GFP electroporated brains (35.8 ± 3.9 versus 36.1 ± 3.6 NeuN positive cells/ $100 \mu\text{m}^2$ respectively; $p > 0.05$, $n = 4$; Fig. 2H and 2I). Thus, the present data indicates that CR-proBDNF leads to a significant increase in the expression of the receptor-ligand complex proBDNF/p75^{NTR} in both donor and recipient cells. In addition, this increased number of proBDNF/p75^{NTR} positive cells, was observed without reduction of cortical neuron density.

CR-proBDNF induces a disruption of the E/I balance

BDNF has an important role in controlling and regulating the balance between excitatory and inhibitory activity to maintain network function (Cunha et al., 2010). To examine whether accumulation of proBDNF over a long period could alter the cortical excitation to inhibition balance, we evaluate changes in mean glutamatergic and GABAergic spontaneous receptor-mediated postsynaptic currents (sGlu-PSCs and sGABA_APSCs, respectively) at P30 (Fig. 3). These data were then compared to those obtained from GFP control animals. The average frequency of sGlu-PSCs was not different between CR-proBDNF (1.07 ± 0.35 Hz, $n = 5$) and GFP (1.38 ± 0.31 Hz, $n = 5$) P30 neurons (Fig. 3A and 3B). In contrast to sGABA_A-PSCs, the average frequency of sGABA_A-PSCs was significantly increased in CR-proBDNF (1.75 ± 0.39 Hz in CR-proBDNF, $n = 5$) when compared with GFP control rats (0.46 ± 0.10 Hz, $n = 5$, $p < 0.03$) (Fig. 3A and 3C). Accordingly, an increased ratio of GABA/Glutamate is observed in CR-proBDNF neurons (2.21 ± 0.64 Hz, $n = 5$) when compared to GFP control neurons (0.47 ± 0.19 Hz, $n = 5$, $p < 0.001$) (Fig. 3D). The mean kinetic properties

of glutamatergic-PSCs and GABAergic-PSCs were unchanged.

Collectively, these findings demonstrate that cortical neurons of CR-proBDNF rats receive an increase in inhibitory input (sGABA_A-PSCs), thus disrupting the excitatory/inhibitory (E/I) balance.

CR-proBDNF rats display increased susceptibility to PTZ-induced seizures

We next investigated whether the abnormality observed in the E/I imbalance in CR-proBDNF rats may influence the susceptibility to seizures. Thus, CR-proBDNF and age-matched control rats (transfected with GFP alone) at P30 were intraperitoneally injected with subconvulsive doses of PTZ (25 mg/kg) every 10 min. PTZ is known to be a chemical convulsant that induces seizures by blocking the GABA_A receptor-coupled chloride ionophore (Klioueva et al., 2001). Injections of PTZ were continued every 10 mins until each rat had generated tonic-clonic seizure. Seizure susceptibility and severity was quantified with the canonical Racine's scale of seizure severity (Lüttjohann et al., 2009), including dose and latency to onset of the first minimal motor seizure and the first generalized tonic-clonic seizure (Fig. 4). Generalized seizures in vehicle-treated CR-proBDNF rats ($n = 10$) occurred at significantly lower doses of PTZ (77.5 ± 2.5 mg/Kg compared to 90.0 ± 5.5 mg/Kg in control, $n = 10$, $p < 0.05$; Fig. 4B) with a reduced interval between minimal and generalized seizures (1.42 ± 0.21 min compared to 8.06 ± 1.24 min in control, $n = 10$, $p < 0.01$; Fig. 4C) and at significantly shorter latencies than they did in GFP control rats (23.91 ± 0.49 min compared to 31.87 ± 0.73 min in control, $n = 10$, $p < 0.01$; Fig. 4D and 4E). In order to confirm the crucial role of p75^{NTR} signaling in hyperexcitability and

subsequent seizure susceptibility, we infused intracortically and continuously a p75^{NTR} functional blocking antibody (p75^{NTR}Ab) for ten days using osmotic minipumps from P20 to P30 (Fig. 4A for the experimental design). Intracortical infusion of p75^{NTR} Ab-treated CR-proBDNF rats showed PTZ seizure thresholds comparable to GFP control rats (cumulative dose: 100 ± 6.5 mg/Kg; interval: 8.44 ± 1.12 min; mean latency: 35.74 ± 1.54 min, $p > 0.05$ for all experiments when compared to control group, $n = 10$; Fig. 4B-D). Thus, our results demonstrate the key role of altered proBDNF/p75^{NTR} signaling in seizure susceptibility.

Seizures are reported to cause apoptotic neuronal death and given the proapoptotic function established for p75^{NTR} (Friedman, 2010; Volosin et al., 2008), we wanted to investigate whether PTZ-induced seizure increases apoptotic neurodegeneration in cortical neurons in CR-proBDNF rats. To this end, we performed immunohistochemical analysis for cleaved caspase-3, a marker for cell apoptosis (Logue and Martin, 2008), and quantified the ratio of cleaved caspase-3 neurons per surface area. A comparison of the number of cleaved caspase-3-positive neurons before PTZ injection showed that the number of apoptotic neurons did not increase in CR-proBDNF animals (107 ± 14 %, $n = 6$, $p > 0.05$, compared with control). We next found that PTZ-induced seizure induced significant increases in the expression of cleaved caspase-3 in cortical neurons in GFP rats (158 ± 9 %, $n = 6$, $p < 0.05$, compared with control) and this effect is amplified in the vehicle-treated CR-proBDNF group (179 ± 7 %, $n = 6$, $p < 0.05$, compared with control). Whereas, the pretreatment with p75^{NTR} Fc along with PTZ in CR-proBDNF animals showed significantly decreased expression of caspase-3 (108 ± 4 %, $n = 4$, $p > 0.05$, compared with control).

Together, our results indicated that reduced seizure threshold in CR-

proBDNF rats results from the activation of the proBDNF/p75^{NTR} signaling pathway. In addition, these results demonstrate that p75^{NTR} Ab infusion restored the levels of seizure risk back to levels seen in GFP control rats and can prevent some of the deleterious effect of seizure and neuronal degeneration induced by PTZ.

The chloride exporter KCC2 is downregulated in the cortex of proBDNF rats

The developmental excitatory-inhibitory GABA sequence mediated by the upregulation of KCC2 is closely paralleled by the downregulation of proBDNF and p75^{NTR} in cortical regions (Ben-Ari et al., 2007; Menshanov et al., 2015). Furthermore, p75^{NTR}, has been implicated in the decrease of KCC2 expression after neuronal injury (Shulga et al., 2012). These observations lead us to investigate whether proBDNF/p75^{NTR} signaling can modulates KCC2 expression. Thus, we first analyzed the expression of KCC2 and NKCC1 at both mRNA and protein levels in CR-proBDNF rats. NKCC1 mRNA extracted from electroporated cortices at P20 shows similar levels of NKCC1 transcripts when compared with GFP control animals (7.98 ± 1.09 in CR-proBDNF vs 8.06 ± 0.68 $n = 4$, $p > 0.05$; Fig. 5A). In contrast, KCC2 mRNA levels are downregulated in CR-proBDNF rats (1.82 ± 0.43 in CR-proBDNF vs 2.40 ± 0.34 $n = 4$, $p < 0.05$; $n = 4$; Fig. 5A). The NKCC1 and KCC2 proteins as measured by western blotting followed the mRNAs levels. Thus, in CR-proBDNF animals the NKCC1 protein remains unchanged when compared with control GFP (105.32 ± 2.76 % compared with control, $p > 0.05$; $n = 4$; Fig. 4B), whereas KCC2 expression was significantly reduced to 20 % of the control GFP (79.31 ± 4.37 % compared with control, $p <$

0.05; $n = 4$; Fig. 4B). We next analyzed whether the overall neuronal distribution of KCC2 is altered in CR-proBDNF electroporated cortices. To this end, we performed KCC2 immunolabeling and analyzed at P30, the intensity and distribution of KCC2 plotted as a function of pixel distance across the soma (Kourdougli et al., 2015). In GFP control rats, as expected KCC2 immunolabeling show a strong perisomatic staining pattern as shown by the narrow peak occurring at the somatic periphery (green curve, Fig. 5E). Compared with GFP control rats, CR-proBDNF animals showed a disrupted cell membrane expression (Fig. 5C and 5D) and a decrease in the immunostaining intensity of KCC2 (Fig. 5E).

Taken together, our qRT-PCR, immunoblot and immunofluorescence results demonstrate that proBDNF decreased KCC2 levels and altered KCC2 distribution throughout the neurons.

The developmental GABA excitatory to inhibitory shift is abolished in the presence of proBDNF

Cortical GABAergic excitation contributes to epileptic activities (Kaila et al., 2014; Pallud et al., 2014). This increased cell excitability could be sustained by a lower expression of KCC2 that leads to higher neuronal $[Cl^-]_i$ and to GABA_A receptor mediated depolarization instead of hyperpolarization (Boulenguez et al., 2010; Conti et al., 2011; Friedel et al., 2015; Nabekura et al., 2002; Rivera et al., 2004). The results above show that activation of the proBDNF/p75^{NTR} signaling decreases KCC2 expression and increases GABAergic synaptic activity and susceptibility to PTZ-induced seizures. To test whether proBDNF/p75^{NTR} signaling regulates Cl^- homeostasis, constructs encoding Cl^- -Sensor plus GFP

(control) or Cl⁻-Sensor plus CR-proBDNF were electroporated *in utero* in rats at E15 (see Methods for details). Transverse slices of cortex were prepared on postnatal days P10 and P30. Electroporated slices harbored hundreds of neurons expressing Cl⁻-Sensor in cortical layers III-V, which exhibited variable absolute values of $R_{430/500}$ (Fig. 6A). Despite the observed variability in absolute values, bath application of isoguvacine (30 μ M, 3 min) to P10 CR-proBDNF and GFP control slices produced a uniform decrease of $R_{430/500}$ (indicated by an arrow in Fig. 6B and by the negative value of $\Delta R/R$ in Fig. 6E) in approximately 80 % of fluorescent neurons, reflecting a decrease in $[Cl^-]_i$ characteristic of depolarizing action of GABA. Bath application of isoguvacine (10 μ M, 3 min) to P30 GFP control slices showed a significantly increase of $R_{430/500}$ (0.174 ± 0.044 A.U., $p < 0.001$, $n = 5$; Fig. 6C), characteristic of an Cl⁻ ion influx (indicated by an arrow in Fig. 6B and by the positive value of $\Delta R/R$ in Fig. 6C) into the cell indicating that GABA switched from depolarizing to hyperpolarizing actions. Compared to GFP control slices, CR-proBDNF slices at P30 showed a reduction of $R_{430/500}$ (0.076 ± 0.004 %, $p < 0.001$, $n = 5$), suggesting that the conversion of GABA-induced depolarization into hyperpolarization is impaired (indicated by an arrowhead in Fig. 6C and by the negative value of $\Delta R/R$ in Fig. 6C).

To test whether CR-proBDNF affects Cl⁻ extrusion efficacy in this model, we applied artificial cerebrospinal fluid (ACSF) solution containing 25 mM KCl (to depolarize neurons) and 10 μ M of isoguvacine (to load neurons with Cl⁻ via GABA_AR activation) in P30 slice preparations as above. This protocol produced a robust increase of $R_{430/500}$, reflecting a rise in neuronal $[Cl^-]_i$ that recovered progressively to the control values after isoguvacine washout (Fig. 6D). In mature P30 slices expressing CR-proBDNF, the half-recovery time was significantly

longer than those measured in slices expressing control GFP (1.83 ± 0.25 min and 1.00 ± 0.10 min, respectively, $p < 0.05$, $n = 7$, Fig. 6E). These results suggest that *in vivo* CR-proBDNF downregulates KCC2-dependent neuronal Cl^- extrusion that maintains a depolarizing shift in GABA activity in mature neurons.

ProBDNF-mediated KCC2 downregulation leads to GABA excitatory activity in mature cortical neurons

Although our data indicated that KCC2 activity is downregulated in proBDNF condition, thus leading to elevated intracellular chloride and depolarizing action of GABA, we wanted to determine whether this effect is associated with excitatory or inhibitory actions at the network level. Indeed, GABA-induced depolarizing currents are not necessarily excitatory (Ben-Ari, 2015; Kirmse et al., 2015) and can inhibit neuronal activity through a shunting mechanism that raises the spike threshold (Ben-Ari, 2002). We then evaluated whether the depolarizing action of GABA were associated with neuronal activation by performing field recordings of cortical slices at P30 in control (GFP) and CR-proBDNF rats. To activate GABA_A receptors (GABA_ARs) we bath-applied the selective GABA_AR agonist isoguvacine ($10 \mu\text{M}$). In slices from GFP control group, isoguvacine invariably induced a decrease of spiking activity in field-potential recordings at P30 (-29.4 ± 12.2 %, $p < 0.05$, $n = 6$; Fig. 7A). In contrast, in slices obtained from CR-proBDNF rats at P30, isoguvacine invariably induced an increase of spiking activity ($+24.6 \pm 10.7$ %, $p < 0.01$, $n = 6$; Fig. 7B). Our data thereby show that GABAergic transmission has excitatory functions of cortical network at P30 in CR-proBDNF rats (Fig. 7C).

Early p75^{NTR} Ab infusion reduced seizure frequency during the chronic phase of TLE

The induction of epileptic seizures by pilocarpine injection results in increased cellular levels of proBDNF and p75^{NTR} (Unsain et al., 2008; Volosin et al., 2008; VonDran et al., 2014), suggesting that proBDNF/p75^{NTR} signaling may participate to epileptogenesis. In an attempt to elucidate the role of proBDNF/p75^{NTR} signaling in spontaneous epileptiform discharges, we used the pilocarpine model of Temporal Lobe Epilepsy (TLE). We first measured the proBDNF levels following pilocarpine by using ELISA assay to characterize the total proteins levels of the proBDNF in rat hippocampi. Rats were injected with saline or pilocarpine to induce *Status Epilepticus* (SE) and sacrificed at two days post SE for hippocampal dissection. We show that proBDNF protein levels were significantly upregulated at d2 post-SE, confirming previous studies (Unsain et al., 2008; Volosin et al., 2008; VonDran et al., 2014) (Fig. 8B, vehicle-treated vs pilocarpine-treated rats: 97.70 ± 5.51 vs 320.71 ± 23.76 ; $p < 0.001$). We next investigated whether proBDNF/p75^{NTR} pathway is involved in the development of spontaneous seizures after pilocarpine-induced SE. For this purpose, we decided to infuse intrahippocampally a p75^{NTR} functional blocking antibody (p75^{NTR} Ab) (Buckmaster et al., 2009) from d2 to d5 post-SE (Fig. 8A for the experimental design). We analyzed the seizure activity with telemetric cortical electroencephalographic (EEG) recordings at 2 months post SE in vehicle- and p75^{NTR} Ab-treated rats (Fig. 8A). Ictal discharges, due to abnormal and long-lasting hypersynchronous neuronal activity, constitute the cardinal pathophysiological EEG activity in TLE. These spontaneous and recurrent ictal

events lead to profound disabling clinical manifestations. Vehicle-treated rats displayed numerous ictal discharges ($15,8 \pm 1,25$ per day) lasting $21,34 \pm 0,87$ s ($n = 3$) and including tonic and clonic phases (Fig. 8C). These ictal events corresponded to the well-described tonic-clonic seizures with motor convulsions and loss of postural control. We observed a significant decrease of the number of ictal events in p75^{NTR} Ab-treated rats (by 40 %) (Fig. 8D) without a significant change in their duration ($p > 0.05$, $n = 3$). Finally, we examined whether the upregulation of proBDNF following SE induced a decrease in KCC2 expression as previously observed in CR-proBDNF rats (Fig. 8E). We then performed immunohistological analysis of KCC2 expression in vehicle- and p75^{NTR} Ab-treated rats at d5 post SE within the CA3 region. Unlike in control rats (Fig. 8E, left panel), KCC2 immunolabeling is very low and diffuse within the soma in vehicle-treated rats at d5 post SE, whereas KCC2 harbor a preferentially perisomatic staining pattern in p75^{NTR} Ab-treated rats, as shown by the narrow peak occurring at the somatic periphery (green curve, Fig. 8E).

Taken together, these experiments demonstrate that proBDNF play a major role in the generation of ictal discharges in vivo in TLE and, furthermore, we show that intrahippocampal infusion from d2 to d5 post SE inhibits the progression of epileptogenesis and restored KCC2 protein expression and function in rat hippocampus.

Discussion

In the current study, we evaluated the actions of proBDNF *in vivo* using *in utero* injection and electroporation of the embryonic rat neocortex at embryonic day 15 with a cleavage-resistant proBDNF. Our data obtained between post-natal days 10 and 30 of electroporated rat cortices demonstrated that proBDNF overexpression affects neuronal activity that resulted from a compromised GABAergic inhibition through the activation of the p75^{NTR}. As recently shown in the hippocampus, pharmacological inhibition of KCC2 can lead to seizure activity (Sivakumaran et al., 2015). Moreover, both in animal models and human epileptic patients KCC2 downregulation results in an imbalance of excitation/inhibition levels and is correlated to the emergence of epileptiform activity (Huberfeld et al., 2007a; Muñoz et al., 2007; Pallud et al., 2014; Pathak et al., 2007; Shimizu-Okabe et al., 2011). In the present study, we show that proBDNF inhibits KCC2 expression and function in cortical neurons resulting in seizure susceptibility. Importantly, we show that blocking GABA_A depolarization by functionally inhibiting p75^{NTR}, resulted in a robust attenuation of susceptibility to seizures associated by a large increase in the cell membrane expression of KCC2. This is in accordance with previous studies showing that acute inhibition of the depolarizing action of GABA reduced interictal-like activity in models of temporal lobe epilepsy (TLE) (Bragin et al., 2009; Huberfeld et al., 2007b; Muñoz et al., 2007). Moreover, functional changes in GABA_A receptor-mediated responses in developmental and pathological conditions are paralleled to the changes in the expression levels of p75^{NTR} (Blaesse et al., 2009; Nykjaer et al., 2005; Underwood and Coulson, 2008). Altogether, our data suggest that depolarizing action of GABA_A could be induced through proBDNF mediated

p75^{NTR} signaling. Finally, in order to confirm this hypothesis, we used a pilocarpine model of TLE and we found that application of a functional blocking p75^{NTR} post-status epilepticus (SE) significantly reduced ictal discharges during the chronic phase of the pathology. These results suggest that proBDNF/p75^{NTR} may be an important effector of the seizure pathology and blockade of p75^{NTR} induced GABA_A-mediated depolarization can prevent some of the epileptogenic mechanisms.

Mature BDNF, proBDNF and their receptors TrkB and p75^{NTR} respectively, are widely expressed in the embryonic and developing CNS with highest levels during the first postnatal weeks, and are implicated in a number of critical processes in the coordination of neuronal network construction and synaptic plasticity. The highest levels of proBDNF are observed between post-natal days 8-15, whereas mature BDNF peaks at later stages, around post-natal day 15 (Langlois et al., 2013; Winnubst et al., 2015; Yang et al., 2009, 2014). Two recent studies demonstrated that in the immature neocortex and hippocampus, proBDNF was the predominant form of BDNF (Menshanov et al., 2015; Yang et al., 2014). Once secreted, proBDNF can be cleaved by extracellular proteases to yield the mature form. This extracellular conversion of proBDNF can be modulated under physiological conditions mainly determined by the level and/or pattern of synaptic activity, generated in the developing neuronal network (Langlois et al., 2013; Nagappan et al., 2009). Thus, the expression patterns of mature BDNF/TrkB to proBDNF/p75^{NTR} ratio during the developmental period are known to regulate the efficacy of GABAergic synaptic transmission (Langlois et al., 2013; Riffault et al., 2014). Conversely, GABAergic activity triggers release of BDNF which in turn will fine-tune neuronal connectivity (Fiorentino et

al., 2009; Kuczewski et al., 2009; Porcher et al., 2011). In the present study, we show that overexpression of proBDNF in somatosensory cortical neurons during the developmental period (i.e. from E15 to P20) increases spontaneous GABAergic currents that induce a disruption of the excitatory/inhibitory balance. An imbalance between excitatory and inhibitory circuits has been found in various neurological disorders including epilepsy (Fritschy, 2008). Surprisingly, our results show that increased spontaneous GABAergic activity was correlated with increased seizure susceptibility. These effects were mediated through the p75^{NTR} signaling as infusion between post-natal days 20 to 30 was sufficient to restore pentylentetrazol thresholds to control levels. These results suggest that an underlying cause of seizure susceptibility to reduced pentylentetrazol dose and shorter latency between major to maximal seizures is directly related to a weakness or a loss of GABA_A inhibition. Indeed, GABAergic transmission can be either excitatory or inhibitory, depending on the intracellular concentration of chloride (Ben-Ari et al., 2012; Fritschy, 2008; Kaila et al., 1993). Therefore, GABAergic transmission is intimately linked on the expression levels of two major cation-chloride cotransporters, NKCC1 and KCC2, acting in an opposite manner. These co-transporters are developmentally regulated (Ben-Ari, 2002; Dzhalal et al., 2005; Rivera et al., 1999; Sedmak et al., 2015). The developmental switch from excitatory to inhibitory results from a KCC2-dependent increase in neuronal chloride extrusion beginning in post-natal days 6-8 in cortex (Khalilov et al., 2011; Zhu et al., 2008) and GABA remains depolarizing until postnatal days 8-13 in rat cortical slices (Friedel et al., 2015). Our *ex vivo* experiments performed in cortical slices from GFP control rats are consistent with other developmental studies showing that excitatory actions of GABA are found in immature neurons

at post-natal day 10 whereas GABA responses were hyperpolarizing in mature neurons (i.e. post-natal day 30). In contrast, we found that activation of the GABA_A receptor by isoguvacine, in mature proBDNF neurons (P30) results in chloride efflux which consequently depolarized the neurons. These results provide evidence supporting that activation of the proBDNF/p75^{NTR} signaling maintains depolarizing and excitatory action of GABA during development and in mature neuronal network which in turn induce network hyperexcitability. What could be the developmental function of proBDNF in immature cortex and by which intracellular signaling proBDNF/p75^{NTR} regulates KCC2 expression remains to be elucidated. Nevertheless, our study provides new findings on the potential function of proBDNF in chloride homeostasis by regulating KCC2 expression levels. In the neocortex, mature BDNF expression increases during development (Maisonpierre et al., 1990) and exerts, via TrkB activation, a facilitatory effect on the expression of KCC2 (Ludwig et al., 2011). Conversely, the developmental decrease of proBDNF (Menshanov et al., 2015) is correlated with upregulation of KCC2. Therefore, the mature BDNF to proBDNF ratio in the first postnatal weeks may also contribute to the developmental shift of GABA from depolarizing to hyperpolarizing.

In a recent study, we demonstrated that accumulation of proBDNF induced upregulation of its receptor p75^{NTR}, suggesting that proBDNF release promotes the synthesis and membrane insertion of p75^{NTR}, further enhancing proBDNF/p75^{NTR} signaling (Riffault et al., 2014). In the present research, we confirmed that *in vivo* overexpression of proBDNF induced the upregulation of p75^{NTR}. Previous observations have shown that proBDNF and p75^{NTR} were significantly elevated in rats and mice, following pilocarpine-induced seizures

(Unsain et al., 2008; Volosin et al., 2008; VonDran et al., 2014), suggesting that $p75^{NTR}$ plays a significant role in mediating neuronal loss after seizures (Friedman, 2010). However, the observed increase of proBDNF and $p75^{NTR}$ after seizures were also found in the absence of significant cell death (VonDran et al., 2014). According to these studies, we used a pilocarpine model of TLE and found that $p75^{NTR}$ was upregulated in SE. In addition, we provide evidences that endogenous proBDNF/ $p75^{NTR}$ response following SE selectively downregulates KCC2 in the hippocampus which in turn leads to hyperexcitability. Clinical and experimental evidences indicate that impaired chloride extrusion resulting from decreased KCC2 expression can change GABA_A receptor activation from hyperpolarization to depolarization and facilitate epileptiform discharges (Huberfeld et al., 2007; Jin et al., 2005; Pallud et al., 2014; Sivakumaran et al., 2015; Stöddberg et al., 2015). Thus, our findings strongly suggest that activation of $p75^{NTR}$ by proBDNF following SE leads to a depolarizing action of GABA sustained by a selective deficit of KCC2 activity and contributes to epileptiform activities. Importantly, we show that early blockade of $p75^{NTR}$ prevent some of the epileptogenic mechanisms such as by rescuing KCC2 expression and reducing network hyperexcitability. Our results contrast with those of Grabenstatter et al. (2014) where intraperitoneal administration of a small molecule binding on $p75^{NTR}$ prior to and at onset of SE, at a time point where $p75^{NTR}$ was not upregulated, did not prevent or reduce the development of spontaneous seizures after SE (Grabenstatter et al., 2014). Here, we have used osmotic minipumps to continuously deliver intrahippocampally a functionally blocking $p75^{NTR}$ during early epileptogenesis, a time window previously demonstrated to harbor $p75^{NTR}$ upregulation (VonDran et al., 2014) and significantly reduced seizure frequency

during the chronic phase of the pathology. Thus, this apparent discrepancy can account from different experimental design, our data further suggest a critical role of p75^{NTR} during epileptogenesis.

To conclude, our results provide novel insights into the proBDNF/p75^{NTR} mechanisms and function in modulating chloride homeostasis during the development of neuronal networks and in the pathogenesis of epilepsy. Thus, our data suggest that i) under physiological conditions, proBDNF/p75^{NTR} to mBDNF/TrkB ratio may control the timing of the developmental shift of GABA depolarizing to hyperpolarizing in cortical and hippocampal neurons, and ii) in pathophysiological response to SE, proBDNF via p75^{NTR} alters the excitatory/inhibitory equilibrium thereby enhancing neuronal activity through the inhibition of KCC2 function. Altogether, these data shed light on the pivotal role of proBDNF/p75^{NTR} signaling in epileptogenesis and may explain some of the mechanisms that take place during this critical period. These results potentially lead to new therapeutic strategy to prevent the development of epilepsy.

References

1. Ben-Ari, Y. (2002). Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 728–739.
2. Ben-Ari, Y. (2015). Is birth a critical period in the pathogenesis of autism spectrum disorders? *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 498–505.
3. Ben-Ari, Y., Gaiarsa, J.-L., Tyzio, R., and Khazipov, R. (2007). GABA: A Pioneer Transmitter That Excites Immature Neurons and Generates Primitive Oscillations. *Physiol. Rev.* 87, 1215–1284.
4. Ben-Ari, Y., Khalilov, I., Kahle, K.T., and Cherubini, E. (2012). The GABA Excitatory/Inhibitory Shift in Brain Maturation and Neurological Disorders. *The Neuroscientist* 18, 467–486.
5. Binder, D.K., Croll, S.D., Gall, C.M., and Scharfman, H.E. (2001). BDNF and epilepsy: too much of a good thing? *Trends Neurosci.* 24, 47–53.
6. Blaesse, P., Airaksinen, M.S., Rivera, C., and Kaila, K. (2009). Cation-chloride cotransporters and neuronal function. *Neuron* 61, 820–838.
7. Boulenguez, P., Liabeuf, S., Bos, R., Bras, H., Jean-Xavier, C., Brocard, C., Stil, A., Darbon, P., Cattaert, D., Delpire, E., et al. (2010). Down-regulation of the potassium-chloride cotransporter KCC2 contributes to spasticity after spinal cord injury. *Nat. Med.* 16, 302–307.
8. Bragin, A., Azizyan, A., Almajano, J., and Engel, J. (2009). The cause of the imbalance in the neuronal network leading to seizure activity can be predicted by the electrographic pattern of the seizure onset. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 3660–3671.
9. Bramham, C.R., and Messaoudi, E. (2005). BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Prog. Neurobiol.* 76, 99–125.
10. Buckmaster, P.S., Ingram, E.A., and Wen, X. (2009). Inhibition of the mammalian target of rapamycin signaling pathway suppresses dentate granule cell axon sprouting in a rodent model of temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 8259–8269.
11. Canals, J.M., Checa, N., Marco, S., Akerud, P., Michels, A., Pérez-Navarro, E., Tolosa, E., Arenas, E., and Alberch, J. (2001). Expression of brain-derived neurotrophic factor in cortical neurons is regulated by striatal target area. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 117–124.
12. Carlino, D., Leone, E., Di Cola, F., Baj, G., Marin, R., Dinelli, G., Tongiorgi, E., and De Vanna, M. (2011). Low serum truncated-BDNF isoform correlates with higher cognitive impairment in schizophrenia. *J. Psychiatr. Res.* 45, 273–279.
13. Cohen, I., and Miles, R. (2000). Contributions of intrinsic and synaptic activities to the generation of neuronal discharges in in vitro hippocampus. *J. Physiol.* 524, 485–502.
14. Cohen-Cory, S., Kidane, A.H., Shirkey, N.J., and Marshak, S. (2010). Brain-Derived Neurotrophic Factor and the Development of Structural Neuronal Connectivity. *Dev. Neurobiol.* 70, 271–288.
15. Conti, L., Palma, E., Roseti, C., Lauro, C., Cipriani, R., de Groot, M., Aronica, E., and Limatola, C. (2011). Anomalous levels of Cl⁻ transporters cause a decrease of GABAergic inhibition in human peritumoral epileptic cortex. *Epilepsia* 52, 1635–1644.

16. Cunha, C., Brambilla, R., and Thomas, K.L. (2010). A Simple Role for BDNF in Learning and Memory? *Front. Mol. Neurosci.* 3.
17. Dzhalal, V.I., Talos, D.M., Sdrulla, D.A., Brumback, A.C., Mathews, G.C., Benke, T.A., Delpire, E., Jensen, F.E., and Staley, K.J. (2005). NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nat. Med.* 11, 1205–1213.
18. Esclapez, M., Hirsch, J.C., Ben-Ari, Y., and Bernard, C. (1999). Newly formed excitatory pathways provide a substrate for hyperexcitability in experimental temporal lobe epilepsy. *J. Comp. Neurol.* 408, 449–460.
19. Fiorentino, H., Kuczewski, N., Diabira, D., Ferrand, N., Pangalos, M.N., Porcher, C., and Gaiarsa, J.-L. (2009). GABA(B) receptor activation triggers BDNF release and promotes the maturation of GABAergic synapses. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 11650–11661.
20. Friedel, P., Bregeestovski, P., and Medina, I. (2013). Improved method for efficient imaging of intracellular Cl(-) with Cl-Sensor using conventional fluorescence setup. *Front. Mol. Neurosci.* 6, 7.
21. Friedel, P., Kahle, K.T., Zhang, J., Hertz, N., Pisella, L.I., Buhler, E., Schaller, F., Duan, J., Khanna, A.R., Bishop, P.N., et al. (2015). WNK1-regulated inhibitory phosphorylation of the KCC2 cotransporter maintains the depolarizing action of GABA in immature neurons. *Sci Signal* 8, ra65–ra65.
22. Friedman, W.J. (2010). Proneurotrophins, Seizures, and Neuronal Apoptosis. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* 16, 244–252.
23. Fritschy, J.-M. (2008). Epilepsy, E/I Balance and GABAA Receptor Plasticity. *Front. Mol. Neurosci.* 1.
24. Garcia, K.L.P., Yu, G., Nicolini, C., Michalski, B., Garzon, D.J., Chiu, V.S., Tongiorgi, E., Szatmari, P., and Fahnstock, M. (2012). Altered balance of proteolytic isoforms of pro-brain-derived neurotrophic factor in autism. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 71, 289–297.
25. Grabenstatter, H.L., Carlsen, J., Raol, Y.H., Yang, T., Hund, D., Cruz Del Angel, Y., White, A.M., Gonzalez, M.I., Longo, F.M., Russek, S.J., et al. (2014). Acute administration of the small-molecule p75(NTR) ligand does not prevent hippocampal neuron loss or development of spontaneous seizures after pilocarpine-induced status epilepticus. *J. Neurosci. Res.* 92, 1307–1318.
26. Horch, H.W., and Katz, L.C. (2002). BDNF release from single cells elicits local dendritic growth in nearby neurons. *Nat. Neurosci.* 5, 1177–1184.
27. Huberfeld, G., Wittner, L., Clemenceau, S., Baulac, M., Kaila, K., Miles, R., and Rivera, C. (2007a). Perturbed Chloride Homeostasis and GABAergic Signaling in Human Temporal Lobe Epilepsy. *J. Neurosci.* 27, 9866–9873.
28. Huberfeld, G., Wittner, L., Clemenceau, S., Baulac, M., Kaila, K., Miles, R., and Rivera, C. (2007b). Perturbed Chloride Homeostasis and GABAergic Signaling in Human Temporal Lobe Epilepsy. *J. Neurosci.* 27, 9866–9873.
29. Jin, X., Huguenard, J.R., and Prince, D.A. (2005). Impaired Cl⁻ Extrusion in Layer V Pyramidal Neurons of Chronically Injured Epileptogenic Neocortex. *J. Neurophysiol.* 93, 2117–2126.

30. Kahle, K.T., Merner, N.D., Friedel, P., Silayeva, L., Liang, B., Khanna, A., Shang, Y., Lachance-Touchette, P., Bourassa, C., Levert, A., et al. (2014). Genetically encoded impairment of neuronal KCC2 cotransporter function in human idiopathic generalized epilepsy. *EMBO Rep.* 15, 766–774.
31. Kaila, K., Voipio, J., Paalasmaa, P., Pasternack, M., and Deisz, R.A. (1993). The role of bicarbonate in GABAA receptor-mediated IPSPs of rat neocortical neurones. *J. Physiol.* 464, 273–289.
32. Kaila, K., Ruusuvuori, E., Seja, P., Voipio, J., and Puskarjov, M. (2014). GABA actions and ionic plasticity in epilepsy. *Curr. Opin. Neurobiol.* 26, 34–41.
33. Khalilov, I., Chazal, G., Chudotvorova, I., Pellegrino, C., Corby, S., Ferrand, N., Gubkina, O., Nardou, R., Tyzio, R., Yamamoto, S., et al. (2011). Enhanced Synaptic Activity and Epileptiform Events in the Embryonic KCC2 Deficient Hippocampus. *Front. Cell. Neurosci.* 5, 23.
34. Khirug, S., Huttu, K., Ludwig, A., Smirnov, S., Voipio, J., Rivera, C., Kaila, K., and Khiroug, L. (2005). Distinct properties of functional KCC2 expression in immature mouse hippocampal neurons in culture and in acute slices. *Eur. J. Neurosci.* 21, 899–904.
35. Kirmse, K., Kummer, M., Kovalchuk, Y., Witte, O.W., Garaschuk, O., and Holthoff, K. (2015). GABA depolarizes immature neurons and inhibits network activity in the neonatal neocortex in vivo. *Nat. Commun.* 6, 7750.
36. Klioueva, I.A., van Luijtelaa, E.L., Chepurnova, N.E., and Chepurnov, S.A. (2001). PTZ-induced seizures in rats: effects of age and strain. *Physiol. Behav.* 72, 421–426.
37. KOURDOUGLI, N., Varpula, S., Chazal, G., and Rivera, C. (2015). Detrimental effect of post Status Epilepticus treatment with ROCK inhibitor Y-27632 in a pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 413.
38. Kriegstein, A.R., and Noctor, S.C. (2004). Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends Neurosci.* 27, 392–399.
39. Krosgaard-Larsen, P., and Johnston, G. a. R. (1978). Structure-Activity Studies on the Inhibition of Gaba Binding to Rat Brain Membranes by Muscimol and Related Compounds. *J. Neurochem.* 30, 1377–1382.
40. Kuczewski, N., Porcher, C., Lessmann, V., Medina, I., and Gaiarsa, J.-L. (2009). Activity-dependent dendritic release of BDNF and biological consequences. *Mol. Neurobiol.* 39, 37–49.
41. Langlois, A., Diabira, D., Ferrand, N., Porcher, C., and Gaiarsa, J.-L. (2013). NMDA-dependent switch of proBDNF actions on developing GABAergic synapses. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 23, 1085–1096.
42. Logue, S.E., and Martin, S.J. (2008). Caspase activation cascades in apoptosis. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 1–9.
43. Lu, B. (2003). Pro-region of neurotrophins: role in synaptic modulation. *Neuron* 39, 735–738.
44. Lu, B., Pang, P.T., and Woo, N.H. (2005). The yin and yang of neurotrophin action. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 603–614.
45. Ludwig, A., Uvarov, P., Soni, S., Thomas-Crusells, J., Airaksinen, M.S., and Rivera, C. (2011). Early growth response 4 mediates BDNF induction of potassium chloride cotransporter 2 transcription. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 644–649.

46. Lüttjohann, A., Fabene, P.F., and van Luijtelaar, G. (2009). A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiol. Behav.* 98, 579–586.
47. Maisonpierre, P.C., Belluscio, L., Friedman, B., Alderson, R.F., Wiegand, S.J., Furth, M.E., Lindsay, R.M., and Yancopoulos, G.D. (1990). NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron* 5, 501–509.
48. Markova, O., Mukhtarov, M., Real, E., Jacob, Y., and Bregestovski, P. (2008). Genetically encoded chloride indicator with improved sensitivity. *J. Neurosci. Methods* 170, 67–76.
49. McNamara, J.O., and Scharfman, H.E. (2012). Temporal Lobe Epilepsy and the BDNF Receptor, TrkB. In Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies, J.L. Noebels, M. Avoli, M.A. Rogawski, R.W. Olsen, and A.V. Delgado-Escueta, eds. (Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US)).
50. Menshanov, P.N., Lanshakov, D.A., and Dygalo, N.N. (2015). proBDNF is a major product of bdnf gene expressed in the perinatal rat cortex. *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.*
51. Muñoz, A., Méndez, P., DeFelipe, J., and Alvarez-Leefmans, F.J. (2007). Cation-chloride cotransporters and GABA-ergic innervation in the human epileptic hippocampus. *Epilepsia* 48, 663–673.
52. Nabekura, J., Ueno, T., Okabe, A., Furuta, A., Iwaki, T., Shimizu-Okabe, C., Fukuda, A., and Akaike, N. (2002). Reduction of KCC2 expression and GABAA receptor-mediated excitation after in vivo axonal injury. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 4412–4417.
53. Nagappan, G., Zaitsev, E., Senatorov, V.V., Yang, J., Hempstead, B.L., and Lu, B. (2009). Control of extracellular cleavage of ProBDNF by high frequency neuronal activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 1267–1272.
54. Nykjaer, A., Willnow, T.E., and Petersen, C.M. (2005). p75NTR--live or let die. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 49–57.
55. Pallud, J., Le Van Quyen, M., Bielle, F., Pellegrino, C., Varlet, P., Cresto, N., Baulac, M., Duyckaerts, C., Kourdougli, N., Chazal, G., et al. (2014). Cortical GABAergic excitation contributes to epileptic activities around human glioma. *Sci. Transl. Med.* 6, 244ra89.
56. Park, H., and Poo, M. (2013). Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 7–23.
57. Pathak, H.R., Weissinger, F., Terunuma, M., Carlson, G.C., Hsu, F.-C., Moss, S.J., and Coulter, D.A. (2007). Disrupted Dentate Granule Cell Chloride Regulation Enhances Synaptic Excitability during Development of Temporal Lobe Epilepsy. *J. Neurosci.* 27, 14012–14022.
58. Perovic, M., Tesic, V., Mladenovic Djordjevic, A., Smiljanic, K., Loncarevic-Vasiljkovic, N., Ruzdijic, S., and Kanazir, S. (2013). BDNF transcripts, proBDNF and proNGF, in the cortex and hippocampus throughout the life span of the rat. *Age Dordr. Neth.* 35, 2057–2070.
59. Porcher, C., Hatchett, C., Longbottom, R.E., McAinch, K., Sihra, T.S., Moss, S.J., Thomson, A.M., and Jovanovic, J.N. (2011). Positive feedback regulation between gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptor signaling and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) release in developing neurons. *J. Biol. Chem.* 286, 21667–21677.

60. Puranam, R.S., He, X.P., Yao, L., Le, T., Jang, W., Rehder, C.W., Lewis, D.V., and McNamara, J.O. (2015). Disruption of *Fgfl3* causes synaptic excitatory-inhibitory imbalance and genetic epilepsy and febrile seizures plus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 35, 8866–8881.
61. Riffault, B., Medina, I., Dumon, C., Thalman, C., Ferrand, N., Friedel, P., Gaiarsa, J.-L., and Porcher, C. (2014). Pro-brain-derived neurotrophic factor inhibits GABAergic neurotransmission by activating endocytosis and repression of GABAA receptors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 34, 13516–13534.
62. Rivera, C., Voipio, J., Payne, J.A., Ruusuvuori, E., Lahtinen, H., Lamsa, K., Pirvola, U., Saarma, M., and Kaila, K. (1999). The K⁺/Cl⁻ cotransporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 397, 251–255.
63. Rivera, C., Voipio, J., Thomas-Crusells, J., Li, H., Emri, Z., Sipilä, S., Payne, J.A., Minichiello, L., Saarma, M., and Kaila, K. (2004). Mechanism of activity-dependent downregulation of the neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 4683–4691.
64. Sedmak, G., Jovanov-Milošević, N., Puskarjov, M., Ulamec, M., Krušlin, B., Kaila, K., and Judaš, M. (2015). Developmental Expression Patterns of KCC2 and Functionally Associated Molecules in the Human Brain. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991.
65. Shimizu-Okabe, C., Tanaka, M., Matsuda, K., Mihara, T., Okabe, A., Sato, K., Inoue, Y., Fujiwara, T., Yagi, K., and Fukuda, A. (2011). KCC2 was downregulated in small neurons localized in epileptogenic human focal cortical dysplasia. *Epilepsy Res.* 93, 177–184.
66. Shulga, A., Magalhães, A.C., Autio, H., Plantman, S., di Lieto, A., Nykjær, A., Carlstedt, T., Risling, M., Arumäe, U., Castrén, E., et al. (2012). The loop diuretic bumetanide blocks posttraumatic p75NTR upregulation and rescues injured neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 1757–1770.
67. Sivakumaran, S., Cardarelli, R.A., Maguire, J., Kelley, M.R., Silayeva, L., Morrow, D.H., Mukherjee, J., Moore, Y.E., Mather, R.J., Duggan, M.E., et al. (2015). Selective Inhibition of KCC2 Leads to Hyperexcitability and Epileptiform Discharges in Hippocampal Slices and In Vivo. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 35, 8291–8296.
68. Stein, V., Hermans-Borgmeyer, I., Jentsch, T.J., and Hübner, C. a (2004). Expression of the KCl cotransporter KCC2 parallels neuronal maturation and the emergence of low intracellular chloride. *J. Comp. Neurol.* 468, 57–64.
69. Stödberg, T., McTague, A., Ruiz, A.J., Hirata, H., Zhen, J., Long, P., Farabella, I., Meyer, E., Kawahara, A., Vassallo, G., et al. (2015). Mutations in *SLC12A5* in epilepsy of infancy with migrating focal seizures. *Nat. Commun.* 6, 8038.
70. Underwood, C.K., and Coulson, E.J. (2008). The p75 neurotrophin receptor. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 1664–1668.
71. Unsain, N., Nuñez, N., Anastasia, A., and Mascó, D.H. (2008). Status epilepticus induces a TrkB to p75 neurotrophin receptor switch and increases brain-derived neurotrophic factor interaction with p75 neurotrophin receptor: an initial event in neuronal injury induction.

Neuroscience 154, 978–993.

72. Volosin, M., Trotter, C., Cragolini, A., Kenchappa, R.S., Light, M., Hempstead, B.L., Carter, B.D., and Friedman, W.J. (2008). Induction of proneurotrophins and activation of p75NTR-mediated apoptosis via neurotrophin receptor-interacting factor in hippocampal neurons after seizures. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 9870–9879.
73. VonDran, M.W., LaFrancois, J., Padow, V.A., Friedman, W.J., Scharfman, H.E., Milner, T.A., and Hempstead, B.L. (2014). p75NTR, but Not proNGF, Is Upregulated Following Status Epilepticus in Mice. *ASN NEURO* 6.
74. Waseem, T., Mukhtarov, M., Buldakova, S., Medina, I., and Bregestovski, P. (2010). Genetically encoded Cl-Sensor as a tool for monitoring of Cl-dependent processes in small neuronal compartments. *J. Neurosci. Methods* 193, 14–23.
75. Winnubst, J., Cheyne, J.E., Niculescu, D., and Lohmann, C. (2015). Spontaneous Activity Drives Local Synaptic Plasticity In Vivo. *Neuron* 87, 399–410.
76. Yang, J., Siao, C.-J., Nagappan, G., Marinic, T., Jing, D., McGrath, K., Chen, Z.-Y., Mark, W., Tessarollo, L., Lee, F.S., et al. (2009). Neuronal release of proBDNF. *Nat. Neurosci.* 12, 113–115.
77. Yang, J., Harte-Hargrove, L.C., Siao, C.-J., Marinic, T., Clarke, R., Ma, Q., Jing, D., Lafrancois, J.J., Bath, K.G., Mark, W., et al. (2014). proBDNF negatively regulates neuronal remodeling, synaptic transmission, and synaptic plasticity in hippocampus. *Cell Rep.* 7, 796–806.
78. Zhu, L., Polley, N., Mathews, G.C., and Delpire, E. (2008). NKCC1 and KCC2 prevent hyperexcitability in the mouse hippocampus. *Epilepsy Res.* 79, 201–212.

Figure Legends

Figure 1: In vivo expression of cleavage-resistant proBDNF (CR-proBDNF).

(A) Map of the CR-proBDNF bicistronic plasmid vector. Ubiquitin promoters were used to drive expression of GFP and CR-proBDNF-Cherry. (B) Representative neocortical section showing laminar position of transfected cells electroporated at E15 with GFP and processed postnatally at P30. GFP fluorescence intensity profile showed that E15 generated neurons were distributed in layers III-V. (C) Representative neocortical section showing laminar position of transfected cells electroporated at E15 with GFP-CR-proBDNF-Cherry and processed postnatally at E18 and P30 (left columns). pcDNA bicistronic plasmid vector coding for GFP (green; upper panels) and CR-proBDNF-cherry (red; middle panels). GFP and CR-proBDNF-Cherry proteins were expressed in the same cells (yellow; lower panels). The red signal in the NeuN-positive cell (blue; lower panels) is attributable to the CR-proBDNF-Cherry secreted by the electroporated neurons that have been endocytosed by unelectroporated neurons (middle and right columns). Note the punctiform cherry fluorescence (red; right column). Scale bars: 1 mm (left); 50 μ m (middle); 10 μ m (right).

Figure 2: Elevated expression levels of proBDNF and p75^{NTR} in CR-proBDNF cortical neurons. (A, D) Immunofluorescence signal of P20 neocortical sections electroporated at E15 with GFP only or CR-proBDNF showing cells immunopositive for proBDNF (A) and p75^{NTR} (D) upon chronic expression of CR-proBDNF. (B) Average cortical fluorescence intensity of proBDNF in CR-proBDNF rats normalized to control. 40 neurons analyzed per

condition, $n = 4$; $***p < 0.001$. (C) proBDNF protein levels in cortical tissues in control (CTR), in GFP and in both ipsilateral and contralateral hemisphere from CR-proBDNF animals. $n = 4$; $**p < 0.01$. (E) Relative expression of p75^{NTR} mRNA transcripts in GFP and CR-proBDNF animals. p75^{NTR} gene expression was normalized to the expression of the housekeeping gene, GAPDH, in the same RNA preparation. $n = 6$; $***p < 0.001$. (F) Average cortical fluorescence intensity of p75^{NTR} in CR-proBDNF rats normalized to control. 54 neurons analyzed per condition, $n = 4$; $***p < 0.001$. (G) Western blot analysis with the antibody to p75^{NTR}. p75^{NTR} expression was upregulated in CR-proBDNF tissues. Proteins were visualized using ECL following incubation with HRP-conjugated secondary antibody. Normalized data (p75^{NTR}/β-Tubulin) are expressed as percentage change with respect to GFP tissues (defined as 100%). $n = 4$ experiments; $*p < 0.05$. (H) Representative confocal microscopy analysis of NeuN-positive neurons and (I) quantification of NeuN-positive neurons in the cortex of CR-proBDNF and GFP electroporated rats. $n = 4$ experiments ; $p > 0.05$.

Figure 3: CR-proBDNF increases spontaneous GABAergic synaptic activity.

(A) Traces are examples of spontaneous synaptic activity recorded at P30 in voltage clamp mode (potassium methylsulfate pipette solution, the reversal GABA was set around -40 mV) in cortical layer III-V from GFP (upper trace) or CR-proBDNF (lower trace) electroporated rats. Spontaneous GABAergic (outward current) and glutamatergic (inward current) PSCs are shown. (B) Normalized frequency of sEPSCs (C) and sIPSCs in control (CTR GFP) and CR-proBDNF tissues. (D) Ratio of spontaneous glutamatergic and GABAergic currents recorded in GFP and CR-proBDNF cortical neurons. $n = 5$ experiments.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. Control GFP (unpaired Student's t -test).

Figure 4: Increased susceptibility to pentylenetetrazol-induced seizures in proBDNF rats. (A) Experimental paradigm design. Intracortical infusion of p75^{NTR} functionally blocking antibody or vehicle solutions are performed from P20 to P30 and experiments are realized at P30 (B) Quantification of doses of pentylenetetrazol (PTZ), latency to induce generalized tonic-clonic seizures (C) and interval between minimal and generalized seizures (D) in three groups of rats: GFP control rats (CTR GFP; electroporated with GFP plasmid at E15), CR-proBDNF-vehicle treated-rats (CR-proBDNF; electroporated with CR-proBDNF plasmid at E15) and CR-proBDNF rats treated with a p75^{NTR} functionally blocking antibody (CR-proBDNF + p75^{NTR} Ab). (E) Example of a GFP control rat experiencing rearings, fallings and convulsions (top) and a CR-proBDNF rat at the same dose of PTZ (bottom). (F) Immunofluorescence signal of P30 neocortical sections electroporated at E15 with GFP or CR-proBDNF with or without p75^{NTR} Ab treatment before and after PTZ administration and immunolabeled with cleaved caspase-3 antibody. (G) Ratio of cleaved caspase-3-positive neurons (apoptotic) per surface area and expressed as a percentage of control (GFP CTR). Before PTZ administration, overexpression of proBDNF (CR-proBDNF) did not increase the number of apoptotic neurons compared with control (CTR GFP). After PTZ administration, the level of cleaved caspase-3 positive neurons significantly increases in control and proBDNF conditions. Treatment with p75^{NTR} Ab abolished the increase in the number of apoptotic neurons promoted by PTZ administration. $n = 10$ slices. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ when compared with GFP control.

Figure 5: Altered KCC2 expression in cortical neurons expressing CR-proBDNF. (A) Relative expression of KCC2 and NKCC1 mRNA transcripts in cortical tissues electroporated with constructs encoding for GFP (control) or CR-proBDNF. All data are expressed as function of GAPDH expression in the same RNA preparation. (B) Representative immunoblots for NKCC1 and KCC2 protein extracts from GFP or CR-proBDNF electroporated cortex. Corresponding quantification are shown by the bar graph. (C and D) Immunoreactivity of KCC2 (blue) in P30 cortical neurons expressing GFP (control) or CR-proBDNF. Lower panels illustrate typical KCC2 immunoreactivity distribution in cortical neurons of (C) control rat (GFP) that is localized in most of neurons in membrane region, whereas cortical neurons expressing the CR-proBDNF plasmid (F) showed a disrupted pattern of KCC2 membrane immunostaining. (E) The curves represent the average line profile of KCC2 staining along 10 μm from nucleus to external part of cortical neuronal cells in GFP and CR-proBDNF. Data were obtained from 40 cells per condition and $n = 4$. experiments per condition. Data are presented as means $\pm$ SEM. $**p < 0.01$; $***p < 0.001$. Scale bars are 25 μm (upper panels) and 5 μm (bottom panels).

Figure 6: Pro-BDNF-dependent regulation of Cl-Sensor ratiometric fluorescence in acute cortical slices prepared from rats on P10 and P30. Rats were electroporated in utero at embryonic day 15 with Cl-Sensor plus scrambled shRNA (Sbl) and CR-proBDNF or GFP only. Data represent results obtained from five rats per experimental condition. Two to three slices were recorded per

animal. (A) Typical images of Cl-Sensor fluorescence excited at 500 nm and taken at different optical magnifications in slice from P30 rat electroporated with Cl-Sensor and scrambled shRNA (right panel and left panel in blue) and CR-proBDNF-Cherry (red; left panel). The region of interest was drawn around the soma of cells located in the focal plane. (B) Example of typical ratiometric fluorescence (R430/500) recordings at P10 and P30 from GFP control and CR-proBDNF neurons. Vertical bars indicate the times of application of ACSF containing isoguvacine. Arrows and arrowheads indicate different types of responses between GFP and CR-proBDNF neurons at P10 and P30. (C) Bar graphs illustrating the mean $\pm$ SEM of fluorescence change $\Delta R/R$, where R is the mean of five measurements before isoguvacine application and ΔR is the difference between absolute maximum of isoguvacine-induced response and R. *** $p < 0.001$, ANOVA test; $n = 5$. (D) Example of typical ratiometric fluorescence (R430/500) recordings at P30 from GFP control (green) and CR-proBDNF neurons (red). Vertical bars indicate the times of application of ACSF containing isoguvacine + 25 mM KCl. (E) Half-decay times of the fluorescence recovery after neuronal loading with Cl^- at P30. * $p < 0.01$, ANOVA test; $n = 5$.

Figure 7: Developmental excitatory-inhibitory GABA sequence is abolished in cortical neurons in CR-proBDNF rats. (A, B) Effects of isoguvacine (10 μM ; black bars) in rats: Representative traces of spontaneous extracellular field potentials recorded in cortical slices at P30 in (A) control (GFP) and (B) CR-proBDNF rats. (C) Average histograms of normalized spike frequency in rats at P30. Isoguvacine (hatched bars) decreased the spikes frequency in control rats (to 29.4 ± 12.2 %; green) and increased it in CR-proBDNF rats (to 24.6 ± 10.7 %;

red). Data are presented as means $\pm$ SEM. $**p < 0.01$; $***p < 0.001$.

Figure 8: The number of ictal discharges is increased in CR-proBDNF rats.

(A) Illustration of the experimental design example of seizure recorded at 2 months post-SE using telemetric EEG. P75^{NTR} Ab or vehicle solutions are infused intrahippocampally continuously using osmotic minipumps from d2 to d5 and the seizure frequency is assessed 2 months after the end of p75^{NTR} Ab infusion using telemetric EEG with scalp electrode. (B) proBDNF protein levels were significantly increased in the hippocampus 48 h after SE; $n = 4$; $***p < 0.001$. Data are presented as means $\pm$ SEM. $***p < 0.001$. (C) Example of a typical ictal event recorded using scalp EEG in chronic epileptic rats at 2 months post-SE. (D) Left, Raster plot showing the distribution of seizures recorded in the day/light cycle within 24 hours. Right, Bar graph showing the number of ictal events per day in pilo vehicle and p75^{NTR}-Ab treated epileptic rats. $n = 3$ per condition; $*p < 0.05$. (E) KCC2 staining (red) in CA3 region in control (CTR), vehicle-treated d5 post SE, p75NTR Ab-treated d5 post SE rats. Corresponding curves represent the line profile of KCC2 staining along 10 μ m from nucleus to the external part of the neuron. Data were obtained from 40 cells per condition and $n = 3$ experiments per condition.

Fig. 1

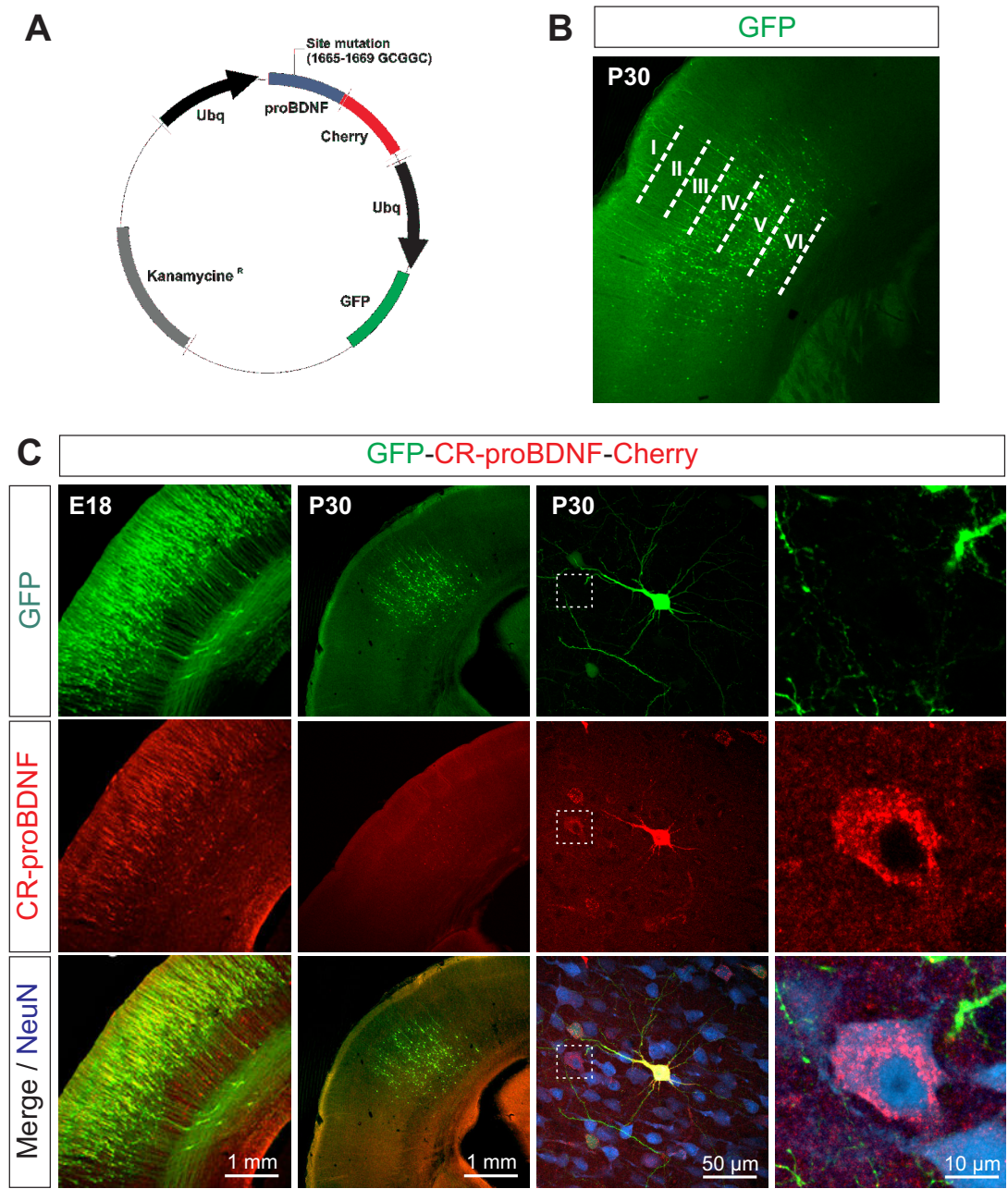


Fig. 2

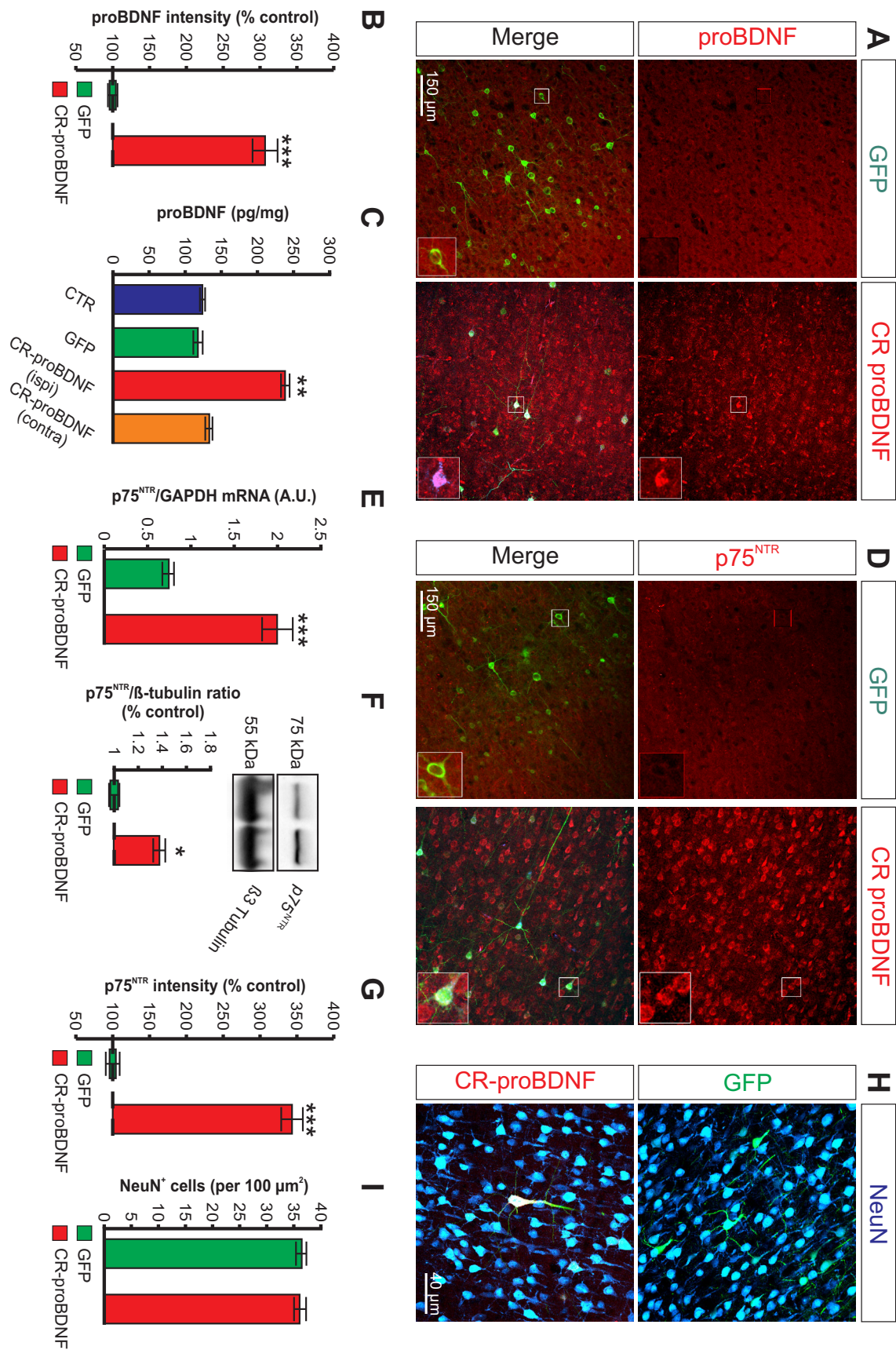


Fig. 3

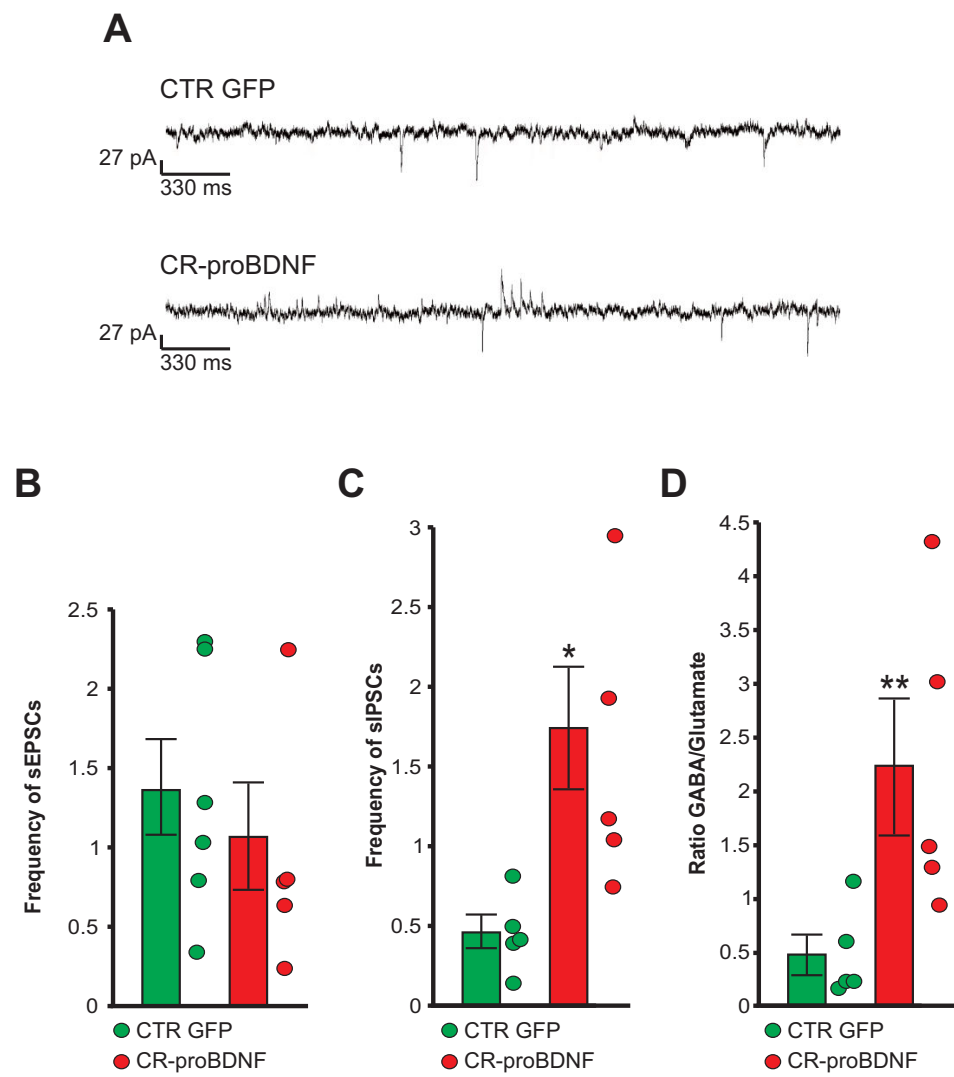


Fig. 4

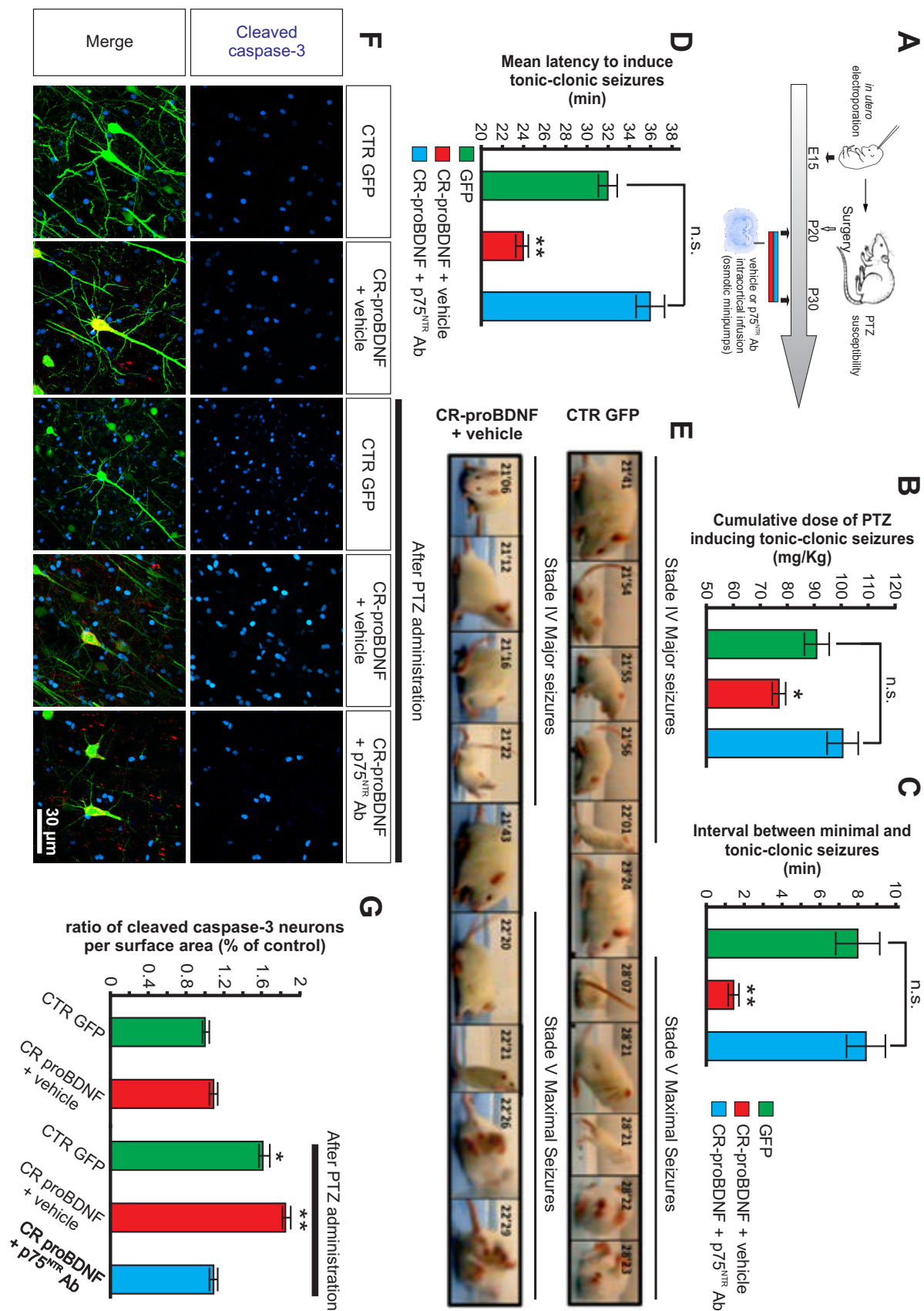


Fig. 5

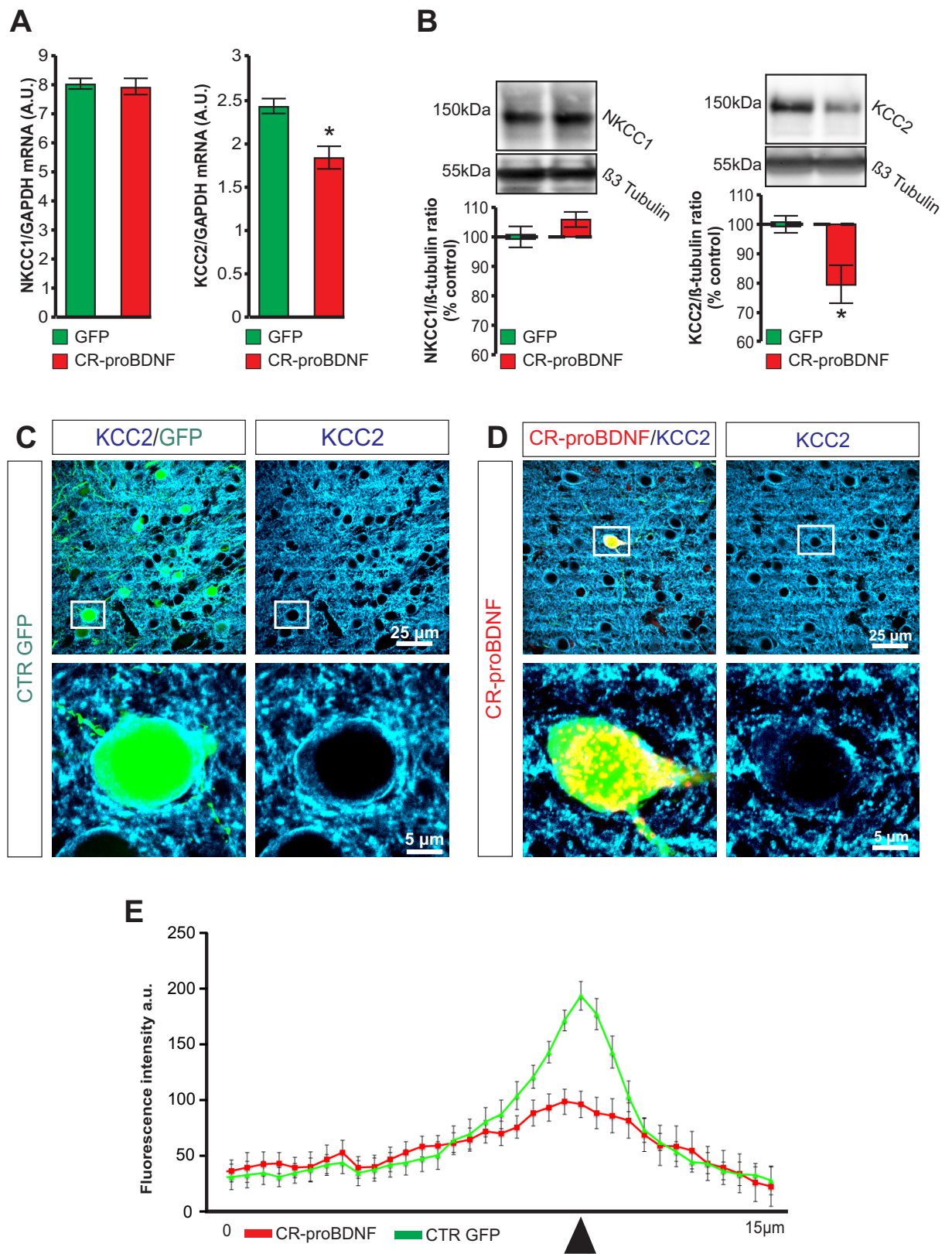


Fig. 6

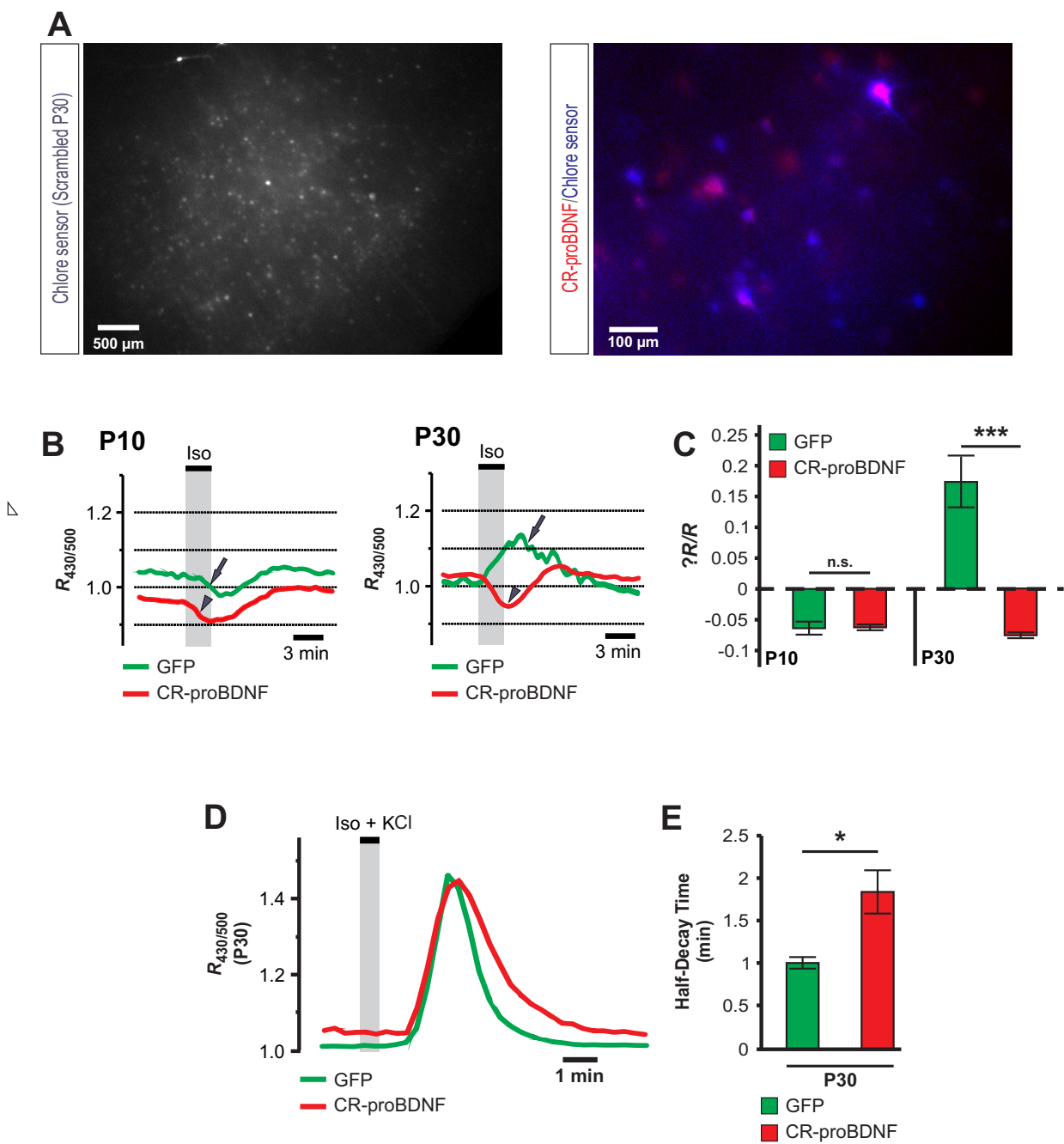


Fig. 7 A

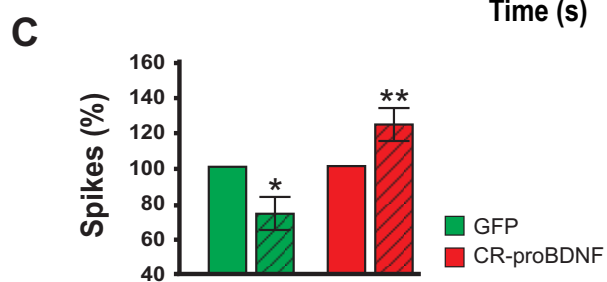
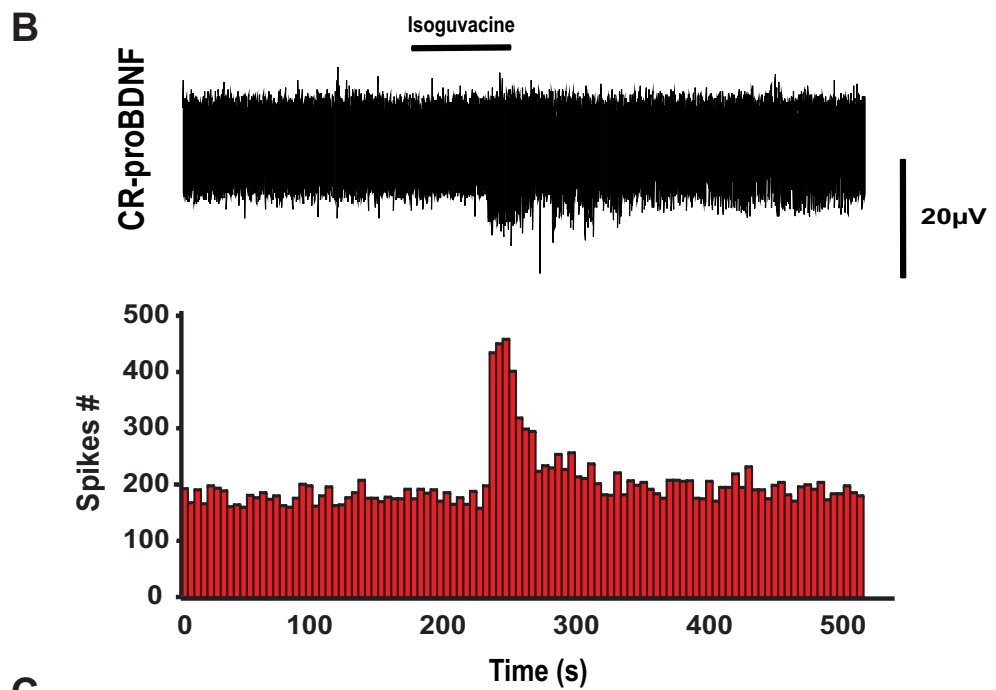
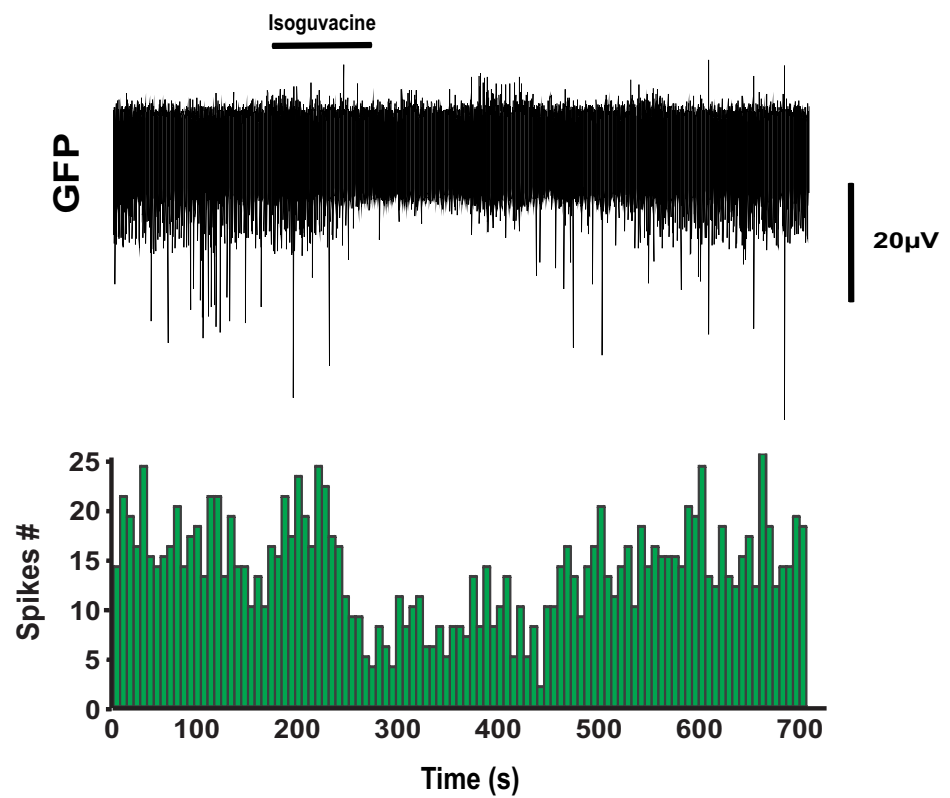
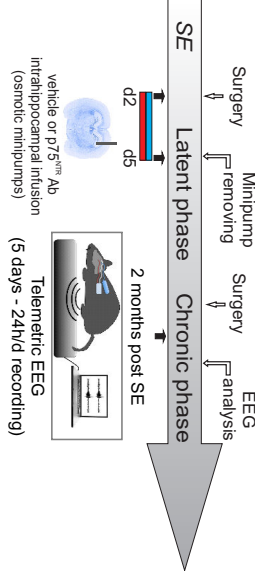
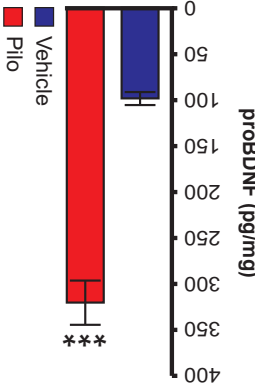


Fig. 8

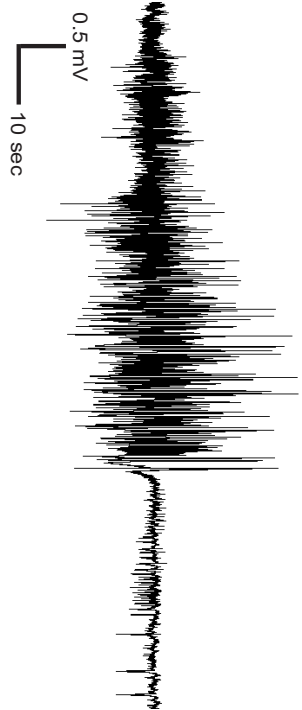
A



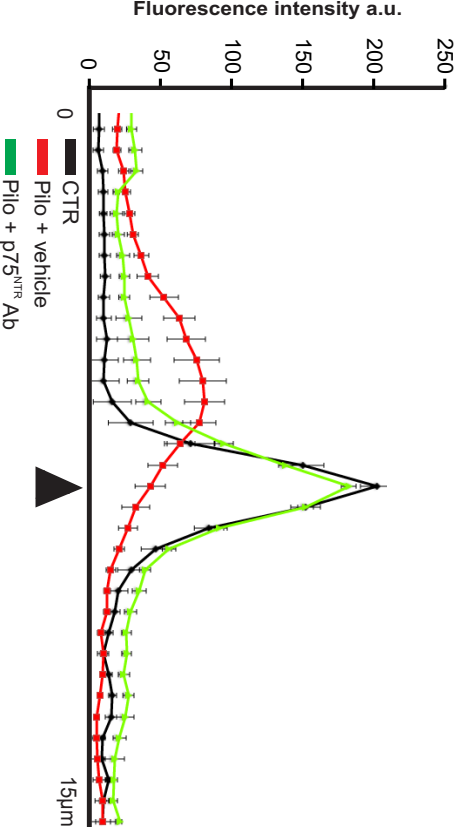
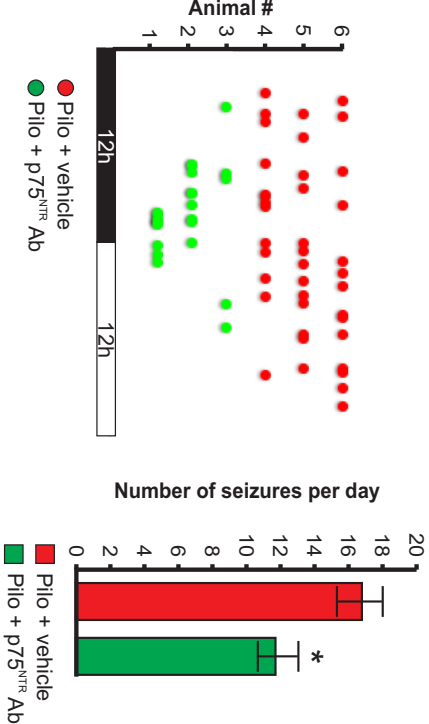
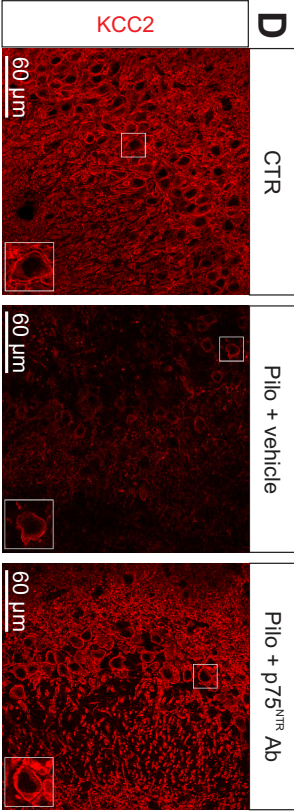
B



C



D



Discussion

L'objectif de mon travail de thèse a été de clarifier le rôle et les mécanismes de la signalisation proBDNF/p75^{NTR} dans la transmission GABAergique et dans la mise en place du tissu épileptique.

Le principal résultat de ce travail est la démonstration que la voie proBDNF/p75^{NTR}, via son action sur la transmission GABAergique, joue un rôle important dans l'établissement de l'excitabilité du réseau.

Dans mon étude, je montre par quels mécanismes le proBDNF, en activant son récepteur p75^{NTR}, altère l'efficacité de l'inhibition GABA à plusieurs niveaux. La voie proBDNF/p75^{NTR} va entraîner, *in vitro*, une diminution de la signalisation synaptique GABAergique. Le proBDNF va ainsi agir tout d'abord sur la régulation d'expression à la membrane des GABAARs en déphosphorylant la sous-unité $\beta 3$ pour induire l'endocytose et la dégradation des récepteurs. Mais la voie proBDNF/p75^{NTR} agit également sur la synthèse en augmentant l'expression d'un facteur de transcription, ICER, qui va réguler négativement les transcrits des récepteurs. Ces mécanismes entraînent ensemble une perte de synapses GABAergiques et ainsi une diminution de l'activité synaptique GABAergique.

Dans la suite de mon étude, j'observe que l'accumulation de proBDNF *in vivo* en activant son récepteur p75^{NTR} entraîne une hyperexcitabilité du réseau, par la diminution d'expression du principal co-transporteur participant à l'homéostasie chlore des neurones, le KCC2. Cette diminution de KCC2 provoque une inversion de la polarité des réponses GABAergiques qui passe d'inhibitrice à excitatrice.

Par conséquent, en démontrant une action des proneurotrophines et, plus particulièrement, du proBDNF sur la transmission GABAergique et dans l'épileptogénèse, mon travail a en partie répondu à une question : quels sont les effets d'une accumulation de proBDNF dans la plasticité GABAergique, l'activité inhibitrice et l'excitabilité du réseau ? Cependant, cette étude soulève plusieurs autres questions qui augurent des perspectives réellement passionnantes. Ainsi, je vais discuter des différents facteurs pouvant expliquer l'accumulation de proBDNF retrouvé en condition pathologique, des conséquences de cette accumulation dans les processus cognitifs et, aussi, de l'enchaînement des effets du proBDNF dans la mise en place de l'hyperexcitabilité. Enfin, je vais examiner

le concept : proBDNF et p75^{NTR}, acteurs clés de la séquence maturative du GABA.

Tout d'abord, je vais éclaircir et débattre de la validité d'utiliser des modèles de surexpression de proBDNF pour mimer l'accumulation de cette neurotrophine. La surexpression d'une protéine est souvent assimilée, par certaines études, comme une approche entraînant des effets artefactuels et non physiologiques. Cependant, j'ai pu démontrer dans mon étude *in vitro* que les effets d'une accumulation de proBDNF produite par surexpression étaient identiques à ceux produits par l'accumulation de proBDNF endogène en bloquant les protéases extracellulaires. J'ai ensuite découvert que, dans mon modèle d'électroporation *in utero*, l'augmentation de la concentration de proBDNF était similaire à celle retrouvée en condition pathologique dans le modèle pilocarpine. J'ai aussi constaté que l'inhibition de l'activation de p75^{NTR} bloque les différents effets de la surexpression de proBDNF. Ces différents résultats permettent donc de valider l'utilisation de la surexpression pour étudier les conséquences de l'accumulation de proBDNF. Le modèle d'électroporation ayant des concentrations similaires au modèle pilocarpine, on pouvait espérer que ces animaux électroporés présentent une activité épileptique. Néanmoins, aucune activité phénotypique de crises n'était présente. Ceci est sûrement dû au fait que les rats CR-proBDNF ont été électroporés dans le cortex et non dans l'hippocampe, la structure la plus impliquée dans l'épilepsie. Nous avons initialement commencé le projet avec des électroporations hippocampiques mais la technique n'était pas encore totalement au point et les niveaux de cellules impactées étaient trop faibles. Nous avons également utilisé le modèle d'ELT par la pilocarpine sur les animaux proBDNF afin d'observer si nous avions une modification des crises en phase chronique. Nos résultats ont permis de montrer que la fréquence et la durée des activités ictales sont plus élevées chez les animaux CR-proBDNF que chez les animaux contrôles (Figure 32). Nous pouvons donc suggérer qu'une accumulation de proBDNF même au niveau cortical peut être une prédisposition à la mise en place d'un réseau épileptique.

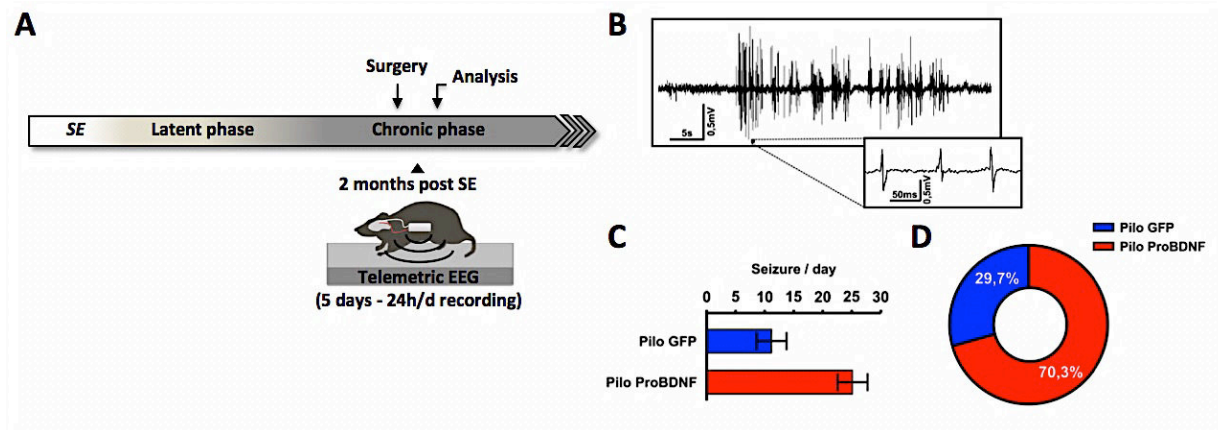


Figure 32. Modèle pilocarpine sur les rats CR-proBDNF

(A) Schéma du plan expérimental. (B) Exemple de crise ictale enregistrée au niveau cortical. (C) Nombre moyen de crises par jour chez les rats pilocarpine GFP et CR-proBDNF. (D) Graphique montrant le pourcentage de crises ictales entre les deux conditions.

Elévation du proBDNF dans l'épileptogenèse.

Quels sont les différents processus pouvant permettre l'accumulation de proBDNF observée en condition épileptique ?

1. L'augmentation dans l'espace extracellulaire de la concentration de BDNF doit être le premier événement qui survient après la crise inaugurale. Cette augmentation peut être due à l'élévation du nombre de transcrits du BDNF (Tongiorgi et al., 2006) puis de l'expression de la protéine retrouvée dans la plupart des modèles animaux d'épilepsie, mais également dans le lobe temporal des cerveaux de patients atteints d'ELT (Murray et al., 2000; Takahashi et al., 1999). De plus, on peut également suggérer que l'augmentation importante d'expression du BDNF provient de la diversité des réserves pour la neurotrophine dans le système nerveux central. Le BDNF pouvant également être synthétisé et libéré par les astrocytes et la microglie (Parpura and Zorec, 2010; Trang et al., 2011). La libération du BDNF étant majoritairement activité dépendante, l'activité de la crise épileptique inaugurale et des crises épileptiques chroniques va engendrer une augmentation de la sécrétion de BDNF.

2. L'augmentation de l'expression et de la sécrétion de BDNF explique l'accumulation de la protéine mais pas la présence de sa forme immature, le proBDNF. La principale hypothèse expliquant l'accumulation du proBDNF est un

défaut dans le clivage de la protéine par les protéases extracellulaires. Plusieurs données sont en corrélation avec cette hypothèse, puisqu'il a été montré que ces protéases étaient aussi régulées après les crises. Ainsi les MMPs, telles que la MMP-7, qui peut cliver le proBDNF, subit, suite à l'induction de crises par le kainate, une diminution d'expression et d'activité. En parallèle il y a également une augmentation de l'expression de l'inhibiteur des MMPs, le TIMP-1, qui permet une stabilisation de la proneurotrophine en bloquant le clivage (Le and Friedman, 2012). L'expression de TIMP-1 est de plus induit à la fois dans les neurones et les astrocytes et est particulièrement élevée dans les astrocytes, 3 jours après l'induction de crises avec le kainate (S. Rivera et al., 1997). Cet inhibiteur peut donc réguler le clivage du proBDNF sur ses différents sites de sécrétions. De plus, les souris KO pour TIMP-1 après induction du SE, sont résistantes à l'excitotoxicité dans l'hippocampe et n'ont subi aucun bourgeonnement des fibres moussues (Jourquin et al., 2005). Ces résultats sont cohérents avec l'incapacité de ces souris à empêcher le clivage des proneurotrophines par les MMPs et donc de stabiliser l'action négative des proneurotrophines.

ProBDNF/p75^{NTR} et mise en place de l'hyperexcitabilité neuronale

Bien qu'aucune preuve définitive n'existe pour soutenir un mécanisme unique dans la mise en place du tissu épileptique, un grand nombre d'études suggèrent qu'une action dépolarisante du GABA, due à une altération de l'expression des co-transporteurs chlore KCC2 et NKCC1, contribue aux activités épileptiformes aussi bien dans les modèles animaux d'épilepsie que dans les tissus humains de patients épileptiques (I. Cohen et al., 2002; Dzhala et al., 2005; Huberfeld et al., 2007; Muñoz et al., 2007; Palma et al., 2006; Pathak et al., 2007). Dans notre étude, nous montrons que l'accumulation de proBDNF *in vivo* entraîne par l'intermédiaire de son récepteur p75^{NTR} une diminution de l'expression et une altération de la stabilité à la membrane de KCC2. Cette modification entraînant un changement de polarité des réponses GABAergiques. Nous avons également observé que l'accumulation de proBDNF augmente la susceptibilité aux crises et que cette hyperexcitabilité était bloquée par l'infusion intracorticale d'un

anticorps dirigé contre le p75^{NTR} (Ac p75^{NTR}). De plus, le blocage de p75^{NTR} sur notre modèle proBDNF ou le modèle pilocarpine permet de restaurer une expression normale de KCC2 à la membrane. L'action des proneurotrophines étant souvent associée à une augmentation de la mort neuronale, nous montrons que l'accumulation de proBDNF n'engendre pas plus de mort que chez les animaux contrôles. De manière similaire, une étude a montré récemment que, dans des modèles d'ELT, l'augmentation de proBDNF et p75^{NTR} après les crises n'était pas associée à une augmentation de la mort cellulaire. Cette étude suggérait d'ailleurs que le proBDNF/p75^{NTR} pouvait jouer un rôle important pendant l'épileptogenèse suite au SE (VonDran et al., 2014). Dans le modèle d'ELT pilocarpine, où l'on retrouve une accumulation de proBDNF, nous avons démontré que l'infusion intrahippocampique de l'Ac p75^{NTR} pendant la phase d'épileptogenèse entraînait une diminution du nombre de crises pendant la phase chronique. Ces résultats sous-tendent l'importance de la voie proBDNF/p75^{NTR} dans la mise en place du tissu épileptique. Cependant, d'autres études présentent des résultats différents sur l'action du p75^{NTR} : l'une d'elles a utilisé une petite molécule non peptidique qui bloque l'interaction des proneurotrophines avec p75^{NTR} et a montré, qu'après le SE, l'inhibition de p75^{NTR} n'entraînait aucune diminution au niveau du nombre ou de la sévérité des crises (Grabenstatter et al., 2014). Fait intéressant, cet inhibiteur a initialement été conçu par rapport à la structure tridimensionnelle du proNGF (Massa et al., 2006), l'inconvénient est que la structure du proNGF, même si elle est similaire à la proNT3, est complètement différente de la structure tridimensionnelle du proBDNF. Ces résultats ne peuvent donc pas exclure l'hypothèse d'une interaction encore présente entre proBDNF et p75^{NTR}. Ensuite, une autre étude observe dans un modèle de trauma, où il existe également une altération d'expression des co-transporteurs KCC2 et NKCC1 associée à une réponse GABAergique dépolarisante, une augmentation de p75^{NTR}. Les auteurs suggèrent que cette augmentation est uniquement une conséquence directe du changement de polarité du GABA. Ce dernier va alors augmenter la concentration de calcium intracellulaire et induire l'activation de voie en aval permettant ainsi l'augmentation de p75^{NTR} (Shulga et al., 2012). D'après notre étude, l'action du p75^{NTR} se ferait plutôt en amont de la modification de la réponse GABAergique.

Le mécanisme proposé de l'émergence d'un GABA dépolarisant par la voie ProBDNF/p75^{NTR} après le SE est ainsi résumé dans la figure 33.

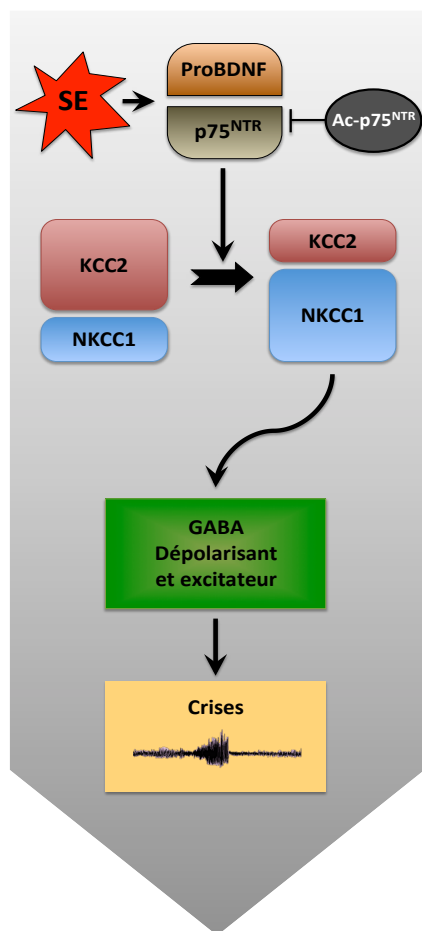


Figure 33. Résumé de notre étude sur la plasticité induite par la voie proBDNF/p75^{NTR} après SE

L'utilisation de l'anticorps anti-p75^{NTR} empêche la diminution de KCC2, le changement de réponse du GABA qui reste hyperpolarisant, et la diminution du nombre de crises.

Quels sont alors les mécanismes par lesquels la voie proBDNF/p75^{NTR} module l'expression et l'activité de KCC2 ? Nous avons montré que l'activation de p75^{NTR} entraînait une augmentation de l'activité de PTEN, une phosphatase qui régule négativement l'activité de ERK dont dépend le facteur de transcription Egr4 qui active la transcription de KCC2 (Ludwig et al., 2011; Weng et al., 2001). On peut également supposer que les différentes voies de signalisation de p75^{NTR}, qui activent des kinases et des phosphatases, pourront soit moduler l'état de phosphorylation de KCC2 et sa stabilité à la membrane, soit augmenter l'activité de la voie Wnk/Spak/OSR1 qui est la principale voie responsable de

l'internalisation de KCC2 (de Los Heros et al., 2014). Il a également été montré que le récepteur p75^{NTR} active la calpaïne (Coulson et al., 2000), qui est une protéase impliquée dans les mécanismes de dégradation de KCC2 (Puskarjov et al., 2012). On peut donc supposer que la voie proBDNF/p75^{NTR} peut réguler négativement KCC2 au niveau de la transcription, de l'expression membranaire et de la dégradation, expliquant ainsi la diminution d'expression totale de la protéine mais aussi l'instabilité à la membrane de KCC2, retrouvée après accumulation de proBDNF.

ProBDNF/p75^{NTR} et processus cognitifs

Plusieurs études ont constaté que les taux de ProBDNF et de p75^{NTR} sont nettement augmentés dans les troubles cognitifs et notamment dans les dépressions majeures et les troubles autistiques chez l'homme (Garcia et al., 2012; Zhou et al., 2013). Ces résultats suggèrent que le proBDNF et p75^{NTR} ont une fonction importante dans la régulation des processus cognitifs. Dans mon étude, en collaboration avec le Docteur Chambon, nous avons également effectué des tests comportementaux sur les animaux afin d'observer si l'accumulation de proBDNF pouvait induire des déficits cognitifs. Les analyses montrent une diminution du nombre de déplacement dans le test de champ ouvert (open field) chez les animaux proBDNF comparés aux contrôles, ce qui correspond à une augmentation de l'anxiété. Cependant, cet effet est observé uniquement pendant les 5 premières minutes du test et n'est plus significatif après 10 min, ce qui ne nous permet pas de valider un véritable comportement anxiogène. Une étude récente, utilisant un modèle murin KO pour p75^{NTR}, suggère que l'activation du récepteur entraîne une baisse du niveau d'excitabilité et des performances mnésiques (Gibon et al., 2015). Nous avons également analysé les performances de mémoire sur notre modèle de surexpression du proBDNF par le test de reconnaissance d'objet (Novel object recognition), au cours duquel on évalue la capacité du rat à reconnaître un nouvel objet par rapport à un objet familier dans un environnement connu. On remarque que les rats proBDNF passent plus de temps que les animaux contrôles à explorer le nouvel objet, ce qui reflète ainsi une meilleure utilisation de leurs processus de mémoire et d'apprentissage (Figure

34). Contrairement aux résultats décrits par Gibon et al, nous observons dans notre étude une amélioration des performances mnésiques dépendantes de la voie p75NTR. Bien que contradictoire, l'ensemble de ces données confirment l'implication de cette voie dans la régulation des processus de mémoire en modulant l'excitabilité des réseaux neuronaux.

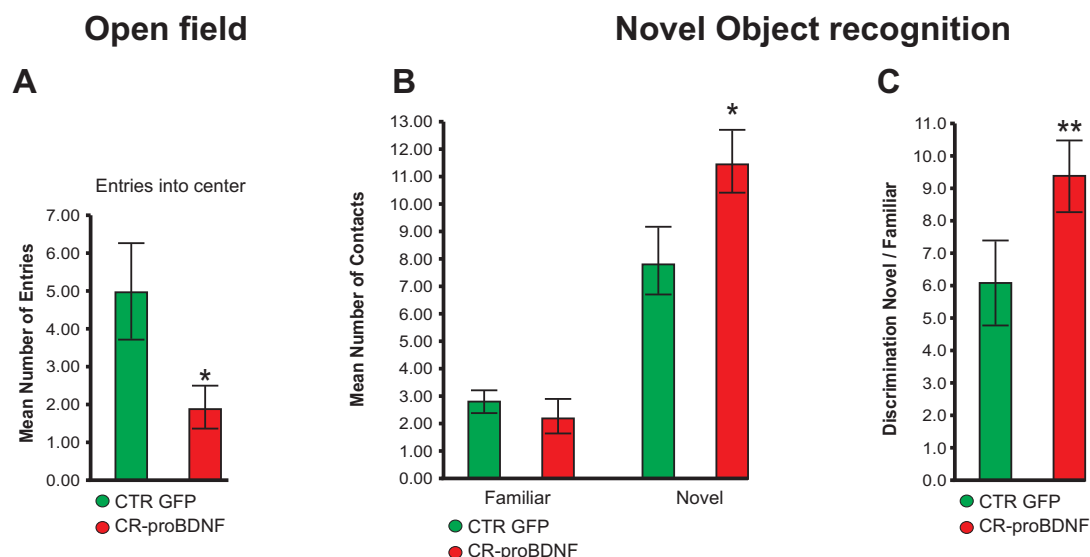


Figure 34. Résultats des tests comportementaux des rats CR-proBDNF

(A) Les rats CR-proBDNF sont moins entrés au centre de l'open field. (B) Les rats CR-proBDNF ont plus de contact avec le nouvel objet. C. Le ratio objet nouveau/familier est plus important chez les rats CR-proBDNF.

Les rats CR-proBDNF seraient donc à la fois plus anxieux (au début du test uniquement) et pro-mnésiques. Les principales structures responsables de ces performances cognitives sont l'hippocampe et l'amygdale. La question est maintenant de comprendre pourquoi les rats électroporés avec le proBDNF au niveau cortical sont affectés dans ces processus. L'une des réponses possibles est l'augmentation du niveau d'excitabilité retrouvé chez les rats CR-proBDNF. Plusieurs travaux ont en effet prouvé que les différentes formes de mémoire sont associées à un changement persistant dans l'excitabilité neuronale. Certaines d'entre elles ont notamment remarqué qu'une diminution de l'inhibition médiée par le GABA et une altération associée de la balance excitation/inhibition, entraînent une meilleure performance dans les processus d'apprentissage et de mémoire (Izquierdo and J. H. Medina, 1991; Pan et al., 2011). On peut donc

supposer que la voie proBDNF/p75NTR, en induisant un changement de polarité des réponses GABA et une augmentation de l'excitabilité du réseau, provoque l'amélioration des performances mnésiques.

ProBDNF/p75NTR et la double personnalité du GABA

De manière similaire à ce que nous avons observé au cours de l'épileptogénèse, la transmission GABAergique a la propriété de changer de polarité et ainsi de passer d'une réponse dépolarisante à hyperpolarisante au cours du développement. Du stade embryonnaire jusqu'aux premières semaines de vie, la concentration intracellulaire de chlore est élevée puis diminue avec la maturation cérébrale (Ben-Ari, 2002). Pendant le développement, ce niveau élevé de chlore est dû à une forte expression de NKCC1 et une faible expression de KCC2, puis pendant les stades plus tardifs du développement jusqu'à l'âge adulte, un changement dans la balance NKCC1/KCC2 rendra le GABA hyperpolarisant (C. Rivera et al., 1999). Étant donné l'importance de cette séquence maturative sur le développement du réseau neuronal, il serait intéressant de savoir si la voie proBDNF/p75 n'est pas un élément crucial dans la régulation du système GABAergique pendant le développement. En comparant l'expression du proBDNF, mBDNF et leurs récepteurs, on remarque directement que les niveaux de mBDNF/TrkB sont inversement proportionnels aux niveaux de proBDNF/p75NTR durant le développement (Harte-Hargrove et al., 2013). L'expression du proBDNF/p75NTR est très élevée du stade embryonnaire jusqu'à la phase précoce du développement puis diminue à un moment où le GABA passe de dépolarisant à hyperpolarisant (Figure 35).

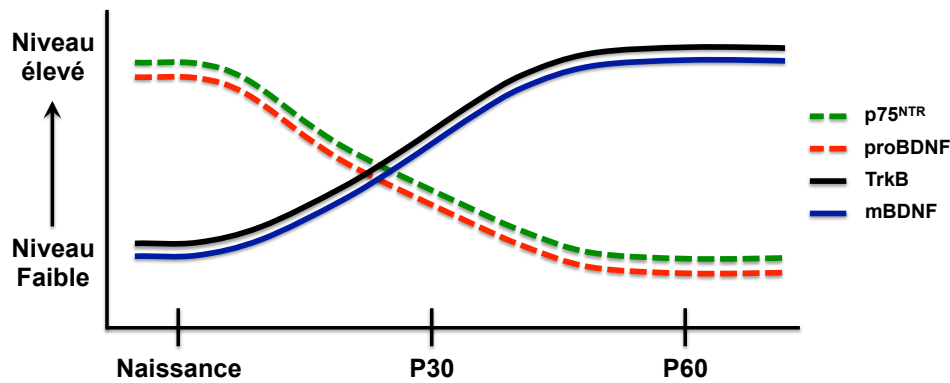


Figure 35. Séquence développementale de l'expression de proBDNF, p75^{NTR}, mBDNF et TrkB

Au vu de mes résultats, il est possible d'envisager que la voie proBDNF/p75 pendant le développement empêche l'expression du cotransporteur KCC2 afin de maintenir une concentration intracellulaire de chlore élevée et une réponse GABA dépolarisante. Par la suite, la diminution du proBDNF et l'augmentation du mBDNF va permettre, via l'activation de TrkB, une augmentation de l'expression de KCC2 (Ludwig et al., 2011; Menshanov et al., 2015). Cependant, une étude récente montre que les souris KO pour BDNF ne présentent pas de défaut dans l'augmentation de l'expression de KCC2 ou de sa stabilité à la membrane (Puskarjov et al., 2015). On peut alors penser que, dans ce modèle, des phénomènes compensatoires se mettent en place, tels que l'activation de p75^{NTR} par d'autres proneurotrophines ou tout simplement que les effets observés sur KCC2 sont principalement causés par la séquence développementale d'expression des récepteurs aux neurotrophines p75^{NTR} et TrkB. Pour conclure, le ratio proBDNF/mBDNF et l'activation sous-jacente soit du récepteur p75^{NTR} soit du récepteur TrkB auraient une fonction primordiale au cours des premières semaines de vie dans la séquence maturative du GABA en agissant sur KCC2 et peut être sur NKCC1 (Figure 36).

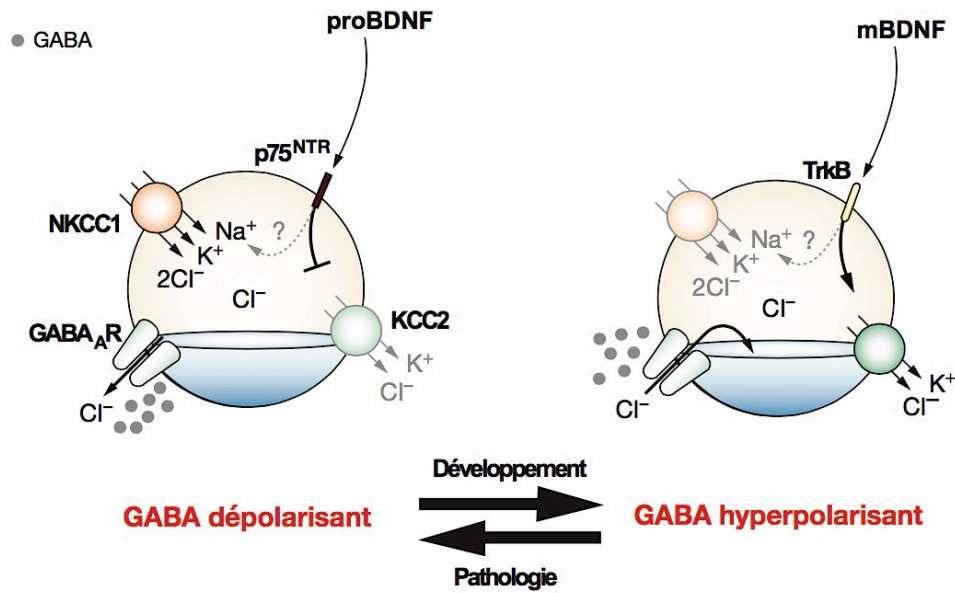


Figure 36. Contrôle de la séquence maturative du GABA par le ratio proBDNF/mBDNF

Un autre point important permettant de suggérer cette hypothèse est la régulation possible de ce ratio proBDNF/mBDNF par l'ocytocine, une hormone très importante dans le déroulement de la séquence maturative du GABA (Tyzio et al., 2006; 2014). Il a récemment été montré que l'ocytocine augmente l'expression de BDNF (Havranek et al., 2015) et surtout l'expression et l'activité des MMPs (Cassoni et al., 2006). On peut donc proposer une séquence dans laquelle le pic d'ocytocine à la naissance va permettre l'augmentation de la forme mature du BDNF en favorisant le clivage des proneurotrophines. Le ratio proBDNF/mBDNF va alors s'inverser pendant la phase précoce de développement, ce qui va permettre la fin de l'action du proBDNF sur KCC2 via p75^{NTR}.

En résumé, nos résultats apportent de nouvelles connaissances sur le rôle de la voie proBDNF/p75^{NTR} concernant la plasticité GABAergique avec le contrôle de l'adressage et de la synthèse des GABA_ARs, mais également sur son implication dans la mise en place du tissu épileptique avec un changement de la polarité des réponses GABAergique obtenu par la diminution d'expression du KCC2. Les résultats découverts sur le modèle pilocarpine ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques dans les ELT avec la mise en place d'un traitement utilisant un bloqueur du récepteur p75^{NTR}. Enfin, ces données suggèrent une fonction et des mécanismes importants, induits par la voie proBDNF/p75^{NTR},

pendant le développement du réseau neuronal dans la séquence maturative du GABA.

Références

- Acharya, M.M., Hattiangady, B., Shetty, A.K., 2008. Progress in neuroprotective strategies for preventing epilepsy. *Prog. Neurobiol.* 84, 363–404. doi:10.1016/j.pneurobio.2007.10.010
- Adachi, N., Kohara, K., Tsumoto, T., 2005. Difference in trafficking of brain-derived neurotrophic factor between axons and dendrites of cortical neurons, revealed by live-cell imaging. *BMC Neurosci* 6, 42. doi:10.1186/1471-2202-6-42
- Allain, A.-E., Cazenave, W., Delpy, A., Exertier, P., Barthe, C., Meyrand, P., Cattaert, D., Branchereau, P., 2015. Nonsynaptic glycine release is involved in the early KCC2 expression. *Dev Neurobiol* n/a–n/a. doi:10.1002/dneu.22358
- Altar, C.A., Siuciak, J.A., Wright, P., Ip, N.Y., Lindsay, R.M., Wiegand, S.J., 1994. In situ hybridization of *trkB* and *trkC* receptor mRNA in rat forebrain and association with high-affinity binding of [125I]BDNF, [125I]NT-4/5 and [125I]NT-3. *Eur. J. Neurosci.* 6, 1389–1405.
- Amaral, M.D., Pozzo-Miller, L., 2007. BDNF induces calcium elevations associated with IBDNF, a nonselective cationic current mediated by TRPC channels. *J. Neurophysiol.* 98, 2476–2482. doi:10.1152/jn.00797.2007
- Attwell, D., Barbour, B., Szatkowski, M., 1993. Nonvesicular release of neurotransmitter. *Neuron* 11, 401–407.
- Baj, G., Del Turco, D., Schlaudraff, J., Torelli, L., Deller, T., Tongiorgi, E., 2013. Regulation of the spatial code for BDNF mRNA isoforms in the rat hippocampus following pilocarpine-treatment: a systematic analysis using laser microdissection and quantitative real-time PCR. *Hippocampus* 23, 413–423. doi:10.1002/hipo.22100
- Baj, G., Leone, E., Chao, M.V., Tongiorgi, E., 2011. Spatial segregation of BDNF transcripts enables BDNF to differentially shape distinct dendritic compartments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 16813–16818. doi:10.1073/pnas.1014168108
- Bancaud, J., Talairach, J., 1965. [Epilepsy of the supplementary motor area: a particularly difficult diagnosis in children]. *Rev Neuropsychiatr Infant* 13, 483–499.
- Banke, T.G., Gegelashvili, G., 2008. Tonic activation of group I mGluRs modulates inhibitory synaptic strength by regulating KCC2 activity. *J. Physiol. (Lond.)* 586, 4925–4934. doi:10.1113/jphysiol.2008.157024
- Barde, Y.A., Edgar, D., Thoenen, H., 1982. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* 1, 549–553.
- Barker, P.A., 2009. Whither proBDNF? *Nat. Neurosci.* 12, 105–106. doi:10.1038/nn0209-105

- Barker, P.A., 2004. p75NTR is positively promiscuous: novel partners and new insights. *Neuron* 42, 529–533. doi:10.1016/j.neuron.2004.04.001
- Barnes, E.M., 1996. Use-dependent regulation of GABAA receptors. *Int. Rev. Neurobiol.* 39, 53–76.
- Bartolomei, F., 2009. Comments on: Usui N, Mihara T, Baba K, Matsuda K, Tottori T, Umeoka S, et al. Intracranial EEG findings in patients with lesional lateral temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 2008;78:82-91. *Epilepsy Res.* 83, 94–95. doi:10.1016/j.eplepsyres.2008.08.009
- Bartolomei, F., Wendling, F., Bellanger, J.J., Régis, J., Chauvel, P., 2001. Neural networks involving the medial temporal structures in temporal lobe epilepsy. *Clin Neurophysiol* 112, 1746–1760.
- Ben-Ari, Y., 2002. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 728–739. doi:10.1038/nrn920
- Ben-Ari, Y., Dudek, F.E., 2010. Primary and secondary mechanisms of epileptogenesis in the temporal lobe: there is a before and an after. *Epilepsy Curr* 10, 118–125. doi:10.1111/j.1535-7511.2010.01376.x
- Ben-Ari, Y., Gaiarsa, J.-L., Tyzio, R., Khazipov, R., 2007. GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol. Rev.* 87, 1215–1284. doi:10.1152/physrev.00017.2006
- Bengzon, J., Kokaia, Z., Ernfors, P., Kokaia, M., Leanza, G., Nilsson, O.G., Persson, H., Lindvall, O., 1993. Regulation of neurotrophin and trkA, trkB and trkC tyrosine kinase receptor messenger RNA expression in kindling. *Neuroscience* 53, 433–446.
- Benke, D., Zemoura, K., Maier, P.J., 2012. Modulation of cell surface GABA(B) receptors by desensitization, trafficking and regulated degradation. *World J Biol Chem* 3, 61–72. doi:10.4331/wjbc.v3.i4.61
- Benraiss, A., Chmielnicki, E., Lerner, K., Roh, D., Goldman, S.A., 2001. Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain. *J. Neurosci.* 21, 6718–6731.
- Berg, A.T., Berkovic, S.F., Brodie, M.J., Buchhalter, J., Cross, J.H., van Emde Boas, W., Engel, J., French, J., Glauser, T.A., Mathern, G.W., Moshé, S.L., Nordli, D., Plouin, P., Scheffer, I.E., 2010. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia* 51, 676–685. doi:10.1111/j.1528-1167.2010.02522.x
- Berghuis, P., Dobszay, M.B., Sousa, K.M., Schulte, G., Mager, P.P., Härtig, W., Görcs, T.J., Zilberter, Y., Ernfors, P., Harkany, T., 2004. Brain-derived

- neurotrophic factor controls functional differentiation and microcircuit formation of selectively isolated fast-spiking GABAergic interneurons. *Eur. J. Neurosci.* 20, 1290–1306. doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03561.x
- Binder, D.K., Routbort, M.J., McNamara, J.O., 1999. Immunohistochemical evidence of seizure-induced activation of trk receptors in the mossy fiber pathway of adult rat hippocampus. *J. Neurosci.* 19, 4616–4626.
- Bloom, F.E., Iversen, L.L., 1971. Localizing 3H-GABA in nerve terminals of rat cerebral cortex by electron microscopic autoradiography. *Nature* 229, 628–630.
- Blum, R., Kafitz, K.W., Konnerth, A., 2002. Neurotrophin-evoked depolarization requires the sodium channel Na(V)1.9. *Nature* 419, 687–693. doi:10.1038/nature01085
- Bogdanov, Y., Michels, G., Armstrong-Gold, C., Haydon, P.G., Lindstrom, J., Pangalos, M., Moss, S.J., 2006. Synaptic GABAA receptors are directly recruited from their extrasynaptic counterparts. *EMBO J.* 25, 4381–4389. doi:10.1038/sj.emboj.7601309
- Bos, R., Sadlaoud, K., Boulenguez, P., Buttigieg, D., Liabeuf, S., Brocard, C., Haase, G., Bras, H., Vinay, L., 2013. Activation of 5-HT2A receptors upregulates the function of the neuronal K-Cl cotransporter KCC2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 348–353. doi:10.1073/pnas.1213680110
- Boulle, F., van den Hove, D.L.A., Jakob, S.B., Rutten, B.P., Hamon, M., van Os, J., Lesch, K.-P., Lanfumey, L., Steinbusch, H.W., Kenis, G., 2012. Epigenetic regulation of the BDNF gene: implications for psychiatric disorders. *Mol. Psychiatry* 17, 584–596. doi:10.1038/mp.2011.107
- Brandon, N.J., Jovanovic, J.N., Smart, T.G., Moss, S.J., 2002. Receptor for activated C kinase-1 facilitates protein kinase C-dependent phosphorylation and functional modulation of GABA(A) receptors with the activation of G-protein-coupled receptors. *J. Neurosci.* 22, 6353–6361.
- Brooks-Kayal, A.R., Shumate, M.D., Jin, H., Rikhter, T.Y., Coulter, D.A., 1998. Selective changes in single cell GABA(A) receptor subunit expression and function in temporal lobe epilepsy. *Nat. Med.* 4, 1166–1172. doi:10.1038/2661
- Browne, T.R., Holmes, G.L., 2001. Epilepsy. *N. Engl. J. Med.* 344, 1145–1151. doi:10.1056/NEJM200104123441507
- Cancedda, L., Fiumelli, H., Chen, K., Poo, M.-M., 2007. Excitatory GABA action is essential for morphological maturation of cortical neurons in vivo. *J. Neurosci.* 27, 5224–5235. doi:10.1523/JNEUROSCI.5169-06.2007
- Cassoni, P., Marrocco, T., Bussolati, B., Allia, E., Munaron, L., Sapino, A., Bussolati, G., 2006. Oxytocin induces proliferation and migration in

- immortalized human dermal microvascular endothelial cells and human breast tumor-derived endothelial cells. *Mol. Cancer Res.* 4, 351–359.
doi:10.1158/1541-7786.MCR-06-0024
- Cavazos, J.E., Das, I., Sutula, T.P., 1994. Neuronal loss induced in limbic pathways by kindling: evidence for induction of hippocampal sclerosis by repeated brief seizures. *J. Neurosci.* 14, 3106–3121.
- Chao, M.V., 2003. Dependence receptors: what is the mechanism? *Sci. STKE* 2003, PE38–pe38. doi:10.1126/stke.2003.200.pe38
- Chen, L., Wang, H., Vicini, S., Olsen, R.W., 2000. The gamma-aminobutyric acid type A (GABAA) receptor-associated protein (GABARAP) promotes GABAA receptor clustering and modulates the channel kinetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 11557–11562. doi:10.1073/pnas.190133497
- Chen, Z.-Y., Ieraci, A., Tanowitz, M., Lee, F.S., 2005a. A novel endocytic recycling signal distinguishes biological responses of Trk neurotrophin receptors. *Mol. Biol. Cell* 16, 5761–5772. doi:10.1091/mbc.E05-07-0651
- Chen, Z.-Y., Ieraci, A., Teng, H., Dall, H., Meng, C.-X., Herrera, D.G., Nykjaer, A., Hempstead, B.L., Lee, F.S., 2005b. Sortilin controls intracellular sorting of brain-derived neurotrophic factor to the regulated secretory pathway. *J. Neurosci.* 25, 6156–6166. doi:10.1523/JNEUROSCI.1017-05.2005
- Chen, Z.-Y., Patel, P.D., Sant, G., Meng, C.-X., Teng, K.K., Hempstead, B.L., Lee, F.S., 2004. Variant brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Met66) alters the intracellular trafficking and activity-dependent secretion of wild-type BDNF in neurosecretory cells and cortical neurons. *J. Neurosci.* 24, 4401–4411. doi:10.1523/JNEUROSCI.0348-04.2004
- Cheng, P.-L., Song, A.-H., Wong, Y.-H., Wang, S., Zhang, X., Poo, M.-M., 2011. Self-amplifying autocrine actions of BDNF in axon development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 18430–18435. doi:10.1073/pnas.1115907108
- Cherubini, E., Conti, F., 2001. Generating diversity at GABAergic synapses. *Trends Neurosci.* 24, 155–162.
- Chourbaji, S., Brandwein, C., Gass, P., 2011. Altering BDNF expression by genetics and/or environment: impact for emotional and depression-like behaviour in laboratory mice. *Neurosci Biobehav Rev* 35, 599–611. doi:10.1016/j.neubiorev.2010.07.003
- Cohen, A.S., Lin, D.D., Quirk, G.L., Coulter, D.A., 2003. Dentate granule cell GABA(A) receptors in epileptic hippocampus: enhanced synaptic efficacy and altered pharmacology. *Eur. J. Neurosci.* 17, 1607–1616. doi:10.1046/j.1460-9568.2003.02597.x
- Cohen, I., Navarro, V., Clemenceau, S., Baulac, M., Miles, R., 2002. On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. *Science*

298, 1418–1421. doi:10.1126/science.1076510

- Comenencia-Ortiz, E., Moss, S.J., Davies, P.A., 2014. Phosphorylation of GABAA receptors influences receptor trafficking and neurosteroid actions. *Psychopharmacology (Berl.)* 231, 3453–3465. doi:10.1007/s00213-014-3617-z
- Cossart, R., Dinocourt, C., Hirsch, J.C., Merchan-Perez, A., De Felipe, J., Ben-Ari, Y., Esclapez, M., Bernard, C., 2001. Dendritic but not somatic GABAergic inhibition is decreased in experimental epilepsy. *Nat. Neurosci.* 4, 52–62. doi:10.1038/82900
- Coulson, E.J., Reid, K., Baca, M., Shipham, K.A., Hulett, S.M., Kilpatrick, T.J., Bartlett, P.F., 2000. Chopper, a new death domain of the p75 neurotrophin receptor that mediates rapid neuronal cell death. *J. Biol. Chem.* 275, 30537–30545. doi:10.1074/jbc.M005214200
- Cunningham, M.E., Greene, L.A., 1998. A function-structure model for NGF-activated TRK. *EMBO J.* 17, 7282–7293. doi:10.1093/emboj/17.24.7282
- Dam, A.M., 1980. Epilepsy and neuron loss in the hippocampus. *Epilepsia* 21, 617–629.
- Danzer, S.C., McNamara, J.O., 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. doi:10.1523/JNEUROSCI.3846-04.2004
- de Boer, H.M., Mula, M., Sander, J.W., 2008. The global burden and stigma of epilepsy. *Epilepsy Behav* 12, 540–546. doi:10.1016/j.yebeh.2007.12.019
- de Los Heros, P., Alessi, D.R., Gourlay, R., Campbell, D.G., Deak, M., Macartney, T.J., Kahle, K.T., Zhang, J., 2014. The WNK-regulated SPAK/OSR1 kinases directly phosphorylate and inhibit the K⁺-Cl⁻ co-transporters. *Biochem. J.* 458, 559–573. doi:10.1042/BJ20131478
- DeFelipe, J., 1993. Neocortical neuronal diversity: chemical heterogeneity revealed by colocalization studies of classic neurotransmitters, neuropeptides, calcium-binding proteins, and cell surface molecules. *Cereb. Cortex* 3, 273–289.
- DeFelipe, J., Fariñas, I., 1992. The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog. Neurobiol.* 39, 563–607.
- Deinhardt, K., Kim, T., Spellman, D.S., Mains, R.E., Eipper, B.A., Neubert, T.A., Chao, M.V., Hempstead, B.L., 2011. Neuronal growth cone retraction relies on proneurotrophin receptor signaling through Rac. *Sci Signal* 4, ra82–ra82. doi:10.1126/scisignal.2002060

- Dieni, S., Matsumoto, T., Dekkers, M., Rauskolb, S., Ionescu, M.S., Deogracias, R., Gundelfinger, E.D., Kojima, M., Nestel, S., Frotscher, M., Barde, Y.-A., 2012. BDNF and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons. *J. Cell Biol.* 196, 775–788. doi:10.1083/jcb.201201038
- Drake, C.T., Milner, T.A., Patterson, S.L., 1999. Ultrastructural localization of full-length trkB immunoreactivity in rat hippocampus suggests multiple roles in modulating activity-dependent synaptic plasticity. *J. Neurosci.* 19, 8009–8026.
- Dugich-Djordjevic, M.M., Tocco, G., Willoughby, D.A., Najm, I., Pasinetti, G., Thompson, R.F., Baudry, M., Lapchak, P.A., Hefti, F., 1992. BDNF mRNA expression in the developing rat brain following kainic acid-induced seizure activity. *Neuron* 8, 1127–1138.
- Dzhala, V.I., Talos, D.M., Sdrulla, D.A., Brumback, A.C., Mathews, G.C., Benke, T.A., Delpire, E., Jensen, F.E., Staley, K.J., 2005. NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nat. Med.* 11, 1205–1213. doi:10.1038/nm1301
- Egan, M.F., Kojima, M., Callicott, J.H., Goldberg, T.E., Kolachana, B.S., Bertolino, A., Zaitsev, E., Gold, B., Goldman, D., Dean, M., Lu, B., Weinberger, D.R., 2003. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* 112, 257–269.
- Ellender, T.J., Raimondo, J.V., Irkle, A., Lamsa, K.P., Akerman, C.J., 2014. Excitatory effects of parvalbumin-expressing interneurons maintain hippocampal epileptiform activity via synchronous afterdischarges. *J. Neurosci.* 34, 15208–15222. doi:10.1523/JNEUROSCI.1747-14.2014
- ELLIOTT, K.A., FLOREY, E., 1956. Factor I--inhibitory factor from brain; assay; conditions in brain; simulating and antagonizing substances. *J. Neurochem.* 1, 181–192.
- Engel, J., Berg, A., Andermann, F., Avanzini, G., Berkovic, S., Blume, W., Dulac, O., van Emde Boas, W., Fejerman, N., Plouin, P., Scheffer, I., Seino, M., Williamson, P., Wolf, P., 2006. Are epilepsy classifications based on epileptic syndromes and seizure types outdated? *Epileptic Disord* 8, 159–160.
- Ernfors, P., Ebendal, T., Olson, L., Mouton, P., Strömberg, I., Persson, H., 1989. A cell line producing recombinant nerve growth factor evokes growth responses in intrinsic and grafted central cholinergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 4756–4760.
- 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.
- Esclapez, M., Hirsch, J.C., Ben-Ari, Y., Bernard, C., 1999. Newly formed

excitatory pathways provide a substrate for hyperexcitability in experimental temporal lobe epilepsy. *J. Comp. Neurol.* 408, 449–460.
doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19990614)408:4<449::AID-CNE1>3.0.CO;2-R

- Farhadi, H.F., Mowla, S.J., Petrecca, K., Morris, S.J., Seidah, N.G., Murphy, R.A., 2000. 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. *J. Neurosci.* 20, 4059–4068.
- Fisher, R.S., van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., Engel, J., 2005. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 46, 470–472. doi:10.1111/j.0013-9580.2005.66104.x
- FLOREY, E., 1991. GABA: history and perspectives. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 69, 1049–1056.
- Fon, E.A., Edwards, R.H., 2001. Molecular mechanisms of neurotransmitter release. *Muscle Nerve* 24, 581–601. doi:10.1002/mus.1044
- Gallardo, R., Ivarsson, Y., Schymkowitz, J., Rousseau, F., Zimmermann, P., 2010. Structural diversity of PDZ-lipid interactions. *Chembiochem* 11, 456–467. doi:10.1002/cbic.200900616
- Garcia, K.L.P., Yu, G., Nicolini, C., Michalski, B., Garzon, D.J., Chiu, V.S., Tongiorgi, E., Szatmari, P., Fahnestock, M., 2012. Altered balance of proteolytic isoforms of pro-brain-derived neurotrophic factor in autism. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 71, 289–297. doi:10.1097/NEN.0b013e31824b27e4
- Gärtner, A., Polnau, D.G., Staiger, V., Sciarretta, C., Minichiello, L., Thoenen, H., Bonhoeffer, T., Korte, M., 2006. Hippocampal long-term potentiation is supported by presynaptic and postsynaptic tyrosine receptor kinase B-mediated phospholipase Cgamma signaling. *J. Neurosci.* 26, 3496–3504. doi:10.1523/JNEUROSCI.3792-05.2006
- Gibbs, J.W., Shumate, M.D., Coulter, D.A., 1997. Differential epilepsy-associated alterations in postsynaptic GABA(A) receptor function in dentate granule and CA1 neurons. *J. Neurophysiol.* 77, 1924–1938.
- Gibon, J., Buckley, S.M., Unsain, N., Kaartinen, V., Séguéla, P., Barker, P.A., 2015. proBDNF and p75NTR Control Excitability and Persistent Firing of Cortical Pyramidal Neurons. *J. Neurosci.* 35, 9741–9753. doi:10.1523/JNEUROSCI.4655-14.2015
- Gomes, R.A., Hampton, C., El-Sabeawy, F., Sabo, S.L., McAllister, A.K., 2006. The dynamic distribution of TrkB receptors before, during, and after synapse formation between cortical neurons. *J. Neurosci.* 26, 11487–11500. doi:10.1523/JNEUROSCI.2364-06.2006

- Goodkin, H.P., Yeh, J.-L., Kapur, J., 2005. Status epilepticus increases the intracellular accumulation of GABAA receptors. *J. Neurosci.* 25, 5511–5520. doi:10.1523/JNEUROSCI.0900-05.2005
- 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. doi:10.1007/s00221-009-1994-z
- Grabenstatter, H.L., Carlsen, J., Raol, Y.H., Yang, T., Hund, D., Cruz Del Angel, Y., White, A.M., Gonzalez, M.I., Longo, F.M., Russek, S.J., Brooks-Kayal, A.R., 2014. Acute administration of the small-molecule p75(NTR) ligand does not prevent hippocampal neuron loss or development of spontaneous seizures after pilocarpine-induced status epilepticus. *J. Neurosci. Res.* 92, 1307–1318. doi:10.1002/jnr.23402
- Gupta, A., Wang, Y., Markram, H., 2000. Organizing principles for a diversity of GABAergic interneurons and synapses in the neocortex. *Science* 287, 273–278.
- Hallböök, F., 1999. Evolution of the vertebrate neurotrophin and Trk receptor gene families. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 616–621. doi:10.1016/S0959-4388(99)00011-2
- Hariri, A.R., Goldberg, T.E., Mattay, V.S., Kolachana, B.S., Callicott, J.H., Egan, M.F., Weinberger, D.R., 2003. Brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism affects human memory-related hippocampal activity and predicts memory performance. *J. Neurosci.* 23, 6690–6694.
- Harte-Hargrove, L.C., Maclusky, N.J., Scharfman, H.E., 2013. Brain-derived neurotrophic factor-estrogen interactions in the hippocampal mossy fiber pathway: implications for normal brain function and disease. *Neuroscience* 239, 46–66. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.12.029
- Havranek, T., Zatkova, M., Lestanova, Z., Bacova, Z., Mravec, B., Hodosy, J., Strbak, V., Bakos, J., 2015. Intracerebroventricular oxytocin administration in rats enhances object recognition and increases expression of neurotrophins, microtubule-associated protein 2, and synapsin I. *J. Neurosci. Res.* 93, 893–901. doi:10.1002/jnr.23559
- He, X.-P., Minichiello, L., Klein, R., McNamara, J.O., 2002. Immunohistochemical evidence of seizure-induced activation of trkB receptors in the mossy fiber pathway of adult mouse hippocampus. *J. Neurosci.* 22, 7502–7508.
- Hofer, M., Pagliusi, S.R., Hohn, A., Leibrock, J., Barde, Y.A., 1990. Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J.* 9, 2459–2464.
- Horch, H.W., Katz, L.C., 2002. BDNF release from single cells elicits local

dendritic growth in nearby neurons. *Nat. Neurosci.* 5, 1177–1184.
doi:10.1038/nn927

Houser, C.R., 1999. Neuronal loss and synaptic reorganization in temporal lobe epilepsy. *Adv Neurol* 79, 743–761.

Houser, C.R., Miyashiro, J.E., Swartz, B.E., Walsh, G.O., Rich, J.R., Delgado-Escueta, A.V., 1990. Altered patterns of dynorphin immunoreactivity suggest mossy fiber reorganization in human hippocampal epilepsy. *J. Neurosci.* 10, 267–282.

Hu, Y., Lund, I.V., Gravielle, M.C., Farb, D.H., Brooks-Kayal, A.R., Russek, S.J., 2008. 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. *J. Biol. Chem.* 283, 9328–9340.
doi:10.1074/jbc.M705110200

Huberfeld, G., Wittner, L., Clemenceau, S., Baulac, M., Kaila, K., Miles, R., Rivera, C., 2007. Perturbed chloride homeostasis and GABAergic signaling in human temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci.* 27, 9866–9873.
doi:10.1523/JNEUROSCI.2761-07.2007

Hung, A.Y., Sheng, M., 2002. PDZ domains: structural modules for protein complex assembly. *J. Biol. Chem.* 277, 5699–5702.
doi:10.1074/jbc.R100065200

Hwang, J.J., Park, M.-H., Choi, S.-Y., Koh, J.-Y., 2005. Activation of the Trk signaling pathway by extracellular zinc. Role of metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 280, 11995–12001. doi:10.1074/jbc.M403172200

Inoue, K., Furukawa, T., Kumada, T., Yamada, J., Wang, T., Inoue, R., Fukuda, A., 2012. Taurine inhibits K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 to regulate embryonic Cl⁻ homeostasis via with-no-lysine (WNK) protein kinase signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 287, 20839–20850. doi:10.1074/jbc.M111.319418

Isokawa, M., 1996. Decrement of GABAA receptor-mediated inhibitory postsynaptic currents in dentate granule cells in epileptic hippocampus. *J. Neurophysiol.* 75, 1901–1908.

Izquierdo, I., Medina, J.H., 1991. GABAA receptor modulation of memory: the role of endogenous benzodiazepines. *Trends Pharmacol. Sci.* 12, 260–265.

Jacob, T.C., Moss, S.J., Jurd, R., 2008. GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 331–343. doi:10.1038/nrn2370

Je, H.S., Yang, F., Ji, Y., Nagappan, G., Hempstead, B.L., Lu, B., 2012. Role of pro-brain-derived neurotrophic factor (proBDNF) to mature BDNF conversion in activity-dependent competition at developing neuromuscular synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 15924–15929.
doi:10.1073/pnas.1207767109

- Jin, X., Hu, H., Mathers, P.H., 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.
- Johnson, D., Lanahan, A., Buck, C.R., Sehgal, A., Morgan, C., Mercer, E., Bothwell, M., Chao, M., 1986. Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* 47, 545–554.
- Jourquin, J., Tremblay, E., Bernard, A., Charton, G., Chaillan, F.A., Marchetti, E., Roman, F.S., Soloway, P.D., Dive, V., Yiotakis, A., Khrestchatsky, M., Rivera, S., 2005. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) modulates neuronal death, axonal plasticity, and learning and memory. *Eur. J. Neurosci.* 22, 2569–2578. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04426.x
- Jovanovic, J.N., Thomas, P., Kittler, J.T., Smart, T.G., Moss, S.J., 2004. Brain-derived neurotrophic factor modulates fast synaptic inhibition by regulating GABA(A) receptor phosphorylation, activity, and cell-surface stability. *J. Neurosci.* 24, 522–530. doi:10.1523/JNEUROSCI.3606-03.2004
- Kahane, P., Landré, E., Minotti, L., Francione, S., Ryvlin, P., 2006. The Bancaud and Talairach view on the epileptogenic zone: a working hypothesis. *Epileptic Disord* 8 Suppl 2, S16–26.
- Kahle, K.T., Deeb, T.Z., Puskarjov, M., Silayeva, L., Liang, B., Kaila, K., Moss, S.J., 2013. Modulation of neuronal activity by phosphorylation of the K-Cl cotransporter KCC2. *Trends Neurosci.* 36, 726–737. doi:10.1016/j.tins.2013.08.006
- Kaila, K., Price, T.J., Payne, J.A., Puskarjov, M., Voipio, J., 2014. Cation-chloride cotransporters in neuronal development, plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 637–654. doi:10.1038/nrn3819
- Kaupmann, K., Huggel, K., Heid, J., Flor, P.J., Bischoff, S., Mickel, S.J., McMaster, G., Angst, C., Bittiger, H., Froestl, W., Bettler, B., 1997. Expression cloning of GABA(B) receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature* 386, 239–246. doi:10.1038/386239a0
- Kepecs, A., Fishell, G., 2014. Interneuron cell types are fit to function. *Nature* 505, 318–326. doi:10.1038/nature12983
- Khalilov, I., Holmes, G.L., Ben-Ari, Y., 2003. In vitro formation of a secondary epileptogenic mirror focus by interhippocampal propagation of seizures. *Nat. Neurosci.* 6, 1079–1085. doi:10.1038/nn1125
- Kim, H., Li, Q., Hempstead, B.L., Madri, J.A., 2004. Paracrine and autocrine functions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) in brain-derived endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 279, 33538–

- Kim, W.-S., Lim, J.Y., Shin, J.H., Park, H.K., Tan, S.A., Park, K.U., Paik, N.-J., 2013. Effect of the presence of brain-derived neurotrophic factor val(66)met polymorphism on the recovery in patients with acute subcortical stroke. *Ann Rehabil Med* 37, 311–319. doi:10.5535/arm.2013.37.3.311
- Kittler, J.T., Moss, S.J., 2003. Modulation of GABAA receptor activity by phosphorylation and receptor trafficking: implications for the efficacy of synaptic inhibition. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13, 341–347.
- Koepp, M.J., Richardson, M.P., Brooks, D.J., Poline, J.B., Van Paesschen, W., Friston, K.J., Duncan, J.S., 1996. Cerebral benzodiazepine receptors in hippocampal sclerosis. An objective in vivo analysis. *Brain* 119 (Pt 5), 1677–1687.
- Kokaia, Z., Andsberg, G., Martinez-Serrano, A., Lindvall, O., 1998. Focal cerebral ischemia in rats induces expression of P75 neurotrophin receptor in resistant striatal cholinergic neurons. *Neuroscience* 84, 1113–1125.
- Kokaia, Z., Zhao, Q., Kokaia, M., Elmér, E., Metsis, M., Smith, M.L., Siesjö, B.K., Lindvall, O., 1995. Regulation of brain-derived neurotrophic factor gene expression after transient middle cerebral artery occlusion with and without brain damage. *Exp. Neurol.* 136, 73–88. doi:10.1006/exnr.1995.1085
- Kozisek, M.E., Middlemas, D., Bylund, D.B., 2008. Brain-derived neurotrophic factor and its receptor tropomyosin-related kinase B in the mechanism of action of antidepressant therapies. *Pharmacol. Ther.* 117, 30–51. doi:10.1016/j.pharmthera.2007.07.001
- KRAVITZ, E.A., POTTER, D.D., 1965. A FURTHER STUDY OF THE DISTRIBUTION OF GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID BETWEEN EXCITATORY AND INHIBITORY AXONS OF THE LOBSTER. *J. Neurochem.* 12, 323–328.
- Krnjević, K., Schwartz, S., 1967. The action of gamma-aminobutyric acid on cortical neurones. *Exp Brain Res* 3, 320–336.
- Kuczewski, N., Porcher, C., Gaiarsa, J.-L., 2010. Activity-dependent dendritic secretion of brain-derived neurotrophic factor modulates synaptic plasticity. *Eur. J. Neurosci.* 32, 1239–1244. doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07378.x
- KUFFLER, S.W., EDWARDS, C., 1958. Mechanism of gamma aminobutyric acid (GABA) action and its relation to synaptic inhibition. *J. Neurophysiol.* 21, 589–610.
- Lachyankar, M.B., Condon, P.J., Quesenberry, P.J., Litofsky, N.S., Recht, L.D., Ross, A.H., 1997. Embryonic precursor cells that express Trk receptors: induction of different cell fates by NGF, BDNF, NT-3, and CNTF. *Exp. Neurol.* 144, 350–360. doi:10.1006/exnr.1997.6434

- Langlois, A., Diabira, D., Ferrand, N., Porcher, C., Gaiarsa, J.-L., 2013. NMDA-dependent switch of proBDNF actions on developing GABAergic synapses. *Cereb. Cortex* 23, 1085–1096. doi:10.1093/cercor/bhs071
- Larmet, Y., Reibel, S., Carnahan, J., Nawa, H., Marescaux, C., Depaulis, A., 1995. Protective effects of brain-derived neurotrophic factor on the development of hippocampal kindling in the rat. *Neuroreport* 6, 1937–1941.
- Laurie, D.J., Wisden, W., Seeburg, P.H., 1992. The distribution of thirteen GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. III. Embryonic and postnatal development. *J. Neurosci.* 12, 4151–4172.
- Le, A.P., Friedman, W.J., 2012. Matrix metalloproteinase-7 regulates cleavage of pro-nerve growth factor and is neuroprotective following kainic acid-induced seizures. *J. Neurosci.* 32, 703–712. doi:10.1523/JNEUROSCI.4128-11.2012
- Lee, H.H.C., Deeb, T.Z., Walker, J.A., Davies, P.A., Moss, S.J., 2011. NMDA receptor activity downregulates KCC2 resulting in depolarizing GABAA receptor-mediated currents. *Nat. Neurosci.* 14, 736–743. doi:10.1038/nn.2806
- Lee, Y., Lim, S.W., Kim, S.Y., Chung, J.W., Kim, J., Myung, W., Song, J., Kim, S., Carroll, B.J., Kim, D.K., 2013. Association between the BDNF Val66Met Polymorphism and Chronicity of Depression. *Psychiatry Investig* 10, 56–61. doi:10.4306/pi.2013.10.1.56
- Leibrock, J., Lottspeich, F., Hohn, A., Hofer, M., Hengeler, B., Masiakowski, P., Thoenen, H., Barde, Y.A., 1989. Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 341, 149–152. doi:10.1038/341149a0
- Leil, T.A., Chen, Z.-W., Chang, C.-S.S., Olsen, R.W., 2004. GABAA receptor-associated protein traffics GABAA receptors to the plasma membrane in neurons. *J. Neurosci.* 24, 11429–11438. doi:10.1523/JNEUROSCI.3355-04.2004
- Lessmann, V., Brigadski, T., 2009. Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: an update. *Neurosci. Res.* 65, 11–22. doi:10.1016/j.neures.2009.06.004
- Lessmann, V., Gottmann, K., Malsangio, M., 2003. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog. Neurobiol.* 69, 341–374.
- Levivier, M., Przedborski, S., Bencsics, C., Kang, U.J., 1995. Intrastriatal implantation of fibroblasts genetically engineered to produce brain-derived neurotrophic factor prevents degeneration of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 15, 7810–7820.
- Lévi, S., Logan, S.M., Tovar, K.R., Craig, A.M., 2004. Gephyrin is critical for glycine receptor clustering but not for the formation of functional GABAergic synapses in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 24, 207–217. doi:10.1523/JNEUROSCI.1661-03.2004

- Liu, Q.-R., Walther, D., Drgon, T., Polesskaya, O., Lesnick, T.G., Strain, K.J., de Andrade, M., Bower, J.H., Maraganore, D.M., Uhl, G.R., 2005. Human brain derived neurotrophic factor (BDNF) genes, splicing patterns, and assessments of associations with substance abuse and Parkinson's Disease. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 134B, 93–103. doi:10.1002/ajmg.b.30109
- Lonze, B.E., Ginty, D.D., 2002. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35, 605–623.
- Lou, H., Kim, S.-K., Zaitsev, E., Snell, C.R., Lu, B., Loh, Y.P., 2005. Sorting and activity-dependent secretion of BDNF require interaction of a specific motif with the sorting receptor carboxypeptidase e. *Neuron* 45, 245–255. doi:10.1016/j.neuron.2004.12.037
- Loup, F., Wieser, H.G., Yonekawa, Y., Aguzzi, A., Fritschy, J.M., 2000. Selective alterations in GABAA receptor subtypes in human temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci.* 20, 5401–5419.
- Lu, B., Pang, P.T., Woo, N.H., 2005. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 603–614. doi:10.1038/nrn1726
- Lu, Y., Christian, K., Lu, B., 2008. BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? *Neurobiol Learn Mem* 89, 312–323. doi:10.1016/j.nlm.2007.08.018
- Ludwig, A., Uvarov, P., Soni, S., Thomas-Crusells, J., Airaksinen, M.S., Rivera, C., 2011. Early growth response 4 mediates BDNF induction of potassium chloride cotransporter 2 transcription. *J. Neurosci.* 31, 644–649. doi:10.1523/JNEUROSCI.2006-10.2011
- Lund, I.V., Hu, Y., Raol, Y.H., Benham, R.S., Faris, R., Russek, S.J., Brooks-Kayal, A.R., 2008. BDNF selectively regulates GABAA receptor transcription by activation of the JAK/STAT pathway. *Sci Signal* 1, ra9–ra9. doi:10.1126/scisignal.1162396
- Lyons, H.R., Land, M.B., Gibbs, T.T., Farb, D.H., 2001. Distinct signal transduction pathways for GABA-induced GABA(A) receptor down-regulation and uncoupling in neuronal culture: a role for voltage-gated calcium channels. *J. Neurochem.* 78, 1114–1126.
- Mallei, A., Baj, G., Ieraci, A., Corna, S., Musazzi, L., Lee, F.S., Tongiorgi, E., Popoli, M., 2015. Expression and Dendritic Trafficking of BDNF-6 Splice Variant are Impaired in Knock-In Mice Carrying Human BDNF Val66Met Polymorphism. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 18, pyv069. doi:10.1093/ijnp/pyv069
- Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., Wu, C., 2004. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 793–807. doi:10.1038/nrn1519

- Marler, K.J.M., Poopalasundaram, S., Broom, E.R., Wentzel, C., Drescher, U., 2010. Pro-neurotrophins secreted from retinal ganglion cell axons are necessary for ephrinA-p75NTR-mediated axon guidance. *Neural Dev* 5, 30. doi:10.1186/1749-8104-5-30
- Martin, S.C., Russek, S.J., Farb, D.H., 1999. Molecular identification of the human GABABR2: cell surface expression and coupling to adenylyl cyclase in the absence of GABABR1. *Mol. Cell. Neurosci.* 13, 180–191. doi:10.1006/mcne.1999.0741
- Martínez-Murillo, R., Fernández, A.P., Bentura, M.L., Rodrigo, J., 1998. Subcellular localization of low-affinity nerve growth factor receptor-immunoreactive protein in adult rat purkinje cells following traumatic injury. *Exp Brain Res* 119, 47–57.
- Marty, S., Wehrlé, 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.
- Massa, S.M., Xie, Y., Yang, T., Harrington, A.W., Kim, M.L., Yoon, S.O., Kraemer, R., Moore, L.A., Hempstead, B.L., Longo, F.M., 2006. Small, nonpeptide p75NTR ligands induce survival signaling and inhibit proNGF-induced death. *J. Neurosci.* 26, 5288–5300. doi:10.1523/JNEUROSCI.3547-05.2006
- Mathern, G.W., Adelson, P.D., Cahan, L.D., Leite, J.P., 2002. Hippocampal neuron damage in human epilepsy: Meyer's hypothesis revisited. *Prog. Brain Res.* 135, 237–251.
- Matsuda, N., Lu, H., Fukata, Y., Noritake, J., Gao, H., Mukherjee, S., Nemoto, T., Fukata, M., Poo, M.-M., 2009. Differential activity-dependent secretion of brain-derived neurotrophic factor from axon and dendrite. *J. Neurosci.* 29, 14185–14198. doi:10.1523/JNEUROSCI.1863-09.2009
- Mattson, M.P., Wan, R., 2008. Neurotrophic factors in autonomic nervous system plasticity and dysfunction. *Neuromolecular Med.* 10, 157–168. doi:10.1007/s12017-007-8021-y
- McDonald, B.J., Amato, A., Connolly, C.N., Benke, D., Moss, S.J., Smart, T.G., 1998. Adjacent phosphorylation sites on GABAA receptor beta subunits determine regulation by cAMP-dependent protein kinase. *Nat. Neurosci.* 1, 23–28. doi:10.1038/223
- McDonald, B.J., Moss, S.J., 1997. Conserved phosphorylation of the intracellular domains of GABA(A) receptor beta2 and beta3 subunits by cAMP-dependent protein kinase, cGMP-dependent protein kinase protein kinase C and Ca²⁺/calmodulin type II-dependent protein kinase. *Neuropharmacology* 36, 1377–1385.
- Medina, I., Friedel, P., Rivera, C., Kahle, K.T., Kourdougli, N., Uvarov, P.,

- Pellegrino, C., 2014. Current view on the functional regulation of the neuronal K(+)-Cl(-) cotransporter KCC2. *Front Cell Neurosci* 8, 27. doi:10.3389/fncel.2014.00027
- Menshanov, P.N., Lanshakov, D.A., Dygalo, N.N., 2015. proBDNF is a major product of bdnf gene expressed in the perinatal rat cortex. *Physiol Res*.
- Meyer, G., Kirsch, J., Betz, H., Langosch, D., 1995. Identification of a gephyrin binding motif on the glycine receptor beta subunit. *Neuron* 15, 563–572.
- Mhyre, T.R., Applegate, C.D., 2003. Persistent regional increases in brain-derived neurotrophic factor in the flurothyl model of epileptogenesis are dependent upon the kindling status of the animal. *Neuroscience* 121, 1031–1045.
- Mi, S., Lee, X., Shao, Z., Thill, G., Ji, B., Relton, J., Levesque, M., Allaire, N., Perrin, S., Sands, B., Crowell, T., Cate, R.L., McCoy, J.M., Pepinsky, R.B., 2004. LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat. Neurosci.* 7, 221–228. doi:10.1038/nn1188
- Minichiello, L., 2009. TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 850–860. doi:10.1038/nrn2738
- Mizoguchi, Y., Kanematsu, T., Hirata, M., Nabekura, J., 2003. A rapid increase in the total number of cell surface functional GABAA receptors induced by brain-derived neurotrophic factor in rat visual cortex. *J. Biol. Chem.* 278, 44097–44102. doi:10.1074/jbc.M305872200
- Mogi, M., Togari, A., Kondo, T., Mizuno, Y., Komure, O., Kuno, S., Ichinose, H., Nagatsu, T., 1999. Brain-derived growth factor and nerve growth factor concentrations are decreased in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 270, 45–48.
- Mowla, S.J., Pareek, S., Farhadi, H.F., Petrecca, K., Fawcett, J.P., Seidah, N.G., Morris, S.J., Sossin, W.S., Murphy, R.A., 1999. Differential sorting of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 19, 2069–2080.
- Muñoz, A., Méndez, P., DeFelipe, J., Alvarez-Leefmans, F.J., 2007. Cation-chloride cotransporters and GABA-ergic innervation in the human epileptic hippocampus. *Epilepsia* 48, 663–673. doi:10.1111/j.1528-1167.2007.00986.x
- Murray, K.D., Isackson, P.J., Eskin, T.A., King, M.A., Montesinos, S.P., Abraham, L.A., Roper, S.N., 2000. Altered mRNA expression for brain-derived neurotrophic factor and type II calcium/calmodulin-dependent protein kinase in the hippocampus of patients with intractable temporal lobe epilepsy. *J. Comp. Neurol.* 418, 411–422. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(20000320)418:4<411::AID-CNE4>3.0.CO;2-F
- Musazzi, L., Rimland, J.M., Ieraci, A., Racagni, G., Domenici, E., Popoli, M., 2014. Pharmacological characterization of BDNF promoters I, II and IV reveals that serotonin and norepinephrine input is sufficient for transcription

- activation. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 17, 779–791.
doi:10.1017/S1461145713001685
- Nagappan, G., Zaitsev, E., Senatorov, V.V., Yang, J., Hempstead, B.L., Lu, B., 2009. Control of extracellular cleavage of ProBDNF by high frequency neuronal activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 1267–1272.
doi:10.1073/pnas.0807322106
- Nakazato, M., Hashimoto, K., Shimizu, E., Niitsu, T., Iyo, M., 2012. Possible involvement of brain-derived neurotrophic factor in eating disorders. *IUBMB Life* 64, 355–361. doi:10.1002/iub.1012
- Naylor, D.E., Liu, H., Wasterlain, C.G., 2005. Trafficking of GABA(A) receptors, loss of inhibition, and a mechanism for pharmacoresistance in status epilepticus. *J. Neurosci.* 25, 7724–7733. doi:10.1523/JNEUROSCI.4944-04.2005
- Olsen, R.W., Sieghart, W., 2009. GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology* 56, 141–148.
doi:10.1016/j.neuropharm.2008.07.045
- Otsuka, M., Iversen, L.L., Hall, Z.W., KRAVITZ, E.A., 1966. Release of gamma-aminobutyric acid from inhibitory nerves of lobster. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 56, 1110–1115.
- Owens, D.F., Kriegstein, A.R., 2002. Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 715–727. doi:10.1038/nrn919
- Ozçelik, T., Rosenthal, A., Francke, U., 1991. Chromosomal mapping of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 genes in man and mouse. *Genomics* 10, 569–575.
- Palizvan, M.R., Sohya, K., Kohara, K., Maruyama, A., Yasuda, H., Kimura, F., Tsumoto, T., 2004. Brain-derived neurotrophic factor increases inhibitory synapses, revealed in solitary neurons cultured from rat visual cortex. *Neuroscience* 126, 955–966. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.03.053
- Palma, E., Amici, M., Sobrero, F., Spinelli, G., Di Angelantonio, S., Ragozzino, D., Mascia, A., Scoppetta, C., Esposito, V., Miledi, R., Eusebi, F., 2006. Anomalous levels of Cl⁻ transporters in the hippocampal subiculum from temporal lobe epilepsy patients make GABA excitatory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 8465–8468. doi:10.1073/pnas.0602979103
- Pan, B., Wang, W., Zhong, P., Blankman, J.L., Cravatt, B.F., Liu, Q.-S., 2011. Alterations of endocannabinoid signaling, synaptic plasticity, learning, and memory in monoacylglycerol lipase knock-out mice. *J. Neurosci.* 31, 13420–13430. doi:10.1523/JNEUROSCI.2075-11.2011
- Pang, P.T., Teng, H.K., Zaitsev, E., Woo, N.T., Sakata, K., Zhen, S., Teng, K.K., Yung, W.-H., Hempstead, B.L., Lu, B., 2004. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* 306,

487–491. doi:10.1126/science.1100135

- Park, J.A., Lee, J.Y., Sato, T.A., Koh, J.Y., 2000. Co-induction of p75NTR and p75NTR-associated death executor in neurons after zinc exposure in cortical culture or transient ischemia in the rat. *J. Neurosci.* 20, 9096–9103.
- Park, J.J., Cawley, N.X., Loh, Y.P., 2008. A bi-directional carboxypeptidase E-driven transport mechanism controls BDNF vesicle homeostasis in hippocampal neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 39, 63–73. doi:10.1016/j.mcn.2008.05.016
- Parpura, V., Zorec, R., 2010. Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes. *Brain Res Rev* 63, 83–92. doi:10.1016/j.brainresrev.2009.11.008
- Pathak, H.R., Weissinger, F., Terunuma, M., Carlson, G.C., Hsu, F.-C., Moss, S.J., Coulter, D.A., 2007. Disrupted dentate granule cell chloride regulation enhances synaptic excitability during development of temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci.* 27, 14012–14022. doi:10.1523/JNEUROSCI.4390-07.2007
- Payne, J.A., Rivera, C., Voipio, J., Kaila, K., 2003. Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. *Trends Neurosci.* 26, 199–206. doi:10.1016/S0166-2236(03)00068-7
- Phillips, H.S., Hains, J.M., Laramée, G.R., Rosenthal, A., Winslow, J.W., 1990. Widespread expression of BDNF but not NT3 by target areas of basal forebrain cholinergic neurons. *Science* 250, 290–294.
- Pirker, S., Schwarzer, C., Wieselthaler, A., Sieghart, W., Sperk, G., 2000. GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience* 101, 815–850.
- Pitkänen, A., Lukasiuk, K., 2009. Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy. *Epilepsy Behav* 14 Suppl 1, 16–25. doi:10.1016/j.yebeh.2008.09.023
- Polleux, F., Whitford, K.L., Dijkhuizen, P.A., Vitalis, T., Ghosh, A., 2002. Control of cortical interneuron migration by neurotrophins and PI3-kinase signaling. *Development* 129, 3147–3160.
- Puskarjov, M., Ahmad, F., Kaila, K., Blaesse, P., 2012. Activity-dependent cleavage of the K-Cl cotransporter KCC2 mediated by calcium-activated protease calpain. *J. Neurosci.* 32, 11356–11364. doi:10.1523/JNEUROSCI.6265-11.2012
- Puskarjov, M., Ahmad, F., Khirug, S., Sivakumaran, S., Kaila, K., Blaesse, P., 2015. BDNF is required for seizure-induced but not developmental up-regulation of KCC2 in the neonatal hippocampus. *Neuropharmacology* 88, 103–109. doi:10.1016/j.neuropharm.2014.09.005
- Rauskolb, S., Zagrebelsky, M., Dreznjak, A., Deogracias, R., Matsumoto, T., Wiese, S., Erne, B., Sendtner, M., Schaeren-Wiemers, N., Korte, M., Barde,

- Y.-A., 2010. Global deprivation of brain-derived neurotrophic factor in the CNS reveals an area-specific requirement for dendritic growth. *J. Neurosci.* 30, 1739–1749. doi:10.1523/JNEUROSCI.5100-09.2010
- Reibel, S., Larmet, Y., Lê, B.T., Carnahan, J., Marescaux, C., Depaulis, A., 2000. Brain-derived neurotrophic factor delays hippocampal kindling in the rat. *Neuroscience* 100, 777–788.
- Reichardt, L.F., 2006. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 361, 1545–1564. doi:10.1098/rstb.2006.1894
- Ren, J.Q., Aika, Y., Heizmann, C.W., Kosaka, T., 1992. Quantitative analysis of neurons and glial cells in the rat somatosensory cortex, with special reference to GABAergic neurons and parvalbumin-containing neurons. *Exp Brain Res* 92, 1–14.
- Rivera, C., Li, H., Thomas-Crusells, J., Lahtinen, H., Viitanen, T., Nanobashvili, A., Kokaia, Z., Airaksinen, M.S., Voipio, J., Kaila, K., Saarma, M., 2002. BDNF-induced TrkB activation down-regulates the K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 and impairs neuronal Cl⁻ extrusion. *J. Cell Biol.* 159, 747–752. doi:10.1083/jcb.200209011
- Rivera, C., Voipio, J., Payne, J.A., Ruusuvuori, E., Lahtinen, H., Lamsa, K., Pirvola, U., Saarma, M., Kaila, K., 1999. The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 397, 251–255. doi:10.1038/16697
- Rivera, C., Voipio, J., Thomas-Crusells, J., Li, H., Emri, Z., Sipilä, S., Payne, J.A., Minichiello, L., Saarma, M., Kaila, K., 2004. Mechanism of activity-dependent downregulation of the neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2. *J. Neurosci.* 24, 4683–4691. doi:10.1523/JNEUROSCI.5265-03.2004
- Rivera, S., Tremblay, E., Timsit, S., Canals, O., Ben-Ari, Y., Khrestchatisky, M., 1997. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) is differentially induced in neurons and astrocytes after seizures: evidence for developmental, immediate early gene, and lesion response. *J. Neurosci.* 17, 4223–4235.
- Roberts, R.C., Difiglia, M., 1988. Localization of immunoreactive GABA and enkephalin and NADPH-diaphorase-positive neurons in fetal striatal grafts in the quinolinic-acid-lesioned rat neostriatum. *J. Comp. Neurol.* 274, 406–421. doi:10.1002/cne.902740309
- Rodriguez-Tébar, A., Dechant, G., Barde, Y.A., 1990. Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. *Neuron* 4, 487–492.
- Rosenthal, A., Goeddel, D.V., Nguyen, T., Martin, E., Burton, L.E., Shih, A., Laramée, G.R., Wurm, F., Mason, A., Nikolics, K., 1991. Primary structure and biological activity of human brain-derived neurotrophic factor. *Endocrinology* 129, 1289–1294. doi:10.1210/endo-129-3-1289

- Roux, P.P., Colicos, M.A., Barker, P.A., Kennedy, T.E., 1999. p75 neurotrophin receptor expression is induced in apoptotic neurons after seizure. *J. Neurosci.* 19, 6887–6896.
- Rudge, J.S., Mather, P.E., Pasnikowski, E.M., Cai, N., Corcoran, T., Acheson, A., Anderson, K., Lindsay, R.M., Wiegand, S.J., 1998. Endogenous BDNF protein is increased in adult rat hippocampus after a kainic acid induced excitotoxic insult but exogenous BDNF is not neuroprotective. *Exp. Neurol.* 149, 398–410. doi:10.1006/exnr.1997.6737
- Sadakata, T., Mizoguchi, A., Sato, Y., Katoh-Semba, R., Fukuda, M., Mikoshiba, K., Furuichi, T., 2004. The secretory granule-associated protein CAPS2 regulates neurotrophin release and cell survival. *J. Neurosci.* 24, 43–52. doi:10.1523/JNEUROSCI.2528-03.2004
- Sakata, K., Woo, N.H., Martinowich, K., Greene, J.S., Schloesser, R.J., Shen, L., Lu, B., 2009. Critical role of promoter IV-driven BDNF transcription in GABAergic transmission and synaptic plasticity in the prefrontal cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 5942–5947. doi:10.1073/pnas.0811431106
- Salonen, V., Kallinen, S., Lopez-Picon, F.R., Korpi, E.R., Holopainen, I.E., Uusi-Oukari, M., 2006. AMPA/kainate receptor-mediated up-regulation of GABAA receptor delta subunit mRNA expression in cultured rat cerebellar granule cells is dependent on NMDA receptor activation. *Brain Res.* 1087, 33–40. doi:10.1016/j.brainres.2006.02.104
- Scarisbrick, I.A., Jones, E.G., Isackson, P.J., 1993. Coexpression of mRNAs for NGF, BDNF, and NT-3 in the cardiovascular system of the pre- and postnatal rat. *J. Neurosci.* 13, 875–893.
- Scharfman, H.E., Goodman, J.H., Sollas, A.L., 2000. Granule-like neurons at the hilar/CA3 border after status epilepticus and their synchrony with area CA3 pyramidal cells: functional implications of seizure-induced neurogenesis. *J. Neurosci.* 20, 6144–6158.
- Segal, M., 1988. Synaptic activation of a cholinergic receptor in rat hippocampus. *Brain Res.* 452, 79–86.
- Semah, F., Picot, M.C., Adam, C., Broglin, D., Arzimanoglou, A., Bazin, B., Cavalcanti, D., Baulac, M., 1998. Is the underlying cause of epilepsy a major prognostic factor for recurrence? *Neurology* 51, 1256–1262.
- Shetty, A.K., Turner, D.A., 1998. In vitro survival and differentiation of neurons derived from epidermal growth factor-responsive postnatal hippocampal stem cells: inducing effects of brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurobiol.* 35, 395–425.
- Shulga, A., Magalhães, A.C., Autio, H., Plantman, S., di Lieto, A., Nykjaer, A., Carlstedt, T., Risling, M., Arumäe, U., Castrén, E., Rivera, C., 2012. The loop diuretic bumetanide blocks posttraumatic p75NTR upregulation and rescues

- injured neurons. *J. Neurosci.* 32, 1757–1770. doi:10.1523/JNEUROSCI.3282-11.2012
- Shumate, M.D., Lin, D.D., Gibbs, J.W., Holloway, K.L., Coulter, D.A., 1998. GABA(A) receptor function in epileptic human dentate granule cells: comparison to epileptic and control rat. *Epilepsy Res.* 32, 114–128.
- Smith, M.A., Zhang, L.X., Lyons, W.E., Mamounas, L.A., 1997. Anterograde transport of endogenous brain-derived neurotrophic factor in hippocampal mossy fibers. *Neuroreport* 8, 1829–1834.
- Spencer, S.S., Spencer, D.D., 1994. Entorhinal-hippocampal interactions in medial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 35, 721–727.
- Sun, Y., Lim, Y., Li, F., Liu, S., Lu, J.-J., Haberberger, R., Zhong, J.-H., Zhou, X.-F., 2012. ProBDNF collapses neurite outgrowth of primary neurons by activating RhoA. *PLoS ONE* 7, e35883. doi:10.1371/journal.pone.0035883
- Takahashi, M., Hayashi, S., Kakita, A., Wakabayashi, K., Fukuda, M., Kameyama, S., Tanaka, R., Takahashi, H., Nawa, H., 1999. Patients with temporal lobe epilepsy show an increase in brain-derived neurotrophic factor protein and its correlation with neuropeptide Y. *Brain Res.* 818, 579–582.
- TAKEUCHI, A., TAKEUCHI, N., 1965. LOCALIZED ACTION OF GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID ON THE CRAYFISH MUSCLE. *J. Physiol. (Lond.)* 177, 225–238. doi:10.1111/(ISSN)1469-7793
- Teng, H.K., Teng, K.K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., Almeida, R.D., Kermani, P., Torkin, R., Chen, Z.-Y., Lee, F.S., Kraemer, R.T., Nykjaer, A., Hempstead, B.L., 2005. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J. Neurosci.* 25, 5455–5463. doi:10.1523/JNEUROSCI.5123-04.2005
- Teng, K.K., Hempstead, B.L., 2004. Neurotrophins and their receptors: signaling trios in complex biological systems. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 35–48. doi:10.1007/s00018-003-3099-3
- Terunuma, M., Xu, J., Vithlani, M., Sieghart, W., Kittler, J., Pangalos, M., Haydon, P.G., Coulter, D.A., Moss, S.J., 2008. Deficits in phosphorylation of GABA(A) receptors by intimately associated protein kinase C activity underlie compromised synaptic inhibition during status epilepticus. *J. Neurosci.* 28, 376–384. doi:10.1523/JNEUROSCI.4346-07.2008
- Theodore, W.H., Bhatia, S., Hattai, J., Fazilat, S., DeCarli, C., Bookheimer, S.Y., Gaillard, W.D., 1999. Hippocampal atrophy, epilepsy duration, and febrile seizures in patients with partial seizures. *Neurology* 52, 132–136.
- Tongiorgi, E., Domenici, L., Simonato, M., 2006. What is the biological significance of BDNF mRNA targeting in the dendrites? Clues from epilepsy and cortical development. *Mol Neurobiol* 33, 17–32. doi:10.1385/MN:33:1:017

- Trang, T., Beggs, S., Salter, M.W., 2011. Brain-derived neurotrophic factor from microglia: a molecular substrate for neuropathic pain. *Neuron Glia Biol.* 7, 99–108. doi:10.1017/S1740925X12000087
- Treiman, D.M., 1990. The role of benzodiazepines in the management of status epilepticus. *Neurology* 40, 32–42.
- Troy, C.M., Friedman, J.E., Friedman, W.J., 2002. Mechanisms of p75-mediated death of hippocampal neurons. Role of caspases. *J. Biol. Chem.* 277, 34295–34302. doi:10.1074/jbc.M205167200
- Tucker, K.L., Meyer, M., Barde, Y.A., 2001. Neurotrophins are required for nerve growth during development. *Nat. Neurosci.* 4, 29–37. doi:10.1038/82868
- Turski, W.A., Cavalheiro, E.A., Schwarz, M., Czuczwar, S.J., Kleinrok, Z., Turski, L., 1983. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav. Brain Res.* 9, 315–335.
- Tyzio, R., Cossart, R., Khalilov, I., Minlebaev, M., Hübner, C.A., Represa, A., Ben-Ari, Y., Khazipov, R., 2006. Maternal oxytocin triggers a transient inhibitory switch in GABA signaling in the fetal brain during delivery. *Science* 314, 1788–1792. doi:10.1126/science.1133212
- Tyzio, R., Nardou, R., Ferrari, D.C., Tsintsadze, T., Shahrokhi, A., Eftekhari, S., Khalilov, I., Tsintsadze, V., Bouchoud, C., Chazal, G., Lemonnier, E., Lozovaya, N., Burnashev, N., Ben-Ari, Y., 2014. Oxytocin-mediated GABA inhibition during delivery attenuates autism pathogenesis in rodent offspring. *Science* 343, 675–679. doi:10.1126/science.1247190
- Unsain, N., Nuñez, N., Anastasia, A., Mascó, D.H., 2008. Status epilepticus induces a TrkB to p75 neurotrophin receptor switch and increases brain-derived neurotrophic factor interaction with p75 neurotrophin receptor: an initial event in neuronal injury induction. *Neuroscience* 154, 978–993. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.04.038
- Vicario-Abejón, C., Owens, D., McKay, R., Segal, M., 2002. Role of neurotrophins in central synapse formation and stabilization. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 965–974. doi:10.1038/nrn988
- Vilar, M., Charalampopoulos, I., Kenchappa, R.S., Simi, A., Karaca, E., Reversi, A., Choi, S., Bothwell, M., Mingarro, I., Friedman, W.J., Schiavo, G., Bastiaens, P.I.H., Verveer, P.J., Carter, B.D., Ibáñez, C.F., 2009. Activation of the p75 neurotrophin receptor through conformational rearrangement of disulphide-linked receptor dimers. *Neuron* 62, 72–83. doi:10.1016/j.neuron.2009.02.020
- VonDran, M.W., LaFrancois, J., Padow, V.A., Friedman, W.J., Scharfman, H.E., Milner, T.A., Hempstead, B.L., 2014. p75NTR, but not proNGF, is upregulated following status epilepticus in mice. *ASN Neuro* 6,

- Wang, H., Bedford, F.K., Brandon, N.J., Moss, S.J., Olsen, R.W., 1999. GABA(A)-receptor-associated protein links GABA(A) receptors and the cytoskeleton. *Nature* 397, 69–72. doi:10.1038/16264
- Wang, K.C., Kim, J.A., Sivasankaran, R., Segal, R., He, Z., 2002. P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature* 420, 74–78. doi:10.1038/nature01176
- Weng, L.P., Smith, W.M., Brown, J.L., Eng, C., 2001. PTEN inhibits insulin-stimulated MEK/MAPK activation and cell growth by blocking IRS-1 phosphorylation and IRS-1/Grb-2/Sos complex formation in a breast cancer model. *Hum. Mol. Genet.* 10, 605–616.
- Westergaard, U.B., Sørensen, E.S., Hermey, G., Nielsen, M.S., Nykjaer, A., Kirkegaard, K., Jacobsen, C., Gliemann, J., Madsen, P., Petersen, C.M., 2004. Functional organization of the sortilin Vps10p domain. *J. Biol. Chem.* 279, 50221–50229. doi:10.1074/jbc.M408873200
- Wetmore, C., Ernfors, P., Persson, H., Olson, L., 1990. Localization of brain-derived neurotrophic factor mRNA to neurons in the brain by in situ hybridization. *Exp. Neurol.* 109, 141–152.
- Winnubst, J., Cheyne, J.E., Niculescu, D., Lohmann, C., 2015. Spontaneous Activity Drives Local Synaptic Plasticity In Vivo. *Neuron* 87, 399–410. doi:10.1016/j.neuron.2015.06.029
- Wisden, W., Laurie, D.J., Monyer, H., Seeburg, P.H., 1992. The distribution of 13 GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon. *J. Neurosci.* 12, 1040–1062.
- Woo, N.H., Teng, H.K., Siao, C.-J., Chiaruttini, C., Pang, P.T., Milner, T.A., Hempstead, B.L., Lu, B., 2005. Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat. Neurosci.* 8, 1069–1077. doi:10.1038/nn1510
- Yamada, M., Ohnishi, H., Sano, S.I., Nakatani, A., Ikeuchi, T., Hatanaka, H., 1997. Insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2 are tyrosine-phosphorylated and associated with phosphatidylinositol 3-kinase in response to brain-derived neurotrophic factor in cultured cerebral cortical neurons. *J. Biol. Chem.* 272, 30334–30339.
- Yamada, M.K., Nakanishi, K., Ohba, S., Nakamura, T., Ikegaya, Y., Nishiyama, N., Matsuki, N., 2002. Brain-derived neurotrophic factor promotes the maturation of GABAergic mechanisms in cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 22, 7580–7585.
- Yang, J., Siao, C.-J., Nagappan, G., Marinic, T., Jing, D., McGrath, K., Chen, Z.-Y., Mark, W., Tessarollo, L., Lee, F.S., Lu, B., Hempstead, B.L., 2009.

Neuronal release of proBDNF. *Nat. Neurosci.* 12, 113–115.
doi:10.1038/nn.2244

Yoshii, A., Constantine-Paton, M., 2007. BDNF induces transport of PSD-95 to dendrites through PI3K-AKT signaling after NMDA receptor activation. *Nat. Neurosci.* 10, 702–711. doi:10.1038/nn1903

Zhang, N., Wei, W., Mody, I., Houser, C.R., 2007. Altered localization of GABA(A) receptor subunits on dentate granule cell dendrites influences tonic and phasic inhibition in a mouse model of epilepsy. *J. Neurosci.* 27, 7520–7531. doi:10.1523/JNEUROSCI.1555-07.2007

Zhou, L., Xiong, J., Lim, Y., Ruan, Y., Huang, C., Zhu, Y., Zhong, J.-H., Xiao, Z., Zhou, X.-F., 2013. Upregulation of blood proBDNF and its receptors in major depression. *J Affect Disord* 150, 776–784.
doi:10.1016/j.jad.2013.03.002