



HAL
open science

Régulation du cycle vésiculaire et de l'approvisionnement en GABA des interneurons de l'hippocampe en fonction de l'activité

Laurine Bonet

► **To cite this version:**

Laurine Bonet. Régulation du cycle vésiculaire et de l'approvisionnement en GABA des interneurons de l'hippocampe en fonction de l'activité. Neurosciences [q-bio.NC]. PSL Research University, 2016. Français. NNT : 2016PSLEE027 . tel-02275629v1

HAL Id: tel-02275629

<https://theses.hal.science/tel-02275629v1>

Submitted on 1 Sep 2019 (v1), last revised 23 Jun 2020 (v2)

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

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

THÈSE DE DOCTORAT

de l'Université de recherche Paris Sciences et Lettres
PSL Research University

Préparée à l'IBENS

Régulation du cycle vésiculaire et de l'approvisionnement en GABA des interneurons de l'hippocampe en fonction de l'activité

Ecole doctorale n°158

Cerveau Cognition Comportement

Spécialité Neurosciences

Soutenue par Laurine BONET
le 30 septembre 2016

Dirigée par **Stéphane**
SUPPLISSON

COMPOSITION DU JURY :

M. DEBANNE Dominique
UNIS, Rapporteur

M. PERRAIS David
IINS, Rapporteur

M. GASNIER Bruno
UMR8250, Examineur

M. MARTY Serge
ICM, Examineur

M. BARBOUR Boris
IBENS, Président

M. SUPPLISSON Stéphane
IBENS, Directeur de thèse

IBENS

PSL
RESEARCH UNIVERSITY PARIS

*Rien ne naît ni ne périt, mais des choses déjà existantes
se combinent, puis se séparent de nouveau.*

Anaxagore

Remerciements

Avant tout, je tiens à remercier sincèrement les membres du jury : Dominique Debanne et David Perrais d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail de thèse, Bruno Gasnier et Serge Marty d'avoir accepté de l'examiner et Boris Barbour d'avoir accepté le rôle de président.

Stéphane, je ne te remercierai jamais assez pour ces années de thèse passées à explorer le monde fabuleux des transporteurs ainsi que l'extraordinaire complexité des pools des vésicules. Tout d'abord merci d'avoir répondu à mon mail de « candidature » pour le stage de M2, court, efficace, brutal diront certains, un beau jour d'été. Je te remercie pour la confiance que tu m'as accordée ce jour-là et les années suivantes. Je te remercie pour toutes les discussions (souvent tardives) qui m'ont permis d'évoluer et de m'enrichir, pour tout ce que tu m'as appris mais aussi pour ta bienveillance. Enfin merci pour ton aide plus que précieuse lors de la rédaction de ma thèse.

Je tiens à remercier Peng et Karin qui m'ont accueillies dans ce laboratoire, même si la période fut courte, ces mois passés avec vous m'ont permis de devenir rapidement autonome. Karin, je te remercie de toujours prendre le temps de discuter de mes projets dès que tu passes sur Paris.

Pour la vie au quotidien dans le laboratoire, je tiens à remercier bon nombre de personnes au neuvième étage. Ainsi je remercie Boris d'avoir essayé de m'inculquer quelques notions de bon anglais et pour les discussions en bibliothèque le midi ; Stéphane pour toutes les discussions de couloir ou autour de la Nespresso automatique (source de café indispensable mais aussi de débat) ; Pierre pour son agréable compagnie en congrès et les discussions d'avenir (après m'avoir demandé si j'avais quelque chose à manger) ; Mariano d'être toujours disponible pour répondre à mes questions ; Daniela pour ta gentillesse ; ainsi que Clément ; Gérard, Guillaume, Laëtitia, Dimitri, Jean-Baptiste, Maria, Antonin, Matthieu, Rémi, Stéphanie, David, Annick, Françoise et bien d'autres !

Je tiens à remercier Guy, mon ancien voisin d'en face, Teddy, mon colocataire de salle de culture et Benjamin, mon nouveau voisin d'en face pour leur amitié. Je vous remercie pour les repas sympathiques du midi, mes connaissances sur le vélo et les solowheel se sont considérablement accrues et votre compagnie est toujours accompagnée d'une franche partie de rigolade. Merci pour votre aide lors de la rédaction, que ce soit pour la relecture, les blagues ou les plats picard !

Je remercie chaleureusement mon amie Zoé, d'être toujours disponible pour discuter de science ou autre, autour d'un café au labo ou maintenant par WhatsApp! Et je remercie évidemment Caroline, bien plus qu'une voisine de bureau, une amie sur laquelle je peux compter en toute circonstance. Un grand merci encore à toutes les deux pour votre aide lors de la rédaction de ma thèse.

Je remercie ma famille (Marièle, Mamy, Dom, Alex, Emie, Julia, Patrick) et ma belle-famille (Valérie, Marjorie, Nicolas, Catherine, Jean-Philippe) de vous être toujours sentis concernés durant ces quatre années de l'état d'avancement de mes manip.

Je tiens à remercier particulièrement mes sœurs, Manon et Oriane, pour leur soutien sans faille, leur écoute, leurs encouragements. Je remercie aussi Eléa d'avoir toujours accepté de prendre la pose avec le sourire pour égayer mes journées d'écriture !

Je remercie mes parents de m'avoir laissée libre de mes choix et de m'avoir toujours soutenue. Je remercie ma mère Véronique de répondre toujours présent, de m'encourager et d'écouter avec attention tous mes problèmes d'expérimentation. Je remercie mon père de m'avoir donné le goût des sciences, d'avoir toujours été là pour discuter et pour sa confiance inébranlable.

Et enfin, le dernier cité mais il est le premier, je remercie Dimitri qui m'a toujours encouragée mais aussi supportée ! Et supporté les manips qui ne commencent qu'à 19h, les humeurs dépendantes de la réussite de manips, les récits de mise au point expérimentale, les weekends et soirées passés à écrire. Je pense que tu en sais plus sur le bruit d'un poste d'électrophysiologie que tu ne le voudrais mais merci de m'avoir toujours écoutée, de m'avoir accompagnée pendant ces quatre années de thèse et d'être toujours à mes côtés. Pour ça et pour tout le reste merci.

Table des matières

INTRODUCTION	1
I. Les interneurons GABAergiques de l'hippocampe	3
I.1. Concordance entre l'anatomie et la fonction du circuit hippocampique	3
I.2. Les interneurons GABAergiques forment une petite population de cellules très diverses	
I.3. La souris EGFP:GAD65 : un modèle d'étude des interneurons de la CGE	8
I.4. Oscillations et réponses en fréquence des interneurons	10
II. Trois cycles maintiennent la libération vésiculaire de neurotransmetteurs	11
III. Le cycle vésiculaire	15
III.1. Etape 1 : le remplissage en neurotransmetteur	15
III.2. Etapes 2 à 5: le recrutement des vésicules à la zone active jusqu'à l'exocytose	15
III.2.1. Les trois protéines SNARES impliquées dans l'exocytose vésiculaire	16
III.2.2. La fusion membranaire	17
III.2.3. Contrôle de la fusion : rôle des synaptotagmines et de la complexine	18
III.2.4. La zone active	20
III.3. Etape 6 : L'endocytose	22
III.3.1. L'endocytose dépendante de la clathrine	23
III.3.2. Le « Kiss and Run »	23
III.3.3. L'endocytose en masse (bulk endocytosis)	24
III.3.4. L'endocytose ultra rapide	25
III.4. Etape 7 : L'acidification des vésicules	27
IV. Mécanismes de remplissage des vésicules en GABA	29
IV.1. L'accumulation du GABA dans la vésicule par VIAAT	29
IV.2. Synthèse enzymatique par les GAD-65 et 67	31
IV.3. Source de GABA	34
IV.3.1. Les transporteurs du GABA	34
IV.3.2. Distribution cellulaire des transporteurs du GABA	35
IV.3.3. Régulation du transporteur GAT1	36
IV.4. Source de glutamate	37
IV.4.1. Les transporteurs du glutamate	37
IV.4.2. Distribution cellulaire des transporteurs du glutamate	38
IV.4.3. Régulation du transporteur EAAT3/EAAC1	39
IV.5. Source de glutamine	41
IV.5.1. Métabolisme de la glutamine	41
IV.5.2. Les transporteurs de la glutamine	42
IV.5.3. Distribution cellulaire et régulation de SNAT1 et 2	44
V. Les différents pools de vésicules	46
V.1. Les pools de vésicules synaptiques	47
V.1.1. Le pool recyclant total	47
V.1.2. Le pool de repos	48
V.1.3. Le pool prêt à être libéré immédiatement	48
V.1.4. Le pool recyclant ou pool de réserve	49

V.2. Echange de vésicules entre synapses.....	49
V.3. Les techniques d'étude de la dynamique des pools de vésicules	51
V.4. La pHluorin	52
VI. Déterminants postsynaptiques de la transmission GABAergique	54
VI.1. Les récepteurs GABA _A	55
VI.1.1. Structure et diversité moléculaire des récepteurs GABA _A	55
VI.1.2. Site de liaison du GABA	55
VI.1.3. Propriétés biophysiques des récepteurs GABA _A	56
VI.1.4. Shunt et hyperpolarisation : Les deux composantes de l'inhibition GABAergique	
VI.1.5. Transmission GABAergique phasique et tonique.....	57
VI.1.6. Variation des IPSCs GABAergiques et régulation postsynaptique des récepteurs GABA _A synaptiques	57
VI.2. Les récepteurs GABA _B	58
VI.2.1. Composition et organisation du récepteur GABA _B	58
VI.2.2. Conséquences de l'activation des récepteurs GABA _B présynaptiques	59
VI.2.3. Conséquences de l'activation des récepteurs GABA _B postsynaptiques.....	59
VI.2.4. Rôle dans la plasticité et l'activité de réseau.....	60
MATERIELS ET METHODES	61
RESULTATS.....	73
Préambule.....	75
I. Considérations méthodologiques	77
I.1. Culture neuronale	79
I.2. Protocole en paire	81
I.3. Protocoles de déplétion du GABA cytosolique	83
II. Cytosolic Transmitter Concentration Regulates Vesicle Cycling at Hippocampal GABAergic Terminals	89
Article : Wang et al, Neuron (2013), 80 :143-158	91
Supplemental Information	107
III. Régulation de l'approvisionnement en GABA en fonction de l'activité	115
III.1. Les besoins en GABA augmentent pendant une période d'activité prolongée	117
III.2. Régulation de la capture de GABA par l'activité	118
III.2.1. La restauration du GABA cytosolique par GAT1 dépasse le stock initial ...	118
III.2.2. L'activité réduit la capture de GABA à faible concentration	121
III.2.3. L'inhibition de la restauration est dépendante du calcium	122
III.3. Comparaison des restaurations réalisées par une capture de GABA et de glutamine à 4 Hz	124
III.4. Potentialisation de la capture de glutamine par l'activité	125

IV. VGAT-pHluorin	131
IV.1.Expression de VGAT-pHluorin dans les neurones inhibiteurs	133
IV.1.1. La sonde VGAT-pHluorin est exprimée dans les boutons synaptiques	134
IV.1.2. VGAT-pHluorin est exprimé majoritairement dans les neurones inhibiteurs	134
IV.1.2.1. Evidences immunocytochimiques	134
IV.1.2.2. Evidences électrophysiologiques	136
IV.2. Combiner l'imagerie présynaptique et les enregistrements post synaptiques pour étudier le cycle et le contenu vésiculaire	136
IV.2.1. Les contraintes expérimentales	136
IV.2.2. Acquisition et Analyse	137
IV.2.3. Stimulation extracellulaire	138
IV.2.3.1. VGlut1-pHluorin	138
IV.2.3.2. VGAT-pHluorin	139
IV.2.4. Enregistrements pré- et post-synaptiques : combiner électrophysiologie en paire et imagerie VGAT-pHluorin	141
IV.2.4.1. Cultures primaires d'hippocampe de souris	141
IV.2.4.2. Cultures primaires d'hippocampe de rat	143
DISCUSSION	145
REFERENCES	153

Tables

Table 1 Produits pour la culture primaire de neurones	64
Table 2 Solutions pour la culture primaire de neurones.....	65
Table 3 Mix utilisés pour la transfection.....	66
Table 4 Solution interne présynaptique.....	69
Table 5 Solution interne postsynaptique.....	69
Table 6 Solution externe	70
Table 7 Solution externe pH acide	70
Table 8 Solution externe NH ₄	70
Table 9 Drogues.....	71

Figures

INTRODUCTION

Figure I-1	Les différentes strates des champs ammoniens de l'hippocampe	3
Figure I-2	Représentation schématique des boucles du réseau hippocampique.....	4
Figure I-3	Diversité multidimensionnelle des interneurons	6
Figure I-4	Origine des principaux sous-types d'interneurones de l'hippocampe	7
Figure I-5	Les propriétés électrophysiologiques et morphologiques des interneurons GFP ⁺ en tranche d'hippocampe de souris GAD65:eGFP.....	9
Figure II-1	Le cycle vésiculaire.....	11
Figure II-2	La triade du recyclage	12
Figure II-3	Dépression des IPSCs à la synapse cellule en panier-cellule granulaire	13
Figure III-1	Représentation schématique des protéines SNAREs	17
Figure III-2	Modèle moléculaire des composants de l'appareil de fusion présumé.....	17
Figure III-3	Interactions moléculaire du complexe SNARE	19
Figure III-4	Modèle moléculaire du complexe protéique de la zone active	20
Figure III-5	Voies principales d'endocytose.....	22
Figure III-6	L'endocytose en masse	24
Figure III-7	L'endocytose ultra rapide.....	26
Figure III-8	Structure de la vATPase	27
Figure IV-1	Topologie transmembranaire de VIAAT	29
Figure IV-3	Réaction catalysée par la GAD	32
Figure IV-3	Modèle d'un couplage structural et fonctionnel entre la synthèse du GABA et son transport vésiculaire dans les vésicules synaptiques	33
Figure IV-4	Stœchiométrie des transporteurs du GABA.....	34
Figure IV-5	Distribution subcellulaire schématique des transporteurs du GABA et du glutamate.....	35
Figure IV-6	Mécanisme schématique du transport du glutamate.....	37
Figure IV-7	Illustration schématique de la localisation des transporteurs du glutamate	39
Figure IV-8	Schéma représentant quelques-unes des principales voies métaboliques et des compartiments cellulaires impliqués dans l'homéostasie du glutamate dans le cerveau	42

Figure IV-9	Homologie de séquence entre les transporteurs de la glutamine et VIAAT.....	43
Figure IV-10	SNAT1 est localisé dans les interneurons PV ⁺ de l'hippocampe en culture et ciblé dans les segments axonaux contenant VGAT	44
Figure V-1	Représentation schématique des principaux pools.....	47
Figure V-2	Visualisations schématique et expérimentales de la localisation des principaux pools.....	51
Figure V-3	Représentation schématique de la fluorescence d'une protéine vésiculaire fusionnée à la pFluorin lors d'un cycle d'exo-endocytose	53
Figure VI-1	Structure cristallographique du GABA _A R-β3.....	55
Figure VI-2	L'expression précoce de NKCC1 et tardive de KCC2 détermine les changements développementaux de la concentration de Cl ⁻ interne.....	56
Figure VI-3	Organisation schématique du récepteur GABA _B	58
Figure VI-4	Effecteurs en aval des récepteurs GABA _B	59

RESULTATS

Résultats I

Figure 1.	Neurone GFP ⁺ dans une culture mixte d'hippocampe de souris GAD65:eGFP	79
Figure 2.	Exemple de la diversité morphologique des interneurons GAD65 ⁺ dans des cultures d'hippocampe de souris GAD65:eGFP	80
Figure 3.	Co-marquage de la GFP et de la GAD65 en immunofluorescence	80
Figure 4	PSCs GABAergiques enregistrés sur une paire de neurones avec un élément présynaptique GFP ⁺	82
Figure 5	La dépression synaptique à court terme pendant un train de stimulation est réversible	84
Figure 6.	Effondrement de la transmission par épuisement du stock cytosolique de GABA	85
Figure 7.	La diffusion axonale d'une sonde fluorescente à partir de la pipette est quasi complète au début des enregistrements électrophysiologiques	86
Figure 8.	Différentes modalités d'effondrement de la transmission induit par une stimulation continue à 4 Hz	87

Résultats III

Figure 9.	L'activité répétée pendant un train à 4 Hz induit une surconsommation de GABA	117
Figure 10.	GAT1 restaure le stock cytosolique de GABA et potentialise la transmission	119
Figure 11.	Une application de GABA à 10 μM restaure partiellement les stocks cytosoliques	119
Figure 12.	Restauration partielle ou potentialisation de l'amplitude cumulée après capture de GABA	120
Figure 13.	Une application de GABA 2 μM pendant un train à 4 Hz ne restaure pas la transmission	121

Figure 14.	La cinétique de restauration dépend de la concentration et n'est pas sensible à un inhibiteur des récepteurs GABA _B	122
Figure 15.	La régulation de la capture de GABA pendant l'activité est dépendante du calcium	123
Figure 16.	Résumé des effets du Ca ²⁺ et de l'activité sur la restauration du GABA cytosolique par GAT1	123
Figure 17.	L'activité à 4 Hz potentialise la capture de glutamine	124
Figure 18.	Comparaison des restaurations par capture de GABA ou de glutamine pendant l'activité	125
Figure 19	La potentialisation de la capture de glutamine pendant l'activité maintient la libération stationnaire de GABA	126
Figure 20.	La cinétique de restauration de la transmission par la capture de Gln est plus rapide à 4 Hz	127
Figure 21.	La glutamine, mais pas le glutamate, montre une régulation dépendante de l'activité dans l'approvisionnement en GABA	127
Figure 22.	La capture de glutamine permet l'approvisionnement du stock cytosolique de GABA pendant l'activité	128
Figure 23.	Effet de l'activité neuronale sur la capture de GABA, glutamate et glutamine	129

Résultats IV

Figure 24.	VGAT-pHluorin est accumulée dans les boutons synaptiques	132
Figure 25	Co-marquage de la GFP et du GABA	134
Figure 26.	Co-marquage de la GFP et de la GAD65/67	135
Figure 27.	Co-marquage de la GFP et de VGAT, EAAT3 et GAT1	135
Figure 28.	Les neurones VGAT-pHluorin ⁺ libèrent du GABA	136
Figure 29.	Signal de fluorescence de VGAT-pHluorin dans des boutons synaptiques	137
Figure 30.	Suivi des cycles d'exo et endocytose par la sonde VGlut1-pHluorin lors de stimulation extracellulaire à 20 Hz	138
Figure 31.	Suivi de cycles successifs d'exo et endocytose par la sonde VGAT-pHluorin évoqués par une stimulation à 20 Hz et 4 Hz avec une pipette externe	139
Figure 32.	Imagerie présynaptique de VGAT-pHluorin et enregistrement post synaptique en paire	140
Figure 33.	Imagerie de VGAT-pHluorin et enregistrement en paire sur une culture d'hippocampe de rat	142

INTRODUCTION

I. Les interneurones GABAergiques de l'hippocampe

I.1. Concordance entre l'anatomie et la fonction du circuit hippocampique

L'hippocampe est une structure cérébrale du système limbique des Mammifères qui est essentielle à l'acquisition et la consolidation de la mémoire déclarative chez l'homme (Neves et al 2008). Un ensemble de travaux, couronné par le prix Nobel 2014 accordé à John O'Keefe, May-Britt et Edvard Moser, a montré que le cortex entorhinal et l'hippocampe jouaient un rôle essentiel dans la fabrication des cartes corticales et l'orientation spatiale des rongeurs. La découverte des « place cells » dans l'hippocampe, neurones de lieu déchargeant lorsque le rat occupe une position précise dans son environnement (O'Keefe 1979, O'Keefe & Dostrovsky 1971) a été suivie par l'identification des « grid cells », « border cells », « head direction cells » et plus récemment des « speed cells » dans le cortex entorhinal médian (Hafting et al 2005, Kropff et al 2015, Solstad et al 2008). Les informations de position, direction et vitesse traitées par ces cellules spécialisées permettent la navigation et l'orientation spatiale des rongeurs dans différents environnements (Moser & Moser 2013, Rowland et al 2015).

Anatomiquement, la formation hippocampique associe trois régions: le gyrus denté, la corne d'Ammon (CA) et le subiculum. La corne d'Ammon est elle-même subdivisée en trois aires (CA1, CA2, CA3) qui sont distinguées par leur topologie et les types d'afférence que reçoivent les cellules principales (Lorente de Nó, Rafael (1934). "Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system". J Psychol Neurol 46: 113–177). Chaque aire comprend plusieurs strates, dénommées selon un axe superficiel-profond : Alveus-Oriens, Pyramidale, Lucidum, Radiatum et Lacunosum-Moleculare. Les somas des cellules principales sont alignés dans la couche pyramidale.

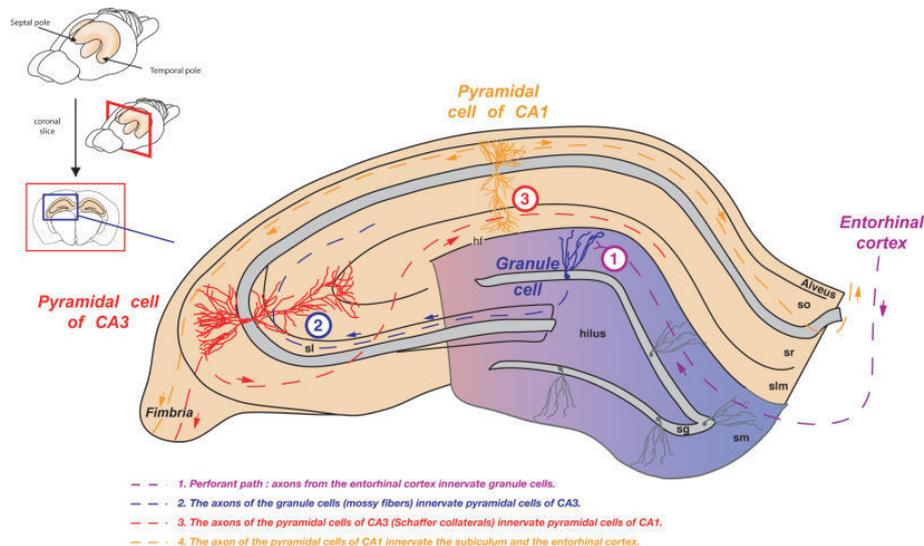


Figure I-1 Les différentes strates des champs ammoniens de l'hippocampe (Danglot et al 2006)

Fonctionnellement, l'hippocampe peut être schématisé par un circuit excitateur unidirectionnel tri-synaptique, en accord avec les données anatomiques (Andersen et al 1969). Les entrées excitatrices provenant de la couche superficielle II du cortex entorhinal pénètrent

INTRODUCTION

par la voie perforante à travers le subiculum pour former un premier relai au niveau des cellules granulaires du gyrus denté. Les axones non myélinisés des cellules en grain forment des fibres moussues reconnaissables par leurs larges varicosités qui vont contacter les cellules pyramidales dans le stratum Lucidum de l'aire CA3 pour établir un second relai. Le troisième relai est réalisé par les collatérales des axones des cellules pyramidales de CA3 (collatérale de Schaffer) qui pénètrent dans le stratum radiatum pour contacter les dendrites apicaux des cellules pyramidales de CA1. Ce circuit tri-synaptique excitateur $EC \rightarrow DG \rightarrow CA3 \rightarrow CA1$ se boucle finalement sur le cortex entorhinal par une projection des cellules de CA1 vers les couches profondes (V et VI) du cortex entorhinal directement ou en faisant un relai via le subiculum. Il est important de noter que des collatérales excitatrices sont établies entre les cellules pyramidales de la région CA3. Ces contacts récurrents peuvent être à l'origine de synchronisations anormales associées à des crises épileptiques (Johnston & Brown 1981, MacVicar & Dudek 1980, Miles & Wong 1986). Les interactions excitatrices entre cellules pyramidales de CA1 sont, quant à elles, beaucoup plus rares (Christian & Dudek 1988).

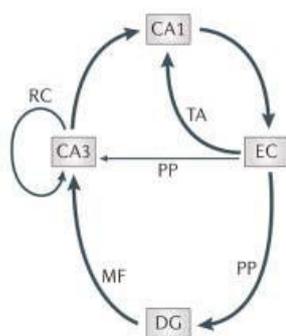


Figure I-2 Représentation schématique des boucles du réseau hippocampique (Goldberg & Coulter 2013)

En contrôlant la décharge des cellules principales, l'inhibition GABAergique organise l'activité des cellules principales, jouant un rôle essentiel dans le contrôle de l'excitabilité de ces réseaux hippocampiques excitateurs fortement récurrents.

I.2. Les interneurones GABAergiques forment une petite population de cellules très diverses

Les interneurones représentent 10 à 20% de l'ensemble des cellules de l'hippocampe (Freund & Buzsáki 1996). Ils présentent une grande diversité morphologique, biochimique et fonctionnelle, suggérant un continuum de phénotypes neuronaux (Markram et al 2004, McBain & Fisahn 2001). En effet, les enregistrements in vitro et in vivo ont permis d'identifier jusqu'à 21 sous-types d'interneurones dans les aires CA1 et CA3 après reconstruction anatomique et/ou en utilisant des marqueurs neurochimiques (Klausberger & Somogyi 2008, Parra et al 1998, Sik et al 1995, Somogyi & Klausberger 2005, Tricoire et al 2011).

Pour établir un catalogue raisonné de cette diversité cellulaire, et préciser les critères d'identification des différentes classes d'interneurones, un groupe d'expert a établi une liste de caractéristiques basée sur (DeFelipe et al 2013, Petilla et al 2008): (i) des critères morphologiques (ex: localisation du soma et de l'axone dans les différentes strates de l'hippocampe; positionnement de l'arborisation axonale relative au soma et son orientation parallèle ou antiparallèle; nature des cibles postsynaptiques; localisation des synapses périsonatiques (cellules en panier) ou sur les dendrites apicaux (cellules somatostatine)); (ii) l'expression de marqueurs biochimiques (expression de différentes protéines de liaison du calcium : parvalbumine, calrétinine et calbindine ; neuropeptides sécrétés : somatostatine (SST), peptide vasoactif intestinal (VIP), cholécystokinine (CCK)); (iii) des caractéristiques électrophysiologiques (excitabilité, accommodation, régularité des potentiels d'action) (DeFelipe et al 2013 , Kepecs & Fishell 2014, Markram et al 2004).

Néanmoins, cette complexité apparente des positionnements et des phénotypes des interneurones GABAergiques pourraient n'être que la conséquence de leur ontogénèse complexe et insertion tardive dans les réseaux hippocampiques (Lee et al 2014). Ainsi, il a été proposé récemment de simplifier la classification des interneurones à seulement trois groupes, en prenant en compte l'expression de trois marqueurs spécifiques différents selon leur origine développementale. En effet, les interneurones GABAergiques du cortex et de l'hippocampe sont générés dans les éminences ganglionnaires médiale (MGE) et caudale (CGE) sous-corticales, lors de deux vagues successives de neurogénèse, entre E9-E12 et E12-E16, respectivement (Anderson et al 1997 , Kepecs & Fishell 2014 , Miyoshi et al 2010). Après une longue et complexe migration, ils envahissent l'hippocampe à E14 (Danglot et al 2006 , Tricoire et al 2011) et mûrissent. La diversité des interactions moléculaires lors de cette migration engendrerait la gradation des phénotypes observés dans l'hippocampe (Kepecs & Fishell 2014).

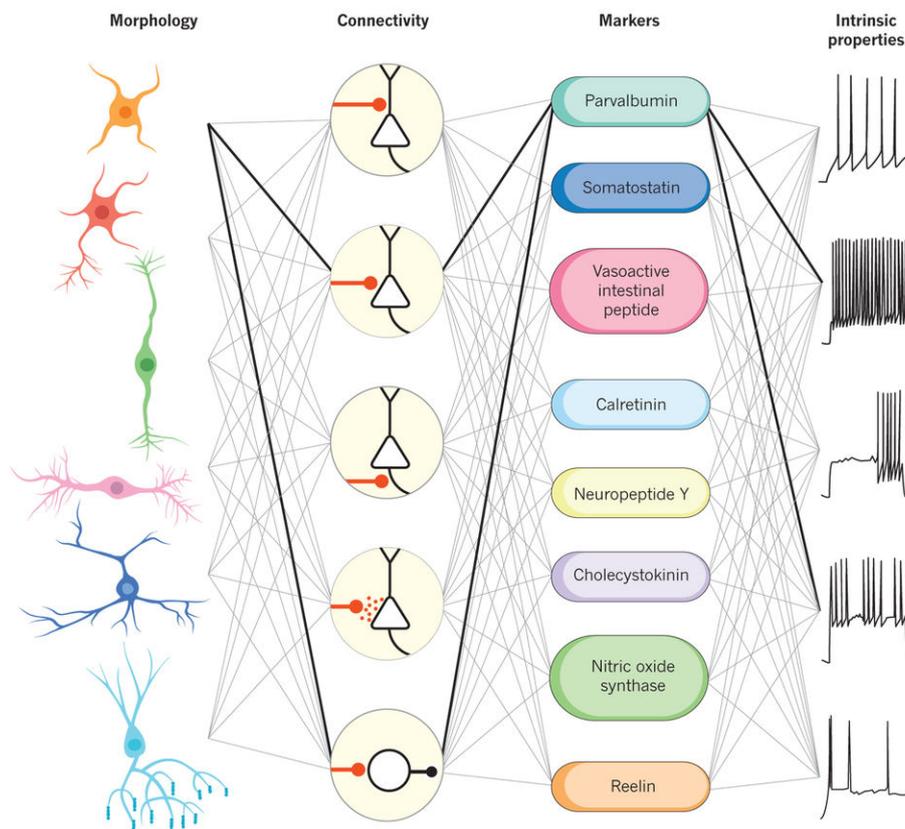


Figure I-3 Diversité multidimensionnelle des interneurones (Kepecs & Fishell 2014)

Il est maintenant établi que l'éminence ganglionnaire médiale (MGE) est la source de la majorité des interneurones GABAergiques exprimant la parvalbumine (PV⁺, 40%) et la somatostatine (SST⁺, 30%) (Rudy et al 2011, Tremblay et al 2016). Bien que les phénotypes des neurones issus de la CGE soient plus diversifiés (CCK⁺, CR⁺, VIP⁺ etc) (Tricoire et al 2011), la vaste majorité d'entre eux expriment le récepteur 5HT₃, alors qu'il n'est pas exprimé par les neurones issus de la MGE. En conséquence, il a été proposé de réduire la complexité phénotypique des interneurones corticaux à seulement 3 groupes : PV⁺, SST⁺ et 5HT₃⁺ (Rudy et al 2011, Tremblay et al 2016). Dans ce modèle les trois classes d'interneurones ont un rôle spécifique: les neurones PV⁺ et SST⁺ sont responsables respectivement de l'inhibition périsonmatique et dendritique reçue par les cellules principales alors que les sous-types de neurones 5HT₃⁺ ont un rôle neuromodulateur (Kepecs & Fishell 2014, Tremblay et al 2016).

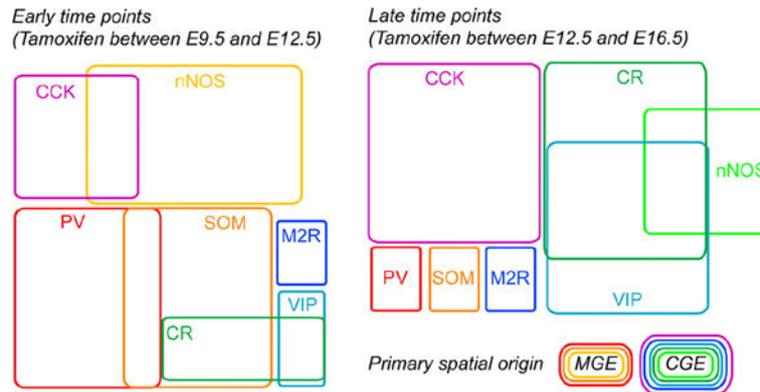


Figure I-4 Origine des principaux sous-types d'interneurones de l'hippocampe (Tricoire et al 2011)

Nous développerons ces différences dans le chapitre suivant en raison de l'utilisation de la souris EGFP:GAD65 durant ma thèse. En effet l'expression de la EGFP dans cette souris transgénique est spécifique des interneurones issues de la CGE (López-Bendito et al 2004, Tricoire et al 2011). En conséquence la majorité des interneurones GABAergiques (PV⁺, SST⁺) ne sont pas fluorescents dans des cultures d'hippocampe.

1.3. La souris EGFP:GAD65 : un modèle d'étude des interneurons de la CGE

Plusieurs stratégies ont été développées pour identifier un type d'interneurone spécifique par expression d'un marqueur fluorescent génétiquement encodé. Ainsi, l'utilisation de chromosomes artificiels bactériens (BAC) contenant tout ou parti de la séquence génomique d'un promoteur particulier a permis de créer des lignées de souris transgéniques exprimant la EGFP (ou une autre protéine fluorescente) dans les cellules où ce promoteur est actif (Zeilhofer et al 2005). L'expression du rapporteur peut varier considérablement entre chaque lignée, en fonction du nombre de copies insérées, de l'intégrité du promoteur et de son environnement chromosomique. Par exemple une expression ectopique de la EGFP, c'est à dire sans phénotype glycinergique, a été observée dans les noyaux profonds du cervelet de la souris GlyT2:EGFP qui marque les neurones glycinergiques dans la moelle épinière et le tronc cérébral (Husson et al 2014, Zeilhofer et al 2005).

La souris GAD65:EGFP a été utilisée très largement pour identifier les neurones GABAergiques qui sont minoritaires dans la plupart des structures corticales. Pour créer cette souris transgénique, Gábor Szabó et Ferenc Erdely ont utilisé un BAC contenant 5,5 kb de séquence génomique en amont des 6 premiers exons de la GAD65, une enzyme ubiquitaire de la synthèse du GABA (López-Bendito et al 2004). Cette région en 5' contient le promoteur proximal de la GAD65 et une partie des séquences régulatrices « enhancer » (Pan 2014, Skak & Michelsen 1999). Plusieurs lignées de souris transgéniques ont été générées présentant des patrons distincts d'expression de la EGFP, suggérant que la totalité du promoteur de la GAD65 n'était pas inclut dans le BAC ou, alternativement, que l'activation du promoteur était régulé par l'environnement génomique de son site d'insertion. Par exemple, les cellules de Purkinje du cervelet, bien que GABAergiques et exprimant la GAD65, n'expriment pas la EGFP dans le cervelet de ces souris.

Une caractérisation de la souris GAD65:EGFP montre que les neurones exprimant la EGFP sont issus de l'éminence ganglionnaire caudale (López-Bendito et al 2004, Tricoire et al 2010, Tricoire et al 2011). Toutes les cellules exprimant la EGFP sont positives pour le GABA et/ou la GAD67 et expriment les marqueurs classiques des interneurons de la CGE, à savoir la cholécystokinine (CCK⁺), la calrétinine (CR⁺) et la calbindine (CB⁺). Aucune cellule EGFP⁺ n'exprime la parvalbumine ou la somatostatine, en accord avec la présence de ces marqueurs limités aux neurones de la MGE.

Dans des tranches d'hippocampe à P14-21, la majorité des interneurons EGFP⁺ montrent une apparition retardée de la décharge des potentiels d'action autour du seuil de déclenchement et une décharge régulière avec une adaptation modérée de la fréquence à des potentiels plus dépolarisés (Müllner et al 2015, Wierenga et al 2011). Ces interneurons ont été regroupés en cinq sous-classes en fonction de leur mode de décharge. Les interneurons qui s'adaptent à apparition retardée, ont été subdivisées en trois sous-classes: (i) interneurons à décharge régulière, (ii) interneurons à décharge rapide (> 50 Hz); (iii) interneurons à décharge irrégulière. Un quatrième groupe d'interneurones ne présente pas d'apparition retardée de la décharge au seuil et présente une adaptation. Enfin, le cinquième groupe se compose des interneurons qui s'adaptent très fortement et cessent de décharger prématurément avant la fin de l'injection de courant.

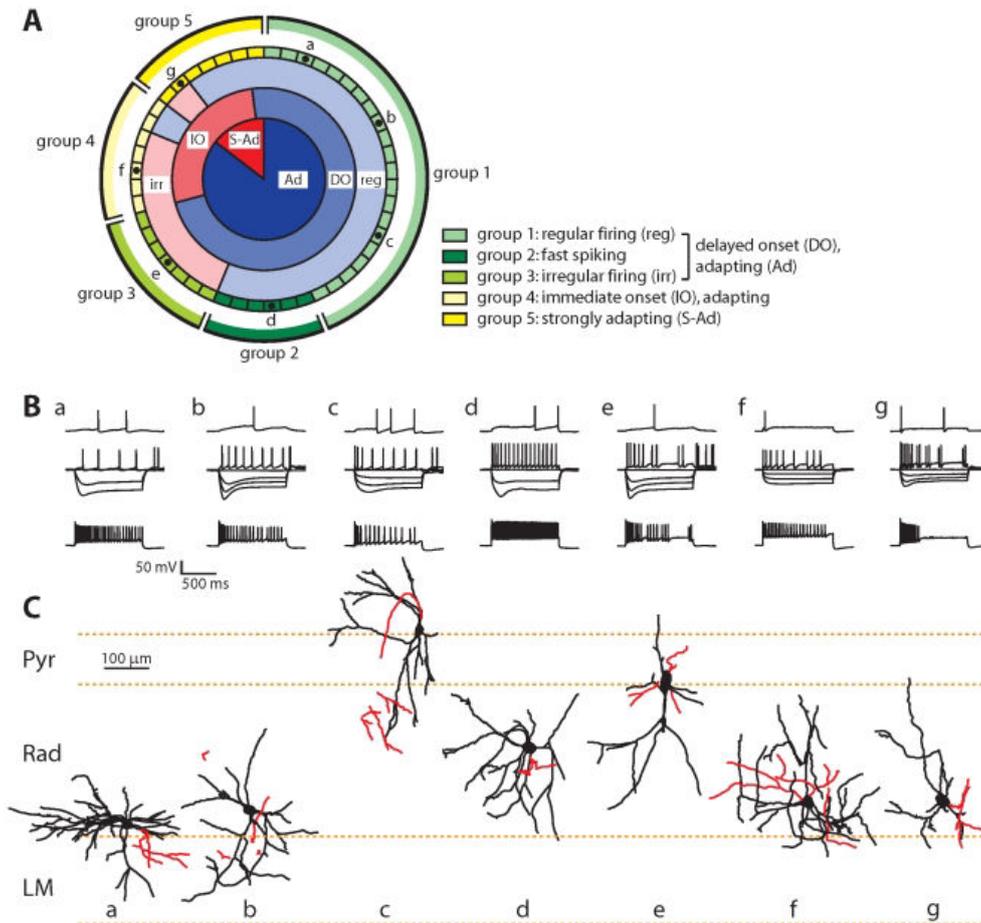


Figure 1-5 Les propriétés électrophysiologiques et morphologiques des interneurones GFP^+ en tranche d'hippocampe de souris $GAD65:eGFP$ (Wierenga et al 2011)

Les neurones GABAergiques représentent 6% du nombre total de neurones dans des cultures d'hippocampes prélevés sur des souris nouveau-nés (Beaudoin et al 2012, Kaech & Banker 2007), et cette proportion reste stable au cours du temps (Benson et al 1994a). Les cellules GABAergiques ont un corps cellulaire plus fusiforme ou de forme polygonale avec de larges dendrites sans épines. Elles présentent moins de dendrites primaires, avec des arbres plus allongés et des segments plus longs. Ces caractéristiques morphologiques sont similaires aux cellules GABAergiques in situ. Les varicosités GAD65 positives expriment la synapsine I (Benson et al 1994b) et contactent les somas et dendrites (la proportion sur les somas étant plus grande que celle sur les dendrites), ce qui suggère une forte inhibition périsonomatique et des spécialisations présynaptiques. Différents patrons de décharge ont pu être identifiés dans des cultures de neurones d'hippocampe de souris $GAD67-GFP$, où tous les neurones GABAergiques sont fluorescents, suggérant que les interneurones maintiennent un certain degré de diversité fonctionnelle en culture (Ikeda et al 2008).

En conclusion, les neurones GABAergiques dans des cultures d'hippocampe développent des traits morphologiques et des patrons de contacts synaptiques typiques des neurones GABAergiques in situ, suggérant un certain degré de différenciation.

I.4. Oscillations et réponses en fréquence des interneurones

Les enregistrements extracellulaires réalisés dans l'hippocampe montrent des oscillations dans les bandes de fréquence thêta (~7 Hz) et gamma (~40 Hz) (Bartos et al 2007, Buzsáki 2002, Csicsvari et al 2003, Lisman & Jensen 2013). Ces différents rythmes résultent d'une synchronisation des décharges de potentiels d'action des cellules pyramidales par une inhibition synaptique antérograde (feed-forward inhibition) périsomatique des cellules en panier (basket cells : BC), qui délimite précisément leur fenêtre d'excitabilité (Cobb et al 1995, Freund & Buzsáki 1996, Pouille & Scanziani 2001). La connectivité très élevée des BC leur permet de synchroniser la décharge de larges ensembles de cellules principales (Harris et al 2003).

Le contrôle inhibiteur périsomatique exercé par les BC est certainement le mieux caractérisé, fonctionnellement et anatomiquement (Hu et al 2014). En moyenne, chaque BC contrôle 1500-2000 cellules pyramidales et 60 autres interneurones, établissant 5 à 7 contacts synaptiques. La densité des boutons axonaux des interneurones, 21 à 28 boutons/ 100 μm d'axone, est similaire pour les différentes classes d'interneurones. En conséquence, avec une arborisation axonale des BC pouvant atteindre 55 μm (Sik et al 1995), le nombre estimé de varicosités dépasse 10000, chacune contenant environ 1000 vésicules. La probabilité de libération de ces synapses inhibitrices est élevée dans des tranches d'hippocampe : entre 0,92 et 0,66 aux synapses BC->PC, (Lee et al 2014); et de 0,5 aux synapses BC->GC, avec une moindre adaptation que les cellules principales durant les trains à haute fréquence (Kraushaar & Jonas 2000b). In vivo, la fréquence de décharge des BC, qui peut atteindre 90 à 200 Hz durant les « short waves ripples », est de 18 ± 12 Hz pendant les rythmes thêta (Forro et al 2015), soit un ordre de grandeur au-dessus des cellules pyramidales.

Mis ensemble, ces caractéristiques prédisent une libération synaptique de l'ordre de 90000-165600 vésicules/seconde pour chaque BC. Les varicosités distribuées le long de l'axone peuvent être considérées comme des unités métaboliquement isolées (à court terme) en raison de leur éloignement du soma. Dans ces conditions, le maintien d'une inhibition à haute fréquence repose sur la capacité des synapses à recycler et à réutiliser les différents constituants (vésicules, appareils protéiques d'exocytose et d'endocytose, neurotransmetteurs), quel que soit le régime imposé par l'activité du réseau.

Mon travail de thèse a porté sur la caractérisation de ces mécanismes présynaptiques de recyclage en fonction de l'activité des interneurones GABAergiques dans des cultures primaires d'hippocampe de souris transgénique GAD65:EGFP.

II. Trois cycles maintiennent la libération vésiculaire de neurotransmetteurs

Les interneurons inhibiteurs de l'hippocampe sont capables de synchroniser et maintenir une libération vésiculaire de GABA à haute fréquence (>10Hz) à des milliers de terminaisons axonales. Une telle activité synaptique nécessite de pouvoir recycler localement les différents éléments concourant à une exocytose de GABA évoquée par un potentiel d'action. En effet, les varicosités, qui forment des synapses en passant distribuées tout au long d'axone très ramifié, peuvent être situées à de longues distances du corps cellulaire. De petite taille ($0,3 \mu\text{m}^3$) et contenant seulement un millier de vésicules, les synapses ont besoin d'au moins trois cycles pour reformer un nouveau site de libération contenant une vésicule remplie en neurotransmetteurs et maintenir ainsi l'intensité de la transmission inhibitrice phasique.

Le **cycle vésiculaire** est commun à tous les neurotransmetteurs. Il découle de la découverte d'une endocytose compensatrice à l'exocytose (Heuser et Reese 1974) qui permet de reformer de nouvelles vésicules. Nous évoquerons succinctement 7 étapes du cycle vésiculaire qui a été décrit dans de nombreuses revues (Jahn & Fasshauer 2012, Rizzoli 2014, Sudhof 2004).

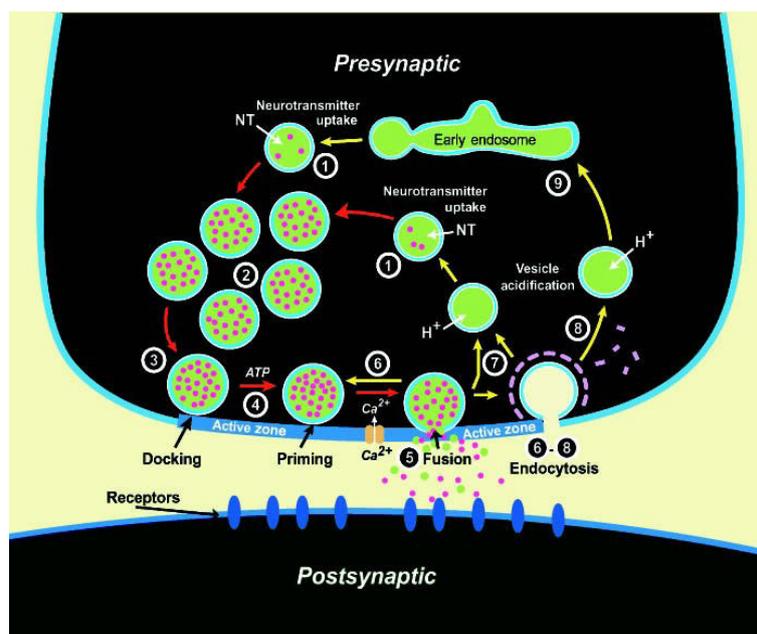


Figure II-1 Le cycle vésiculaire (Sudhof 2004)

Le **cycle des neurotransmetteurs** permet une réutilisation du GABA et du glutamate libérés dans la fente synaptique, soit directement dans la terminaison par recapture et néosynthèse, soit indirectement via une navette transcellulaire avec les astrocytes après une transformation du GABA et du glutamate en glutamine (Edwards 2007). Ce cycle des neurotransmetteurs met en jeu des transporteurs pour le GABA, le glutamate et la glutamine couplés au Na⁺ et présents sur les membranes neuronales et gliales.

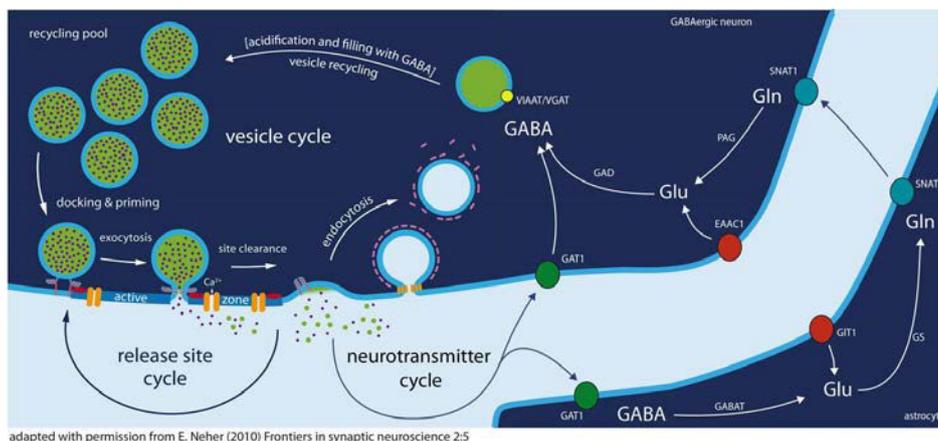


Figure II-2 La triade du recyclage, adapté de (Neher 2010)

Le **cycle des protéines de la machinerie d'exocytose et endocytose** nécessaire à la reformation du « readily releasable pool » (RRP) de vésicules est certainement le moins bien caractérisé. Toutefois la protéomique des terminaisons axonales suggère que certaines protéines sont présentes en quantité limitante, ce qui est le cas de certaines protéines d'endocytose, ou qu'elles nécessitent d'être désassemblées pour être réutilisées, ce qui est le cas des protéines SNAREs après fusion et des manteaux de clathrine après endocytose. La dynamique des pools de vésicules immédiatement libérables, mobilisables ou non mobilisables, joue un rôle essentiel pour maintenir la transmission inhibitrice aux différentes fréquences de décharge des interneurons. Des évidences récentes suggèrent que ces pools ne sont pas structurés anatomiquement mais fonctionnellement et qu'une large population de vésicules ne sert qu'à maintenir localement le matériel protéique nécessaire au cycle vésiculaire.

Ensemble ces trois cycles maintiennent une capacité de libération de GABA stationnaire aux synapses inhibitrices pendant des trains de potentiel d'action à haute fréquence.

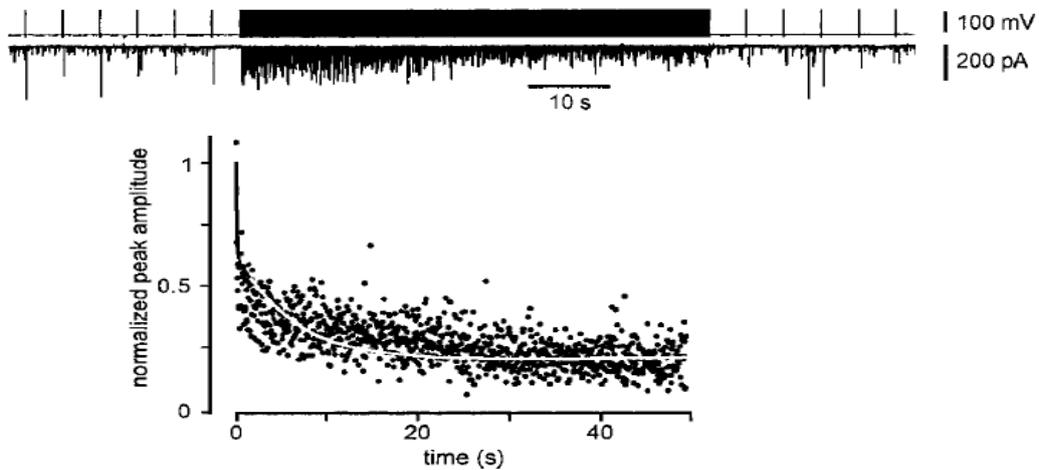


Figure II-3 Dépression des IPSCs à la synapse cellule en panier-cellule granulaire du gyrus denté dans des tranches d'hippocampe de rat durant un train de 1000 PAs à 20 Hz (Kraushaar & Jonas 2000b)

Toute altération de l'un de ces trois cycles est susceptible d'entraîner un dysfonctionnement de la synapse qui peut se refléter soit présynaptiquement comme une diminution de la probabilité de libération, soit postsynaptiquement comme une diminution de l'activation des récepteurs GABA. Ces trois cycles seront développés dans les chapitres III à V.

III. Le cycle vésiculaire

III.1. Etape 1 : le remplissage en neurotransmetteur

La quantité de GABA stockée dans les vésicules synaptiques n'est pas connue et cette étape initiale du cycle vésiculaire est certainement l'une des moins bien caractérisée ; elle sera décrite plus en détail dans le chapitre 3. Nous mentionnerons simplement que les vésicules synaptiques ont un diamètre remarquablement homogène, de l'ordre de 41,6 nm pour le diamètre externe, soit un volume luminal de $\sim 2 \cdot 10^{-20}$ L (Takamori et al 2006). En conséquence chaque molécule concentrée dans la lumière d'une vésicule représente un incrément de concentration de $\sim 80 \mu\text{M}$, soit $\sim 160 \text{ mM}$ pour une accumulation de 2000 molécules de GABA, l'ordre de grandeur généralement postulé pour l'exocytose d'une vésicule. Le GABA est accumulé dans les vésicules synaptiques par le transporteur vésiculaire VIAAT (Vesicular Inhibitory Amino Acid Transporter (Sagné et al 1997)), ou VGAT (Vesicular GABA transporter (McIntire et al 1997)).

III.2. Etapes 2 à 5: le recrutement des vésicules à la zone active jusqu'à l'exocytose

L'exocytose d'une vésicule à la zone active correspond à la fusion des deux membranes ce qui conduit à la formation d'un pore libérant le contenu en neurotransmetteur dans la fente synaptique. L'exocytose est un phénomène cellulaire très général qui se produit dans les différents compartiments cellulaires. La fusion des membranes n'est pas un phénomène spontané car il faut vaincre une barrière énergétique importante ce qui nécessite une source d'énergie. L'association de trois protéines SNAREs (acronyme pour Soluble NSF Attachment Protein **R**eceptor) situées sur les membranes plasmique et vésiculaire aboutit à la formation d'une superhélice thermodynamiquement favorable qui permet le rapprochement nécessaire à la fusion des deux membranes. L'exocytose aux synapses présente deux singularités : la première est d'être strictement dépendante du calcium; la deuxième est sa rapidité puisque quelques centaines de microsecondes séparent l'entrée présynaptique de calcium de l'activation postsynaptique des récepteurs. Ces deux propriétés sont contrôlées par des protéines spécifiques du système nerveux central : la synaptotagmine et la complexine.

L'exocytose vésiculaire résulte de la formation d'une superhélice (« coiled-coil ») par l'association de 4 motifs SNARE portés par 3 protéines SNAREs présentes sur les vésicules (ν -SNARE) et la membrane cible (t-SNARE). On désigne par SNARE une super famille de 36 protéines chez l'homme, contenant une séquence conservée de 60-70 acides aminés avec 8 répétitions de 7 acides aminés qui constitue le motif SNARE (Sudhof 2004). La structure du complexe SNARE a été déterminée (Sutton et al 1998). On distingue les quatre SNAREs par la présence d'une glutamine (Qa, Qb, Qc) ou une arginine (R) en position centrale du complexe.

III.2.1. Les trois protéines SNARES impliquées dans l'exocytose vésiculaire

La **synaptobrevine 2** (VAMP2 ; Vesicle Associated Membrane Protein 2 ; syb2) est la protéine la plus abondante des vésicules synaptiques, avec 70 copies/vésicule (Takamori et al 2006). Cette v-SNARE est composée de 118 acides aminés avec un N-term luminal. Son domaine C-term est transmembranaire. Elle possède un motif R-SNARE. Elle est très abondante dans les neurones et les cellules neuroendocrines; elle est présente en faible quantité dans des tissus non neuronaux. Les souris KO syb2^{-/-} meurent à la naissance (Schoch et al 2001), à cause d'une libération vésiculaire évoquée quasi absente. Les neurones syb2^{-/-} conservent néanmoins un niveau faible de libération spontanée. Aucune autre SNARE étroitement liée à la syb2 comme la synaptobrevine 1 (Trimble et al 1990) ou la cellubrevin/VAMP3 (McMahon et al 1993) ne peut se substituer à sa carence dans les souris syb2^{-/-}. Mais la libération vésiculaire peut être restaurée par une surexpression de syb2 ou VAMP3 dans les neurones d'hippocampes en culture issus de souris syb2^{-/-} (Deak et al 2006).

La **syntaxine 1** (stx1) est une t-SNARE (target-membrane SNARE) composée de 288 acides aminés avec un motif Qa-SNARE. Elle est très abondante dans les neurones et les cellules neuroendocrines; elle n'est pas présente dans les cellules non neuronales. La syntaxine 1 a deux isoformes, 1A et 1B, de 35 kDa avec 84% d'homologie (Bennett et al 1992). Elle est concentrée à la membrane plasmique des sites synaptiques. Les souris KO stx1A^{-/-} sont viables (Fujiwara et al 2006) et n'affichent aucune différence en apparence par rapport aux souris sauvages. En culture, la transmission synaptique est normale dans les neurones hippocampiques stx1A^{-/-}. Cependant la potentialisation à long terme est déficiente dans les tranches d'hippocampe stx1A^{-/-}. Les souris KO stx1B^{-/-} meurent dans les deux semaines postnatales alors que le double KO stx1A^{-/-} et stx1B^{-/-} est létal au stade embryonnaire (Mishima et al 2014). Le KO conditionnel de la syntaxine 1B exprimé dans un fond génétique stx1A^{-/-} montre que la syntaxine est nécessaire à la viabilité des neurones, ainsi qu'au docking et à la fusion des vésicules (Vardar et al 2016). La syntaxine 1A peut être dans un état fermé et passer à un état ouvert permettant son association au complexe SNARE. Par deux modes d'interaction différents selon l'état de la syntaxine 1A, Munc18 peut la lier et permet la régulation du passage d'état fermé à ouvert (Dawidowski & Cafiso 2013).

La **SNAP-25** (25 kDa synaptosome-associated protein) est composée de 208 acides aminés avec deux motifs SNARES (Qbc) reliés par une région flexible contenant un cluster de 4 résidus cystéines palmitoylés permettant de l'ancrer à la membrane. Les souris KO SNAP25^{-/-} n'ont jamais pu être obtenues par croisement entre hétérozygotes SNAP25^{+/-}, suggérant un phénotype embryonnaire létal (Washbourne et al 2002). La libération évoquée est sévèrement détériorée mais un faible niveau de libération spontanée est maintenu dans des cultures d'hippocampe et des tranches de cortex obtenues à partir d'embryons SNAP25^{-/-}.

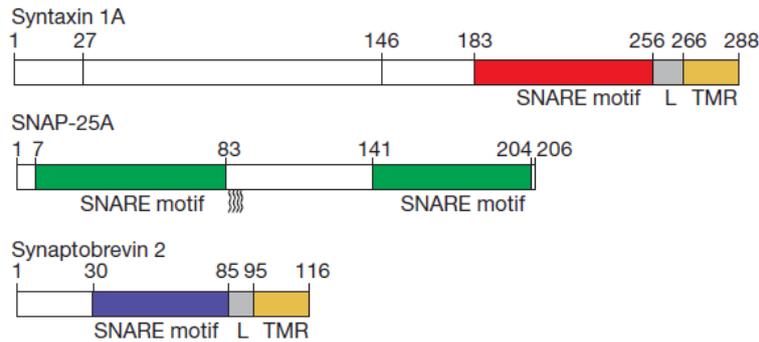


Figure III-1 Représentation schématique des protéines SNAREs impliquées dans l'exocytose vésiculaire (Stein et al 2009)

III.2.2. La fusion membranaire

Chaque fusion dans les différents compartiments membranaires met en jeu un set spécifique de 4 motifs SNAREs donnés par 3 ou 4 protéines SNAREs ; chaque membrane destinée à fusionner doit contenir au moins 1 SNARE comme ancrage membranaire. Dans le complexe neuronal SNARE formé par les trois protéines synaptobrevine 2, syntaxine 1A et SNAP-25, les motifs SNAREs adoptent une structure en hélice alpha, s'alignent parallèlement et forment une super hélice twistée (Jahn et al 2003). Elles forment un complexe « trans » médié par les motifs SNAREs qui sont progressivement assemblés depuis leur N-terminus vers leur C-terminus pour clamer les deux membranes ensemble. L'énergie libérée durant cet assemblage est probablement utilisée pour passer la barrière de fusion. Pendant la fusion, le complexe passe de conformation « trans » à conformation « cis », qui est exceptionnellement stable; son désassemblage nécessite l'action d'une AAA-ATPase et de l'ATP.

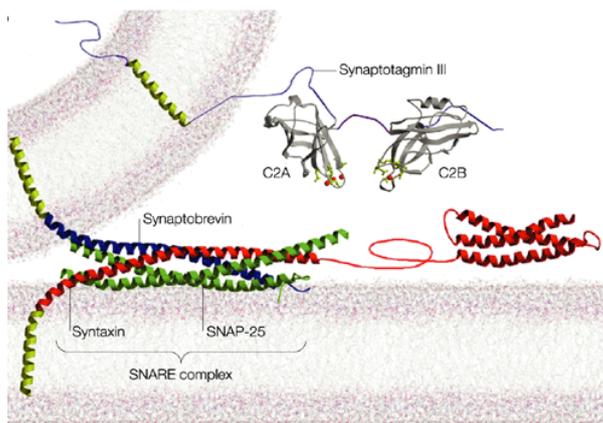


Figure III-2 Modèle moléculaire des composants de l'appareil de fusion présumé (Chapman 2002)

Après la fusion membranaire, les SNAREs sont toutes dans la membrane plasmique en conformation cis et ne peuvent pas se désassembler sans l'intervention de l'ATPase NSF (N-ethylmaleimide-Sensitive Factor) (Söllner et al 1993). C'est un membre de la famille des AAA-protéines (ATPases Associated with others Activities) qui nécessite un cofacteur SNAP (Soluble NSF Attachment Protein). SNAP lie d'abord le complexe cis-SNARE puis recrute NSF et exerce

son activité ATPase. L'hydrolyse de l'ATP induit un changement conformationnel majeur qui permet le désassemblage du complexe et libère ses trois constituants qui seront réutilisés. La protéine NSF charge ainsi les protéines SNAREs monomériques en énergie conformationnelle, qui sera dissipée lors de la fusion par la formation du complexe SNARE.

La protéomique des terminaisons synaptiques montrent que les SNAREs sont présentes en grand nombre de copies, de 20100 à 26000, et ne sont donc pas limitantes pour l'exocytose qui ne requiert la formation que d'un à trois complexes SNAREs (Wilhelm, Mandad et al. 2014). De la même façon, les protéines interagissant avec les SNAREs sont retrouvées avec un grand nombre de copies, de un à quelques milliers.

III.2.3. Contrôle de la fusion : rôle des synaptotagmines et de la complexine

Les **synaptotagmines 1 et 2** (syt1 et syt2) forment une famille de protéines vésiculaires contenant 15 membres chez les mammifères. Ces protéines possèdent un domaine N-term luminal, un seul segment transmembranaire, une région centrale et deux domaines cytosoliques de liaison du calcium C2A et C2B.

Le KO syt1^{-/-} entraîne un défaut sévère de la transmission synaptique (Geppert et al 1994), cette protéine est essentielle pour le déclenchement de la libération rapide mais pas pour la fusion en elle-même. La syt1 agit comme un senseur calcique permettant l'exocytose vésiculaire rapide.

Le nombre de SNARE/synaptotagmine nécessaire et le mécanisme moléculaire ultime couplant l'exocytose à l'entrée de calcium ne sont pas définitivement établis. Plusieurs modèles sont débattus sur la base d'expérience de fusion dans des systèmes reconstitués. Pour pouvoir les valider, il faudrait tenir compte des encombrements stériques des différents complexes protéiques et de leur organisation tri dimensionnelle. Ces différents modèles s'accordent néanmoins sur le fait que les syt 1 et 2 sont les senseurs de calcium contrôlant l'exocytose (Fernandez-Chacon et al 2001). Ces protéines lient 5 ions Ca²⁺ par leurs domaines C2A et C2B. Ces domaines sont chargés négativement et la liaison du Ca²⁺ leur permet d'être plus amphiphilique et de s'insérer dans la membrane en interagissant avec les phospholipides et les protéines SNAREs (Pang et al 2006).

La vitesse d'exécution de l'exocytose suppose qu'une faible barrière d'énergie doit être franchie en présence de Ca²⁺. Il a été proposé que la liaison de la complexine sur le complexe SNARE permettrait d'arrêter son assemblage lorsque celui-ci atteint 50% (Reim et al 2001). Il existe deux complexines (cpx) chez les mammifères, cpxI et cpxII. Les souris cpxII^{-/-} ne montrent pas de changements phénotypiques évidents. En revanche, les souris cpxI^{-/-} développent une ataxie forte, souffrent de crises sporadiques, sont incapables de se reproduire, et meurent dans les 2 à 4 mois après la naissance. Les doubles mutants cpxI/II^{-/-} meurent en quelques heures après la naissance. Le double KO cpxI/II^{-/-} montre en culture un phénotype similaire au KO syt1^{-/-} avec une suppression de l'exocytose synchrone rapide et une augmentation de l'exocytose spontanée.

Le rôle exact de la **complexine** est débattu car cette protéine a un rôle facilitateur ou inhibiteur pour l'exocytose selon les espèces et le type de fusion vésiculaire (évoquée ou spontanée)(Trimbuch & Rosenmund 2016). La structure de la complexine comporte deux hélices (accessoire et centrale) qui peuvent interagir avec le complexe SNARE partiellement

assemblé et empêcher la fusion en bloquant l'avancement de la super hélice. La liaison du calcium sur les domaines C2 de la synaptotagmine permettrait son interaction avec le complexe SNARE et les phospholipides de la membrane, ce qui délogerait la complexine et déclencherait l'enroulement final de la super-hélice qui conduit à l'ouverture du pore de fusion (Maximov et al 2009, Tang et al 2006, Trimbuch et al 2014).

Munc18 est une protéine SM (Sec1/Munc18 like protein) qui participe et qui est essentielle pour la réaction de fusion dépendante des protéines SNAREs (Gerber et al 2008, Khvotchev et al 2007, Rizo & Sudhof 2012). Elle contribue à l'initiation de l'assemblage du complexe (Rathore et al 2010) et sa délétion dans les souris KO Munc18^{-/-} bloque complètement la fusion de la vésicule synaptique durant l'exocytose (Verhage et al 2000). Munc18-1 peut lier les complexes SNAREs complètement assemblés en plus de la syntaxine 1A seule (Dulubova et al 2007). Au cours de l'exocytose, Munc18-1 se lie d'abord à la syntaxine 1A qui se trouve dans une conformation fermée ce qui peut aider à l'assemblage des complexes SNAREs, mais en même temps imposer une barrière d'énergie pour la formation du complexe. Cela conduit à la formation d'un hypercomplexe contenant Munc18-1 et le complexe SNARE par un mécanisme qui nécessite l'ouverture de la syntaxine-1 et est probablement assisté par d'autres facteurs tels que Munc13 (Ma et al 2011).

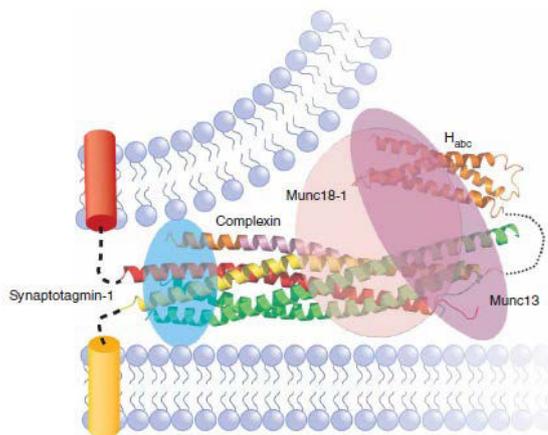


Figure III-3 Schéma illustrant l'idée que Munc18-1 (rose clair), Munc13 (rose foncé), la complexine (ruban orange et rose) et la synaptotagmine-1 (bleu) se lient au complexe SNARE (SNAP25 vert, syb2 rouge, stx1 jaune) (Rizo & Rosenmund 2008)

Les **CSP α** et les **synucléines** sont deux types de molécules chaperonnes qui supportent la fonction des protéines SNAREs. Les CSP α forment un complexe avec les protéines Hsc70 et SGT (Tobaben et al 2001) sur la vésicule synaptique pour empêcher le repliement de SNAP25 et permettre à SNAP25 de s'engager dans le complexe SNARE (Sharma et al 2011). Les synucléines sont liées aux phospholipides et à la VAMP2 et lient le complexe SNARE pour augmenter leur assemblage (Burré et al 2010). La perte de CSP α entraîne une neurodégénération à cause du repliement de SNAP25 et d'une diminution de la formation des complexes SNAREs (Sharma et al 2012). Cette neurodégénération peut être contrecarrée par des augmentations modestes du niveau d' α -synucléine, qui améliorent indirectement l'assemblage des complexes SNAREs (Bendor et al 2013, Chandra et al 2005).

La formation partielle du complexe SNARE est suffisante pour le docking des vésicules mais la formation complète est requise pour le priming et la fusion des vésicules (Vardar et al 2016). Dans les liposomes, un seul complexe SNARE est nécessaire pour la fusion (van den Bogaart et al 2010). Dans les cellules chromaffines, la libération rapide nécessite au moins trois complexes SNAREs (Mohrmann et al 2010). Deux molécules synaptobrevine 2 et donc deux complexes SNAREs semblent suffisants pour la fusion d'une vésicule pendant la transmission synaptique rapide dans les cultures de neurones d'hippocampe (Sinha et al 2011).

III.2.4. La zone active

De multiples évidences suggèrent qu'une fraction seulement des vésicules est « mobilisable » pour être recrutée à la membrane plasmique (thetering). Ces vésicules sont ensuite arrimées à la zone active au niveau d'un site de libération (docking) où elles deviennent compétentes (priming, superpriming) pour une exocytose synchrone avec le bref transitoire de Ca^{2+} évoqué par l'activation de canaux calciques voltage-dépendants lors du passage d'un potentiel d'action. Il est généralement admis que la probabilité de libération pour un potentiel d'action est proportionnelle au nombre de vésicules primées au niveau de la zone active, structure présynaptique dense en microscopie électronique, biochimiquement insoluble, formant un disque d'un diamètre de 200-500 nm dans les synapses centrales des vertébrés (Südhof 2012).

La zone active est enrichie en protéines SNAREs (syntaxine 1A, SNAP-25), en canaux calciques et contient cinq protéines clés : Munc13, RIM (Rab3 interacting molecule), RIM-BP (RIM-binding protein), α liprine et les protéines ELKS qui permettent de docker et primer les vésicules synaptiques, de recruter les canaux calciques près des vésicules afin d'assurer une colocalisation efficace au site de libération de ces éléments pour permettre une transmission synaptique fiable.

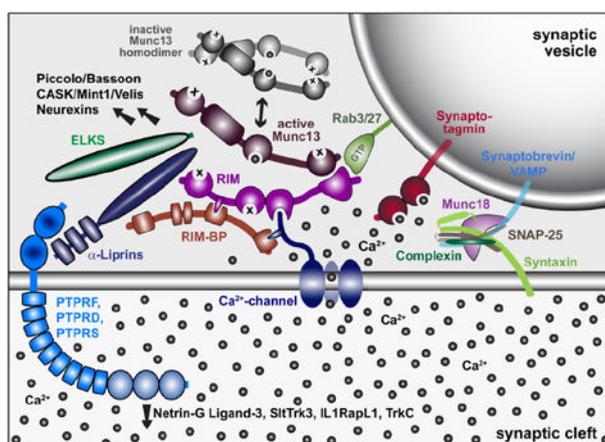


Figure III-4 Modèle moléculaire du complexe protéique de la zone active et de sa relation avec la machinerie de fusion des vésicules synaptiques, les canaux calciques et les molécules synaptiques d'adhésion cellulaire (Südhof 2012)

Munc13 est l'orthologue des mammifères du gène *unc13* isolé dans un crible génétique chez *C. Elegans* (Brose et al 1995). Munc13 peut exister sous la forme d'un homodimère inactif ou sous une forme monomérique, active, qui se lie à Rab3 et à RIM (Dulubova et al 2005). Munc13 est essentiel au priming des vésicules dépendant du calcium et de RIM (Augustin et al 1999). Elle intervient dans la transition du complexe syntaxine-Munc18 dans la position fermée à la position ouverte, pour promouvoir l'assemblage du complexe SNARE (Ma et al 2011). La délétion de Munc13 bloque l'exocytose des vésicules synaptiques dans les autapses formées par des neurones hippocampaux (Varoqueaux et al 2002).

RIM (Rab3-interacting molecule) lie des petites protéines vésiculaires liant le GTP : Rab3 et Rab27, permettant ainsi le docking des vésicules. Les protéines RIM régulent l'activité de priming de Munc13 (Deng et al 2011). Les canaux calciques sont liés par les protéines RIM (Kaeser et al 2011) et par les protéines RIM-BP (Hibino et al 2002). Les protéines RIM et RIM-BP sont liées entre elles. Le KO des protéines RIM chez la souris cause une perte des canaux calciques à la zone active présynaptique et diminue l'influx de calcium dans les cultures de neurones d'hippocampe (Kaeser et al 2011), de même que le KO RIM-BP chez la drosophile.

III.3. Etape 6 : L'endocytose

Avec le mécanisme moléculaire de la fusion et le « Kiss and Run », le mécanisme d'endocytose à la synapse est un sujet âprement débattu et dont le dogme central vient d'être récemment remis en cause. L'endocytose est compensatrice à la fusion membranaire car elle permet de maintenir la surface membranaire constante et de reconstituer le pool de vésicules synaptiques compétentes pour la libération (Dittman & Ryan 2009) (Saheki & De Camilli 2012). En effet, après fusion complète, les différents constituants vésiculaires sont récupérés par un des différents mécanismes d'endocytose identifiés à ce jour, selon le niveau d'activité.

Les premières études à la jonction neuromusculaire de grenouille (Heuser & Reese 1973) et les travaux ultérieurs sur les synapses de mammifères ont suggéré que la reformation des vésicules synaptiques se faisait par une endocytose médiée par la clathrine et les facteurs AP-2 à partir de la membrane plasmique (Dittman & Ryan 2009, Granseth et al 2006, Kim & Ryan 2009, McMahon & Boucrot 2011, Saheki & De Camilli 2012).

Cependant des données récentes montrent que l'endocytose peut avoir lieu indépendamment de la clathrine, par une endocytose ultrarapide impliquant des invaginations vacuolaires de la membrane plasmique (Watanabe et al 2013b) ou par une récupération en masse de la membrane (Cheung & Cousin 2013).

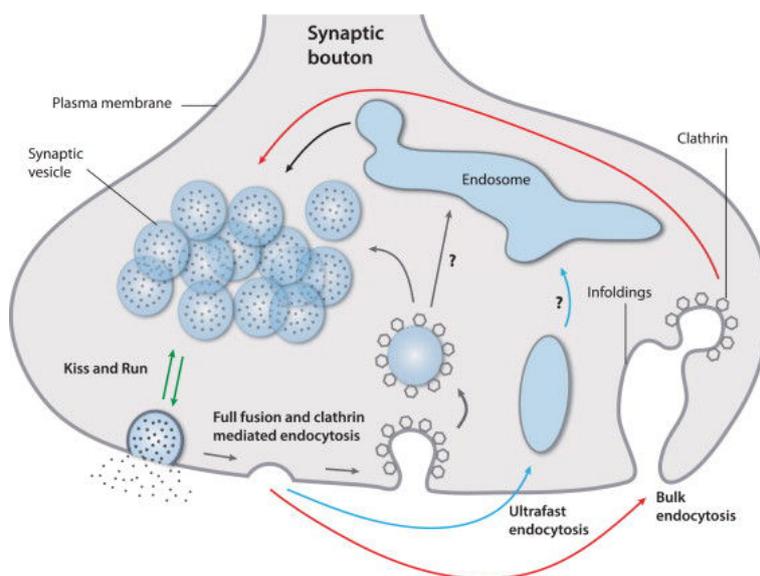


Figure III-5 Voies principales d'endocytose

III.3.1. L'endocytose dépendante de la clathrine

Jusqu'à très récemment, l'hypothèse la plus communément défendue dans la littérature du cycle vésiculaire était que l'endocytose médiée par la clathrine assure l'essentielle du recyclage des vésicules dans les synapses centrales en réponse à des stimulations physiologiques. L'importance de cette voie est démontrée par des études où des composants de cette voie sont mutés comme l'adaptine qui permet le recrutement de la dynamine (González-Gaitán and Jäckle 1997), l'amphiphisine qui interagit avec la dynamine (Shupliakov, Löw et al. 1997) ou directement la clathrine (Kasproicz et al 2008, Sato et al 2009).

L'endocytose dépendante de la clathrine est une voie lente nécessitant une vingtaine de secondes pour régénérer une vésicule ; elle est donc dominante lors d'activité neuronale à faible fréquence. Dans des cultures de neurones d'hippocampe, le recyclage des vésicules synaptiques a été mesuré après des PA simples, grâce à une sonde pHluorin fusionnée à la synaptophysine, protéine des vésicules synaptiques (Granseth et al 2006, Zhu et al 2009) . Un seul mode d'endocytose a été trouvé avec une constante de temps de 15 secondes. L'inhibition de l'activité de la clathrine élimine l'endocytose dans cette étude (Granseth, Odermatt et al. 2006), ce qui est en faveur d'une fusion totale lors de l'exocytose suivie par une endocytose dépendante de la clathrine comme mécanisme principal de recyclage des vésicules. Une autre étude montre qu'une fraction importante des vésicules marquées par une sonde FM présentent une fusion totale puisqu'elles perdent la totalité de leur contenu FM (Chen et al 2008). La fusion totale est également en accord avec la possibilité d'étiqueter les vésicules recyclantes par des anticorps (Willig et al 2006).

Une étude quantitative par protéomique a permis de déterminer la composition moyenne des synaptosomes en clathrine (4000 molécules) et dynamine (2300 molécules) (Wilhelm et al 2014). Puisqu'au moins 150 à 180 copies de clathrine sont nécessaires à l'endocytose d'une seule vésicule, la totalité de la clathrine à la synapse ne permet l'endocytose simultanée que de 7% des vésicules totales. La totalité de la dynamine à la synapse est suffisante pour recycler 11% des vésicules puisque 52 copies sont nécessaires pour former les deux anneaux adjacents nécessaires à un événement de pincement (Wilhelm et al 2014). Les SNAREs endosomales qui forme des complexes tétramériques contenant une copie de chaque SNARE, sont encore moins abondantes (50 à 150 copies) que les cofacteurs d'endocytose. Ces éléments suggèrent que l'endocytose dépendante de la clathrine peut devenir rapidement limitante pendant des périodes d'activité intense.

III.3.2. Le « Kiss and Run »

L'utilisation de sondes fluorescentes membranaires pouvant être internalisées lors du recyclage des vésicules comme le FM1-43 a mis en évidence un mode rapide de recyclage, coexistant avec l'endocytose dépendante de la clathrine dans les terminaisons de neurones d'hippocampe (Klingauf et al 1998). Dans ce mode de recyclage rapide, l'ouverture d'un pore de fusion permettrait un bref échange avec le milieu extracellulaire avant de se refermer, laissant la possibilité de multiples événements d'exocytose partielle avant la fusion complète (Alabi & Tsien 2013, Zhang et al 2009).

Dans les neurones d'hippocampe en culture, des fusions multiples des vésicules synaptiques compatibles avec le mode kiss-and-run ont été imagées avec la pHluorin (Gandhi & Stevens

2003) et les sondes FM (Aravanis et al 2003). En accord avec ces résultats, une quantité importante de sonde FM est conservée dans les vésicules de recyclage (Harata et al 2006).

Des évidences supplémentaires pour le kiss-and-run ont été obtenues avec des nanoparticules (quantum dots) qui peuvent être séquestrés dans les vésicules et dont la fluorescence est sensible au pH (Zhang et al 2009). Le suivi de la fluorescence des vésicules ainsi marquées par des quantum dots permet de distinguer les événements d'exocytose partielle et totale. Cette étude suggère que les mêmes vésicules synaptiques peuvent participer à plusieurs événements de kiss-and-run avant de produire une fusion totale.

Un autre argument important pour le kiss-and-run est la mesure de capacitance dans le calyx de Held qui montre une endocytose très rapide (Sun et al 2002, Wu et al 2005). Les mesures de capacitance offrent l'avantage d'une résolution temporelle plus élevée que l'imagerie vésiculaire. Cependant, en utilisant la même technique et un inhibiteur de la fusion (toxine botulinique), il a été suggéré que certains transitoires rapides de capacitance n'étaient pas liées à la transmission synaptique (Yamashita et al 2005). D'autres études fournissent des arguments en faveur de l'endocytose rapide (He et al 2006), qui ne recyclerait pas les vésicules du RRP, mais celles du pool de recyclage (Wu & Wu 2009).

III.3.3. L'endocytose en masse (bulk endocytosis)

Au cours d'une stimulation intense, une voie de récupération des vésicules synaptiques supplémentaire est recrutée, l'endocytose en masse (Cousin 2009). En effet, l'endocytose classique dépendante de la clathrine ne peut pas compenser une forte augmentation de surface membranaire pendant une stimulation intense, en raison de sa cinétique lente et de sa faible capacité (Clayton et al 2008, Sankaranarayanan & Ryan 2000). La membrane plasmique s'invagine alors sur de grandes zones pour former des endosomes. Les vésicules synaptiques seront générées à partir de ces endosomes. Des évidences pour l'endocytose en « masse » ou en « vrac » ont été obtenues, par exemple, dans les neurones granulaires du cervelet en culture (Clayton et al 2008) et le calyx de Held (Wu & Wu 2007).

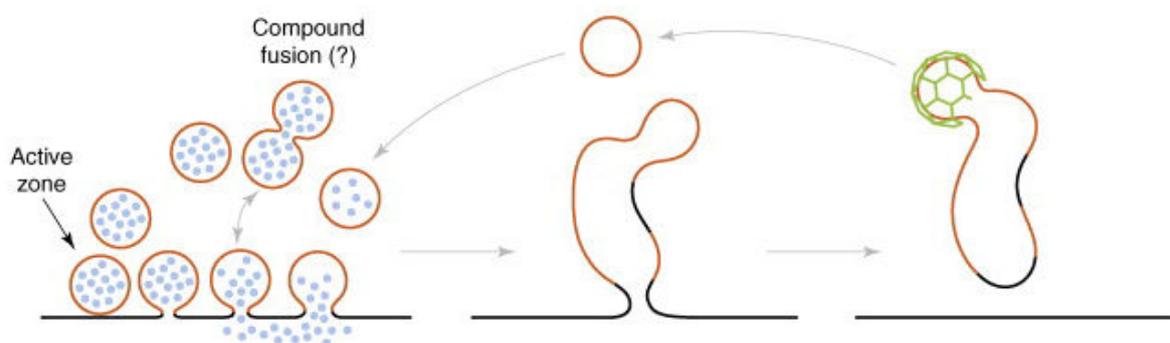


Figure III-6 L'endocytose en masse permet de compenser la forte augmentation de surface membranaire liée à une exocytose multiple. Une marge portion de membrane est invaginée et forme

un endosome après scission. Les vésicules synaptiques bourgeonnent à partir de cet endosome par un mécanisme dépendant de la clathrine qui peuvent ensuite être réutilisées (Smith et al 2008).

L'endocytose en masse a été décrite pour la première fois à la jonction neuromusculaire de grenouille pour une stimulation massive non physiologique (Miller & Heuser 1984) mais elle a ensuite été observée pour des stimulations intenses mais physiologiques (Richards et al 2000, Richards et al 2003), par exemple lorsque des synapses centrales sont stimulées avec de brefs trains de PA à haute fréquence (Clayton et al 2008). Cette voie d'endocytose est donc la voie préférentielle de récupération des vésicules synaptiques lors d'une augmentation de l'activité neuronale. Elle est déclenchée très rapidement, moins d'une seconde après l'initiation de la stimulation (Clayton et al 2008, Wu & Wu 2007).

L'endocytose en masse a été visualisée avec la pHluorin couplée à la VAMP4, protéine cargo essentielle pour l'endocytose en masse (Nicholson-Fish et al 2015). La fluorescence de cette sonde VAMP4-pHluorin diminue pendant une stimulation à haute fréquence à cause de l'acidification de l'endosome dans les neurones d'hippocampe en culture (Nicholson-Fish et al 2016).

III.3.4. L'endocytose ultra rapide

A la jonction neuromusculaire de *C. elegans*, un mode d'endocytose ultra rapide a été mis en évidence en couplant les techniques d'optogénétique et de congélation rapide. Cette endocytose intervient dans une échelle de temps de l'ordre de la dizaine à la centaine de millisecondes après la stimulation, soit plusieurs ordres de grandeur par rapport à l'endocytose dépendante de la clathrine (Watanabe et al 2013a). Cette endocytose ultrarapide a été confirmée dans des cultures de neurones d'hippocampe (Watanabe et al 2013b), ainsi que dans les tranches d'hippocampe et de cervelet par mesure de la capacitance membranaire dans les fibres moussues (Delvendahl et al 2016).

Ce nouveau mode d'endocytose récupère une surface membranaire plus large qu'une vésicule et a lieu aux extrémités de la zone active. Elle est bloquée par les inhibiteurs de la polymérisation de l'actine et la scission de la membrane requiert la dynamine. Elle est deux cents fois plus rapide que l'endocytose dépendante de la clathrine et n'est pas compatible avec le mode « kiss and run » puisque les vésicules synaptiques ne sont pas directement reformées.

Les larges vésicules récupérées forment un endosome synaptique une seconde environ après la stimulation. Après 3 secondes, de nouvelles vésicules sont générées à partir de cet endosome, par un mécanisme qui lui dépend de la clathrine (Kononenko et al 2014), soit 5 à 6 secondes après la stimulation. Cette voie d'endocytose n'est détectée qu'à 37°C et n'est pas activée lorsque les neurones sont stimulés à température ambiante (Watanabe et al 2014), ce qui pourrait expliquer sa découverte tardive et le désaccord avec les données de la littérature qui privilégient depuis plusieurs décades la voie classique lente et dépendante de la clathrine.

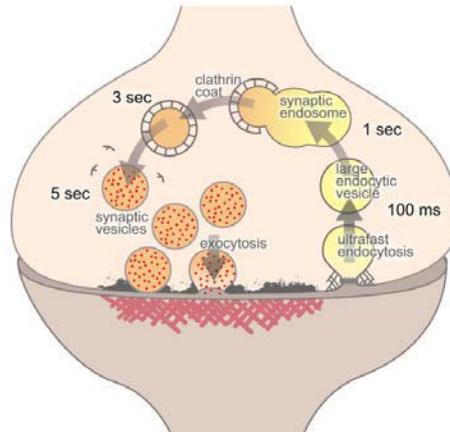


Figure III-7 L'endocytose ultra rapide supprime la membrane ajoutée par la fusion des vésicules à la périphérie de la zone active. Les grandes vésicules d'endocytose fusionnent ensuite à endosomes. Les vésicules synaptiques sont reformées à partir des endosomes via un processus dépendant de la clathrine. Les nouvelles vésicules synaptiques formées peuvent être recrutées de nouveau à la zone active (Watanabe et al 2014).

III.4. Etape 7 : L'acidification des vésicules

L'acidification des vésicules peut être vue comme l'étape précédant et indispensable au remplissage en neurotransmetteur. Nous la traitons comme l'étape finale du cycle vésiculaire car leur acidification éteint la fluorescence de la pHluorin lorsqu'elle est séquestrée dans la lumière vésiculaire ce qui délimite opérationnellement le recyclage.

L'acidification des vésicules est générée par une pompe à proton (H^+ -vATPase) formant un gros complexe multi protéique d'environ 1 million de daltons et mesurant $14 \times 14 \times 24 \text{ nm}$, dont la majeure partie est cytosolique. Elle représente 10% du volume vésiculaire et elle s'étend hors de la vésicule sur plus de 15nm. La protéomique des vésicules suggère que les vésicules ne contiennent qu'une H^+ -vATPase, ce qui pose un problème de biogénèse si les vésicules sont reformées par l'assemblage stochastique de protéines (Takamori, 2006).

La H^+ -vATPase est composée d'un domaine cytoplasmique V1 qui possède l'activité ATPase (640 kDa, 8 sous-unités) et d'un domaine membranaire V0 pour la translocation du proton (260 kDa, 5 sous-unités) (Arata et al 2002, Forgac 2007). Elle utilise un mécanisme rotatoire où une partie de la V1 est mobile par étape de 120° par rapport à la V0 entraînant la translocation de deux protons par ATP consommé (la V1 contient l'activité ATPase). Un tour complet de la V1 consomme donc 3 ATP pour produire un influx de 6 H^+ .

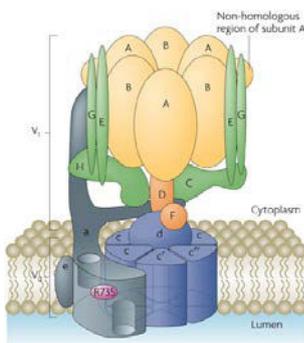


Figure III-8 Structure de la vATPase (Forgac 2007)

La H^+ -vATPase utilise l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP pour générer un gradient électrochimique de proton, et son activité est responsable de l'acidification des endosomes, des lysosomes ainsi que des vésicules à cœur dense et synaptiques.

Pour mesurer l'acidification des vésicules (Atluri & Ryan 2006) ont utilisé la synaptopHluorin (pHluorin fusionnée avec VAMP2 (Miesenbock et al 1998)) dont la fluorescence de la synaptopHluorin est éteinte à pH 5,5. Une stimulation électrique déclenche la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique ce qui accumule la synaptopHluorin à la membrane dont la fluorescence augmente 20 fois suite à l'équilibration avec le milieu extracellulaire alcalin (pH 7,4). Lors de l'endocytose la synaptopHluorin est internalisée et l'extinction de sa fluorescence marque l'étape de réacidification.

L'intensité de fluorescence de la pHluorin enregistrée au niveau d'un bouton synaptique peut être séparée en trois composantes : un pool éteint correspondant à la pHluorin séquestrée dans les vésicules acides, un pool de surface dont la fluorescence est révélée par le milieu extracellulaire alcalin et finalement un pool contenant les vésicules récemment internalisées et

INTRODUCTION

qui ne sont pas encore complètement réacidifiées. L'exocytose entraîne une augmentation rapide de la fluorescence lorsque la synaptopHluorin passe du pool acide à la surface membranaire. L'internalisation ou endocytose fait passer la protéine du pool de surface au pool alcalin. La fluorescence n'est pas éteinte par l'endocytose elle-même mais par l'acidification de la vésicule. La décroissance de la fluorescence est donc contrôlée par la cinétique de réacidification et la cinétique d'internalisation. Eteindre la fluorescence par des applications extracellulaires acides permet d'isoler la fluorescence du pool alcalin des vésicules réacidifiées et de mesurer directement la cinétique de réacidification. La réacidification post endocytose est lente avec une constante de temps de l'ordre de 4-5 secondes. La synaptopHluorin est internalisée avec une constante de temps de 7,6 secondes (culture d'hippocampe de rat) (Atluri & Ryan 2006).

Egashira et al, 2015 estime la constante de temps de la réacidification à environ 15 secondes en utilisant une sonde mOrange sensible au pH fusionnée à la synaptophysine dans des cultures de neurones d'hippocampe de souris. Ces auteurs ont déterminé une capacité tampon d'environ 57 mM/pH dans la lumière des vésicules. Pendant la réacidification, le pH vésiculaire décroît de 1,7 unité ce qui correspond à un influx net de protons de 100 mM, soit une accumulation de 1200 protons. Ces auteurs ont utilisé une sonde mOrange qui est plus appropriée que la pHluorin car son pKa plus acide (6,5 contre 7,1) est optimal pour mesurer le pH luminal (5,7) des vésicules synaptiques ; le rapport signal/bruit de cette sonde est plus élevé au pH vésiculaire.

Pour manipuler le pH vésiculaire, Rost et al, 2015 ont développé la protéine pHoenix qui peut remplacer fonctionnellement la pompe à protons endogène et permet un contrôle optogénétique de l'acidification vésiculaire et par conséquent de l'accumulation de neurotransmetteurs. Une acidification supplémentaire des vésicules par pHoenix n'augmente que très légèrement la taille des quanta dans des cultures de neurones d'hippocampe de souris (autapses), suggérant que les vésicules sont déjà remplies. En bloquant l'ATPase et en utilisant pHoenix pour acidifier les vésicules, ces auteurs ont montrés que les vésicules partiellement remplies ont une probabilité de libération plus faible que les vésicules pleines, suggérant une exocytose préférentielle des vésicules avec un contenu haut en neurotransmetteurs.

IV. Mécanismes de remplissage des vésicules en GABA

IV.1. L'accumulation du GABA dans la vésicule par VIAAT

VIAAT (ou VGAT), le transporteur vésiculaire des acides aminés inhibiteurs commun au GABA et à la glycine, a été cloné en 1997 comme l'orthologue de unc-47 chez *C. elegans* (McIntire et al 1997, Sagné et al 1997), pour revue cf (Aubrey 2016, Gasnier 2004).

VIAAT définit à lui seul la famille SLC32 (SLC32a1). Sa structure génomique est originale puisqu'il est formé de 2 exons seulement, le deuxième codant pour les 9 segments transmembranaires. Sa séquence code pour 486 acides aminés, sans peptide signal, plaçant son extrémité N-term dans le cytosol et son extrémité C-term dans la lumière des vésicules (Martens et al 2008).

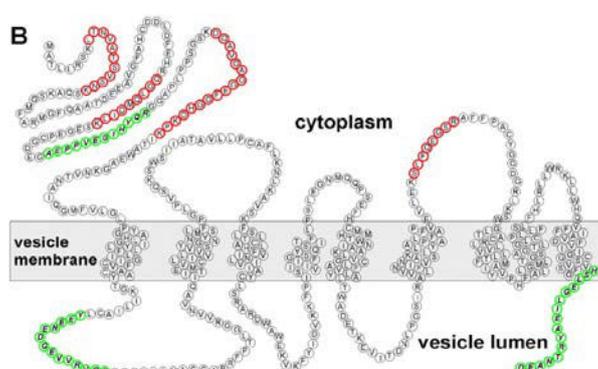


Figure IV-1 Topologie transmembranaire de VIAAT (Martens et al 2008)

VIAAT n'est pas spécifique pour le GABA et transporte aussi la glycine (Aubrey et al 2007) expliquant leur colibération dans les neurones spinaux immature (Jonas et al 1998) et la colocalisation des récepteurs GABA_A et glycinergiques postsynaptiques (Triller et al 1987) (Bohlhalter et al 1994). Les propriétés de VIAAT exprimé dans des systèmes hétérologues sont en accord avec les études fonctionnelles réalisées par reconstitution avec le transporteur purifié à partir de vésicules synaptiques (Burger et al 1991). L'affinité apparente de VIAAT pour le GABA est sensiblement plus grande que pour la glycine (EC_{50} GABA (5 mM) < EC_{50} glycine (25 mM)), rendant difficile les expériences utilisant des radioligands du fait d'une plus grande dilution isotopique.

VIAAT est un déterminant essentiel de la transmission inhibitrice. Son inactivation entraîne une létalité embryonnaire, un défaut abdominal appelé omphalocèle et une fente palatine (Wojcik et al 2006) semblable à celle observée dans les souris KO de la GAD67 qui sont déficientes en GABA. La migration embryonnaire des interneurons corticaux à partir des éminences ganglionnaires n'est pas altérée dans les souris VIAAT^{-/-}. La réduction drastique de la libération de GABA et de glycine n'altère pas l'expression des récepteurs post synaptiques GABAergiques et glycinergiques (Wojcik et al 2006).

Le transport vésiculaire de GABA ou de glycine dépend du potentiel de membrane ($\Delta\Psi$) et du gradient de pH (ΔpH), les deux composantes de la force proton motrice (p) générée par la H⁺-vATPase ($p = \Delta\Psi + \Delta pH/F$, F est la constante de Faraday, p est exprimé en mV). Les deux

INTRODUCTION

acides aminés étant des zwitterions au pH physiologique, il a été proposé que le transporteur est électrogénique, couplant la capture d'un GABA ou d'une glycine neutre à l'échange d'un proton (Burger et al 1991, Edwards 2007, Jellali et al 2002). Cette stœchiométrie permettrait une accumulation vésiculaire de GABA d'un facteur 1000 à l'équilibre thermodynamique, si on suppose les valeurs de $\Delta\text{pH} = 2$ et $\Delta\Psi = +60$ mV (Edwards 2007). Dans ces conditions, une concentration cytosolique minimale de GABA de 100 μM est suffisante, thermodynamiquement, pour atteindre une concentration luminale de ~ 100 mM. Mais à cette concentration, VIAAT fonctionnerait à seulement 2 % de sa vitesse maximale, entraînant une limitation cinétique pour le remplissage des vésicules. Il faut donc que la concentration de GABA dans la terminaison soit maintenue à des niveaux millimolaires pour assurer un remplissage efficace (VIAAT fonctionnerait à 29 % de son turnover maximal pour 2 mM de GABA).

Ce mode d'échange H^+/GABA a été confirmé récemment *in vitro* en analysant les changements de pH et de potentiel induit par le transport de GABA sur des vésicules uniques exprimant VIAAT (Farsi et al 2016). En particulier, ces auteurs ont pu montrer que le GABA n'est échangé que contre des protons sans qu'aucun autre ion, en particulier le Cl^- , ne participe au cycle de transport, contrairement à ce qui avait été proposé avec des expériences de reconstitution de VIAAT (Juge et al 2009). Remarquablement, Farsi et al. (2016) ont montré que le gradient de pH et le potentiel de membrane ont des valeurs inférieures dans les vésicules GABAergiques que dans les vésicules glutamatergiques. La force proton-motrice générée par la H^+ -vATPase serait donc plus faible ou plus dissipée à l'état stationnaire dans les vésicules GABAergiques que dans les vésicules glutamatergiques.

VIAAT est exprimé dans les neurones GABAergiques et glycinergiques. Il est exprimé principalement dans les terminaisons axonales et associé aux vésicules synaptiques (Dumoulin et al 1999). Dans des tranches d'hippocampe de rat, on détecte un marquage cytoplasmique de VIAAT au niveau des somas des interneurons GABAergiques. Ce marquage est toutefois moins intense que dans les terminaisons axonales concentrées autour des somas des cellules pyramidales et des interneurons (Chaudhry et al 1998).

Au cours de ma thèse j'ai utilisé la sonde VGAT-pHluorin développée dans le laboratoire de S. Volgmaier (USCF), dans laquelle la pHluorin est fusionnée au C-term luminal de VIAAT après un motif TGG (Santos et al 2013). Cette localisation luminale du C-term est une propriété spécifique de VIAAT, conséquence du nombre impair de segments transmembranaires. Les autres transporteurs vésiculaires (VMAT, VACHT, VGLUT) ont leur extrémité C-term cytosolique. En conséquence, les signaux d'adressage de VIAAT sont localisés sur son extrémité N-term (Santos et al 2013).

IV.2. Synthèse enzymatique par les GAD-65 et 67

La glutamic acid decarboxylase (GAD, E.C. 4.1.1.15) est l'enzyme qui catalyse la décarboxylation du L-glutamate sur son carbone alpha, le transformant en GABA. En conséquence, le GABA est un acide aminé sans carbone asymétrique, la fonction acide étant portée par le carbone gamma. Dans les neurones GABAergiques, deux isoformes de la glutamate decarboxylase participent à cette réaction enzymatique. Elle existe sous deux isoformes de poids moléculaires 65kDa (GAD65) et 67kDa (GAD67), encodées par deux gènes différents régulés indépendamment l'un de l'autre sur les chromosomes 2 (GAD65) et 10 (GAD67) (Soghomonian & Martin 1998).

Les deux GAD ont la même structure et sont composées d'un domaine N-term (soit les 100 (GAD67) ou 95 (GAD65) premiers acides aminés) hautement divergent (23% d'identité) qui est impliqué dans le ciblage subcellulaire, l'association à la membrane (palmytoilation) et les interactions hétéromériques. Le second domaine est plus conservé, avec 73% d'identité entre les deux isoformes, et contient le centre catalytique. Les GAD 65 et 67 sont présentes sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères solubles ou associés à la membrane (Jin et al 2003). L'association de la GAD65 à la membrane implique la phosphorylation de son N-term, alors que celle de la GAD67 implique la formation d'un hétéromère GAD65-GAD67 par des interactions non définies entre les domaines N-term.

Il a été montré que la délétion de la GAD67 est létale; en effet on observe une réduction de 93% du niveau de GABA dans le cerveau des souris KO GAD67^{-/-} et l'activité enzymatique de la GAD est réduite à 20% et le contenu en GABA à 7% dans le cortex cérébral par exemple (Asada et al 1997). Les souris KO GAD67^{-/-} meurent à la naissance de détresse respiratoire (Lau & Murthy 2012). Elles présentent une anomalie anatomique caractérisée par une fente palatine similaire à celle observée dans les souris KO VIAAT^{-/-}. Ces deux gènes (GAD2 et SLC32A1) sont les seuls déterminants indispensables à la transmission GABAergique. En effet, l'inactivation du gène GAD1 codant pour la GAD65 n'est pas létale, les souris atteignant l'âge adulte sans déficits comportementaux majeurs. Elles développent néanmoins des crises d'épilepsie spontanées, qui entraînent une augmentation de la mortalité. Le niveau basal de GABA et l'activité enzymatique de la GAD67 sont normaux (Asada et al 1996, Kash et al 1997, Lau & Murthy 2012).

La transformation du glutamate en GABA nécessite la présence du pyridoxal 5'-phosphate (PLP) comme cofacteur dans le site actif (holoGAD). En absence de PLP, l'enzyme (apoGAD) est sous forme inactive ce qui est le cas de la majorité de la GAD65 (Martin & Martin 1979) (Erlander et al 1991). En effet dans les extraits de cerveau, la quasi-totalité de la GAD67 est sous la forme d'une holoenzyme active saturée par son cofacteur le pyridoxal phosphate. Au contraire, seulement la moitié environ de la GAD65 existe sous forme active (Kaufman et al 1991). Dans des cellules Sf9 infectées par un virus contenant l'une ou l'autre des GAD, la GAD65 est largement sous la forme d'apoenzyme (93%) alors que la GAD67 est sous la forme d'holoenzyme (72%) (Battaglioli et al 2003). Cette différence est la conséquence d'une plus grande flexibilité dans la structure d'une boucle du domaine catalytique de la GAD65 qui facilite la dissociation du PLP (Fenalti et al 2007). En conséquence, la majorité du GABA cytosolique est synthétisée par la GAD67 qui est constitutivement active (Asada et al 1997). La GAD65, majoritairement sous forme d'apoGAD serait recrutée principalement pendant les périodes de forte activité où la demande en GABA augmente (Esclapez et al 1994, Patel et al 2006). Par exemple, il a été montré que la synthèse du GABA dans les cellules horizontales de la rétine, en

INTRODUCTION

présence de glutamate ou de glutamine, est augmentée de manière significative dans des tranches à température physiologique en présence de PLP (Deniz et al 2011).

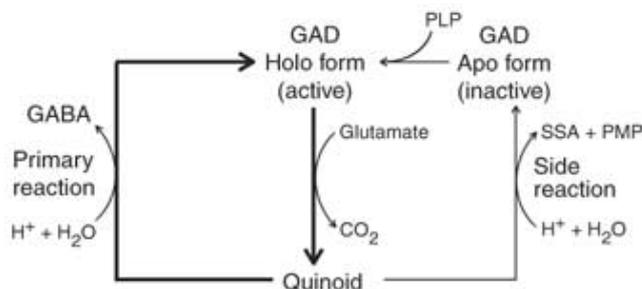


Figure IV-2 Réaction catalysée par la GAD (Fenalti et al 2007)

Les mécanismes moléculaires permettant le recrutement d'holoGAD65 par l'activité ne sont pas bien compris. Le PLP est la forme catalytiquement active de la vitamine B6 (Eliot & Kirsch 2004). Sa distribution à travers les différentes régions du cerveau de rat est inégale (table 1 (Ebadi 1981)), corrélée à l'activité de la pyridoxal kinase. La concentration en PLP varie de 0,86 à 1,97 $\mu\text{g/g}$ de tissu, l'hippocampe possédant un niveau intermédiaire de pyridoxal phosphate (0,994 $\mu\text{g/g} \pm 0,013$). Sa concentration peut dépendre de l'activité de la pyridoxal kinase et de la pyridoxal phosphate phosphatase, de la présence de molécules permettant de le retenir et de l'existence de réactions biochimiques localisées qui l'utilisent (Ebadi 1981). Un traitement par du pyridoxal phosphate-gamma-glutamyl hydrazone diminue la concentration de PLP et inhibe l'activité de la GAD, sûrement secondairement à l'inhibition de la pyridoxal kinase (Ebadi 1981). Une carence moyenne ou sévère en vitamine B6 diminue la concentration de GABA dans le cerveau entier (Ebadi 1981). Une déficience en vitamine B6 en expérimentation animale peut mener à des troubles neurologiques incluant des convulsions qui peuvent progresser vers un stade épileptique sans traitement (Ebadi 1981).

Les deux isoformes de la GAD sont présentes dans la plupart des neurones contenant du GABA; toutefois la GAD65 apparaît ciblée à la membrane et dans les terminaisons axonales alors que la GAD67 est distribuée plus largement dans tous les compartiments cellulaires, incluant le soma et les dendrites. Il a été proposé un rôle distinct pour chacune des isoformes: la GAD67 serait préférentiellement responsable du pool cytosolique de GABA alors que la GAD65 serait essentielle à la synthèse du GABA nécessaire au remplissage vésiculaire (Waagepetersen et al 2001). En accord, la GAD67 est présente dans les interneurons et les neurones qui déchargent toniquement, alors que la GAD65 est concentrée dans les neurones dont l'activation est fortement dépendante des entrées synaptiques (Soghomonian & Martin 1998). L'inductibilité de la GAD65 peut permettre de produire de plus grande quantité de GABA en cas de besoin, phasiquement avec la décharge des neurones (Erlander et al 1991).

Une étude a montré *in vitro* que le GABA néosynthétisé à partir du glutamate était préférentiellement transporté lorsque les vésicules avaient accès aux deux acides aminés. Cette étude a suggéré que VIAAT pouvait s'associer avec la GAD65 pour former un complexe protéique procurant un avantage cinétique pour la capture du GABA néosynthétisé (Jin et al 2003, Wu et al 2007).

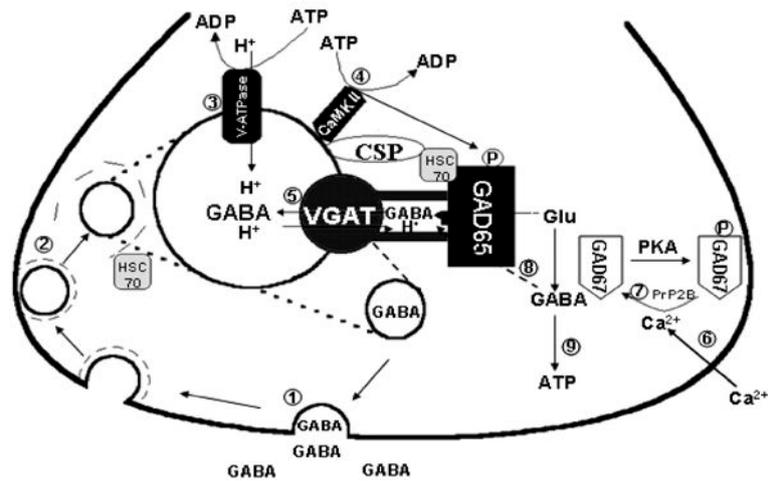


Figure IV-3 Modèle d'un couplage structurel et fonctionnel entre la synthèse du GABA et son transport vésiculaire dans les vésicules synaptiques (Jin et al 2003)

Finalement, un ensemble de travaux élégants du groupe de Sabatini suggère que ni la GAD ni VIAAT ne sont indispensables à la libération vésiculaire de GABA par les neurones dopaminergiques de la substance noire (pars compacta) et de l'aire tegmentale ventrale. Ces neurones en effet n'expriment pas VIAAT, ni les deux isoformes de la GAD, l'accumulation vésiculaire de GABA serait réalisée par le transporteur vésiculaire des monoamines VMAT2. Par ailleurs la capture de GABA par des transporteurs de la membrane plasmique serait capable de compenser l'absence de synthèse enzymatique (Tritsch et al 2012, Tritsch et al 2014).

IV.3. Source de GABA

Le stock cytosolique de GABA dans les terminaisons inhibitrices peut être approvisionné directement par la recapture du GABA libéré dans la fente synaptique par des transporteurs membranaires neuronaux ou par sa synthèse à partir du glutamate par la GAD comme décrit précédemment.

IV.3.1. Les transporteurs du GABA

Les transporteurs du GABA forment une sous-famille au sein de la famille SLC6 qui comprend aussi les transporteurs de monoamines et d'acides aminés. Tous ces transporteurs couplent la translocation de leur substrat à travers la membrane plasmique à un cotransport de sodium et de chlore (Chen et al 2004a). Le génome des mammifères contient quatre gènes codant pour les transporteurs du GABA : GAT1 (SLC6A1) ; GAT2 (SLC6A13) ; GAT3 (SLC6A11) et BGT1 (SLC6A12) (Zhou & Danbolt 2013), pour revue cf (Scimemi 2014).

Le transport de GABA est un processus actif qui requiert la présence d'un large gradient électrochimique entrant pour le Na^+ , créé et maintenu par la Na^+/K^+ -ATPase (Kanner 1978). Des expériences de cinétique et de thermodynamique indiquent qu'en plus des ions Na^+ , le Cl^- extracellulaire est également nécessaire pour le transport de GABA. La stœchiométrie de GAT1, le transporteur neuronal de GABA, est encore débattue. GAT1 étant électrogénique, la stœchiométrie minimale de $1\text{GABA}:2\text{Na}^+:1\text{Cl}^-$ conduit à un influx net d'une charge positive par cycle de transport, puisque le GABA est un zwitterion (Kavanaugh et al 1992, Lu & Hilgemann 1999, Mager et al 1993, Radian & Kanner 1983). Néanmoins, les mesures directes de couplage ionique de GAT1 exprimé dans l'ovocyte de Xénope font apparaître deux charges positives par cycle de transport (Loo et al 2000). L'origine de cette charge supplémentaire est débattue. Il a été proposé initialement que le Cl^- ne serait pas couplé thermodynamiquement au transport (Loo et al 2000), et ne serait donc qu'un modulateur allostérique. Néanmoins, une étude électrophysiologique récente du potentiel d'inversion de GAT1 suggère un couplage stœchiométrique à 3 Na^+ et 1 Cl^- (Willford et al 2015). Le K_m de GAT1 est de $\approx 8 \mu\text{M}$ et de 0,8 pour GAT3 (Guastella et al 1990, Zhou & Danbolt 2013).

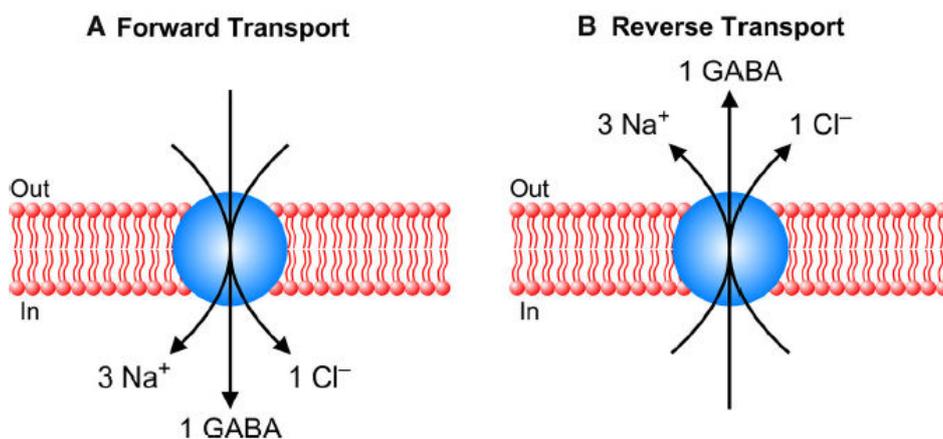


Figure IV-4 Stœchiométrie des transporteurs du GABA (Willford et al 2015)

IV.3.2. Distribution cellulaire des transporteurs du GABA

Chez les rongeurs, le marquage pour GAT3 en immunohistochimie est localisé exclusivement dans les processus astrocytaires dispersés à travers le neuropile (ensemble de structures comprenant les axones, les dendrites, les synapses et le prolongement des cellules gliales) et adjacents aux synapses symétriques et asymétriques près des corps cellulaires et des dendrites basales et apicales (Melone et al 2005, Minelli et al 1996, Ribak et al 1996). Dans le cerveau d'autres espèces de mammifères, comme les chats, les singes et les humains, l'expression spécifique de GAT3 dans les astrocytes n'est pas confirmée, car il est exprimé aussi dans les oligodendrocytes (Pow et al 2005).

En microscopie électronique, l'immunoréactivité de GAT1 est principalement détectée aux terminaisons axonales des synapses symétriques (inhibitrices) dans le néocortex. Pour la plupart, ce marquage chevauche celui des terminaux positifs pour la GAD67 situés à proximité du corps cellulaire, du segment initial de l'axone et des dendrites proximales (Minelli et al 1995, Ribak et al 1996). Mais un marquage de GAT1 a été détecté également dans les processus astrocytaires distaux (Minelli et al 1995, Ribak et al 1996) et postsynaptiquement dans les soma et dans les dendrites des neurones non GABAergiques (Yan et al 1997).

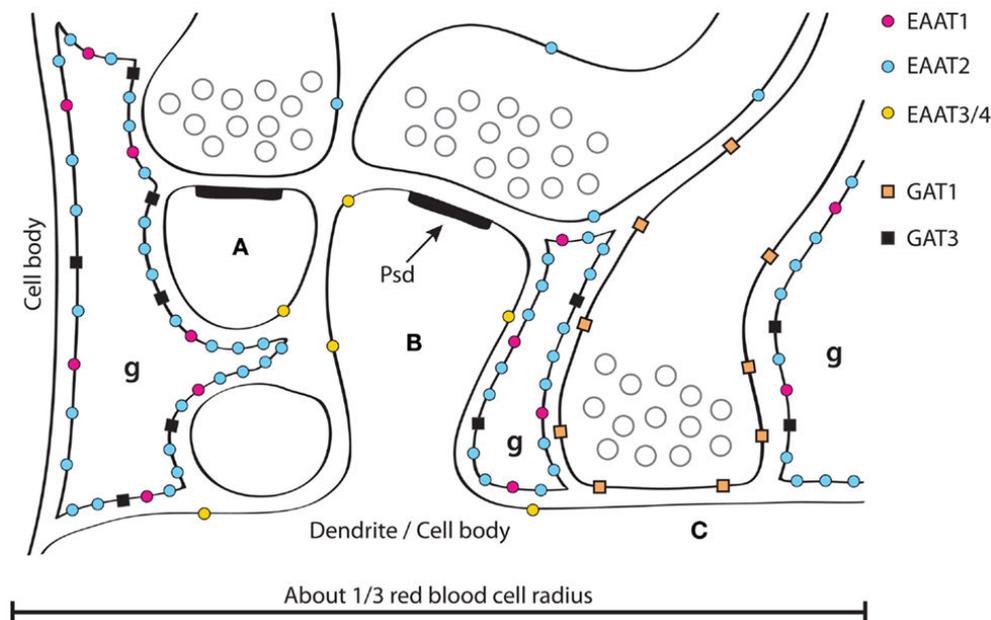


Figure IV-5 Distribution subcellulaire schématique des transporteurs du GABA et du glutamate (g : astrocytes ; A et B : synapses glutamatergiques ; C : synapse inhibitrice) (Zhou & Danbolt 2013)

Une souris transgénique exprimant une protéine de fusion mGAT1-GFP a permis de quantifier son expression. Dans l'hippocampe, Chiu et al. (2002) ont estimé 1200 ± 40 GAT1 par bouton, soit une concentration volumique de 6071 ± 200 GAT1 par μm^3 et une densité surfacique de 800 ± 24 molécules GAT1 par μm^2 (Chiu et al 2002). Le turnover physiologique est estimé à 79-93 s^{-1} (37 ° C, -50 à -90 mV) (Gonzales et al 2007). Il n'est pas suffisant pour approvisionner la terminaison en GABA par rapport à la rapidité de la transmission synaptique, cette faiblesse pourrait être compensée par le nombre important de transporteurs à la membrane.

En conséquence, GAT1 est considéré comme le transporteur qui assure la recapture neuronale du GABA libéré dans la fente synaptique. Lorsque cette recapture est absente comme

dans les souris KO GAT1^{-/-}, on observe une élévation de la concentration de GABA extracellulaire qui entraîne une potentialisation du courant tonique des récepteurs GABA_A, alors qu'au contraire l'amplitude des IPSCs GABAergiques est diminuée (Jensen et al 2003).

IV.3.3. Régulation du transporteur GAT1

Le trafic de GAT1 à la membrane plasmique est régulé. Des marquages par biotinylation montrent que les transporteurs exposés à la membrane sont recyclés dans un temps de l'ordre de la minute. Dans des cultures d'hippocampe, une application de K⁺ (90mM) induit l'expression de GAT1 à la surface qui dépend du calcium. Des vésicules contenant GAT1 ont été isolées. Elles sont d'une taille comparable aux vésicules synaptiques (47 nm) mais leur composition diffère significativement puisque qu'elles contiennent de la syntaxine mais pas VIAAT, SV2 et la synaptobrevine 2 (VAMP2) (Deken et al 2003). Dans des neurones corticaux en culture, la quantification de l'exocytose et endocytose suggère que ~33% du pool total de GAT1 est présent à la membrane dans les conditions basales (Wang & Quick 2005).

Le trafic membranaire de GAT1 est altéré par des ester de phorbol, qui activent la protéine kinase C (PKC, sérine/thréonine kinase) et réduisent son expression à la surface (Corey et al 1994, Wang & Quick 2005). L'activation de la PKC diminue la capture de GABA dans les cultures neuronales d'hippocampe en régulant la disponibilité de la syntaxine-1A qui interagit avec le transporteur GAT1 (voir ci-après) (Beckman et al 1998). Dans les expériences de reconstitution, l'inhibition de GAT1 par la PKC requiert la syntaxine-1A et Munc18 qui est directement phosphorylé par la PKC. Cette phosphorylation permettrait la dissociation du complexe Munc18-Syntaxin-1A, qui serait disponible alors pour s'associer au N-term cytoplasmique de GAT1 via son domaine H3 et diminuer la capture de GABA (Beckman et al 1998, Deken et al 2000, Wang et al 2003). En effet le clivage de la syntaxine-1A par la toxine botulique C1 double la capture de GABA dans les neurones d'hippocampe en culture (Deken et al 2000).

La PKC n'est pas la seule kinase pouvant réguler GAT1. En effet la diminution de la phosphorylation de GAT1 sur certains résidus tyrosine par des inhibiteurs de la tyrosine kinase diminue la capture de GABA, en internalisant une fraction des transporteurs présents à la surface (Law et al 2000). A contrario, les inhibiteurs de la tyrosine phosphatase augmentent la capture de GABA, la phosphorylation des tyrosines (Y107 et Y317) de GAT1 diminuant son internalisation (Whitworth & Quick 2001). Il existe donc une balance entre les activités des tyrosine kinase et tyrosine phosphatase pour réguler GAT1. GAT1 peut également être phosphorylé sur les résidus sérine par la PKC cet état est révélé seulement lorsque les phosphorylations tyrosine sont éliminées ou considérablement réduites, les niveaux de phosphorylation sérine et tyrosine sont négativement corrélées (Quick et al 2004). GAT1 peut exister dans l'un des deux états de phosphorylation mutuellement exclusifs et la relative abondance de ces deux états détermine en partie la distribution subcellulaire du transporteur.

D'autre part, le substrat du transporteur, la GABA lui-même, peut avoir un rôle régulateur. Dans les ovocytes et les cultures de neurones hippocampaux, le GABA augmente le turnover du transporteur (Quick 2002), en dissociant GAT1 de la syntaxine-1A. En présence de GABA extracellulaire, le transport de GABA est augmenté dans les cultures d'hippocampe par une augmentation de l'expression des transporteurs à la surface, causée en partie par un ralentissement de l'internalisation de GAT1 (Bernstein & Quick 1999).

IV.4. Source de glutamate

Le précurseur direct du GABA est le glutamate, métabolite essentiel et principal neurotransmetteur excitateur du CNS. Dans les neurones GABAergiques, le glutamate est synthétisé principalement à partir de la glutamine par la phosphate activated glutaminase (PAG, E.C. 3.5.1.2) ou capturé par des transporteurs membranaires dans l'espace extracellulaire où sa concentration est très faible.

IV.4.1. Les transporteurs du glutamate

Les transporteurs de glutamate appartiennent à la famille SLC1 (Danbolt 2001). Cinq isoformes ont été identifiés: EAAC1 (SLC1A1/EAAT3), GLT1 (SLC1A2/EAAT2), GLAST (SLC1A3/EAAT1), EAAT4 (SLC1A6), et EAAT5 (SLC1A7). Ces transporteurs ont en commun de cotransporter le glutamate avec des ions Na^+ et H^+ et d'être dépendants d'un contre transport de K^+ (Barbour et al 1988, Kanner & Sharon 1978, Szatkowski et al 1991). Le sodium est requis pour la liaison du glutamate alors que le potassium est nécessaire pour son transport net (Kanner & Bendahan 1982). La stœchiométrie de EAAC1 a été établie par la méthode des potentiels d'inversion ; trois Na^+ et un H^+ sont cotransportés avec une molécule de glutamate chargée négativement, cet influx étant couplé à un échange avec un ion K^+ (Kanner 2006, Kanner 2007, Zerangue & Kavanaugh 1996).

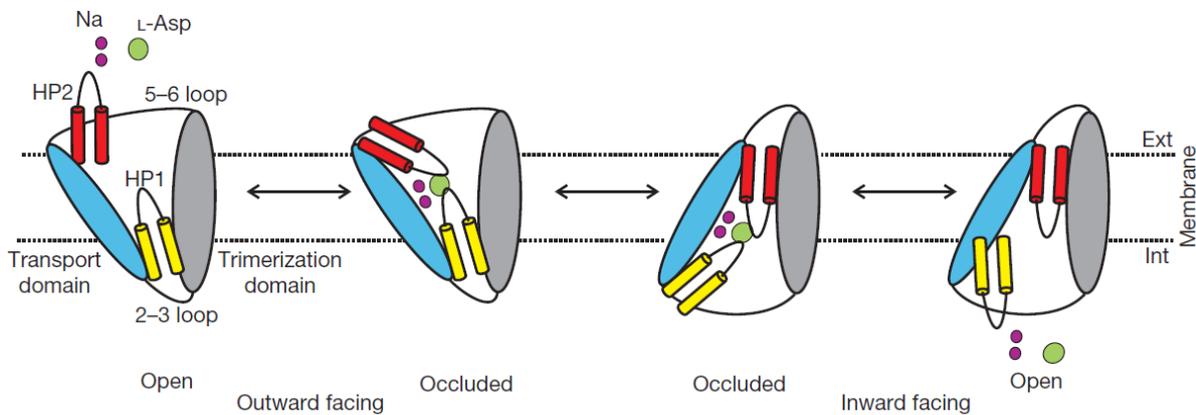


Figure IV-6 Mécanisme schématique du transport du glutamate (Reyes et al 2009)

Le transport de glutamate est électrogénique, avec un transfert net de deux charges positives par cycle de transport. La liaison du Na^+ et du glutamate induit un changement conformationnel du transporteur qui active une conductance anionique, perméable aux ions Cl^- (Billups et al 1996, Otis & Jahr 1998). Cette conductance Cl^- n'est pas couplée thermodynamiquement au transport et varie considérablement entre les isoformes : elle est quasi négligeable pour GLT1/EAAT2 et augmente selon la séquence EAAT2<EAAT3<EAAT1<EAAT4<EAAT5. L'affinité pour le glutamate est de 7-20 μM pour EAAT1

(Wadiche & Kavanaugh 1998), de 12-18 μM pour EAAT2 (Bergles et al 2002) et de 8-30 μM pour EAAT3 (Grewer et al 2000). A des potentiels transmembranaires physiologiques, le turnover de EAAC1/EAAT3 (dans des cellules HEK293) est estimé à 90-110 s^{-1} (Grewer et al 2000), alors que celui du transporteur glial GLT1/EAAT2 (dans l'ovocyte de Xénope) est estimé à 15 s^{-1} (Wadiche et al 1995).

IV.4.2. Distribution cellulaire des transporteurs du glutamate

EAAT1 (GLAST) est localisé sélectivement dans les astrocytes (Jungblut et al 2012) avec une densité de 2300 molécules par μm^2 (Danbolt et al 2016). EAAT2 (GLT1) est localisé dans les astrocytes avec une densité de 7500 molécules par μm^2 et dans les terminaisons synaptiques avec une densité dix fois moins importante (Danbolt et al 2016). EAAT3 (EAAC1) est localisé dans les somas et dendrites des neurones avec une densité de 90 molécules par μm^2 (Danbolt et al 2016).

EAAT2 est le transporteur de glutamate majeur dans le cerveau, en quantité cent fois plus importante que EAAT3 (Danbolt et al 2016). Il représente 95% de l'activité totale de recapture de glutamate puisque sa délétion dans les souris KO GLT $^{-/-}$ réduit la capture de glutamate à 5% du niveau des souris contrôles et augmente la concentration extracellulaire de glutamate (Tanaka et al 1997). Trois semaines après la naissance, les souris KO GLT $^{-/-}$ sont plus petites que les souris contrôles, hyperactives et sujettes à des crises spontanées d'épilepsie, potentiellement létales. La moitié des souris GLT $^{-/-}$ meurent de crises spontanées avant d'atteindre l'âge de 4 semaines.

EAAT2 a d'abord été identifié par immunohistochimie dans les astrocytes (Danbolt et al 1992), aucun marquage dans les neurones n'est observé. Mais des hauts niveaux d'ARNm de EAAT2 sont retrouvés dans les cellules pyramidales de CA3 (Schmitt et al 1996). La présence de la protéine EAAT2 est détectée dans les terminaisons axonales excitatrices des neurones matures de l'hippocampe par immunohistochimie (Chen et al 2004b, Holmseth et al 2009). Sa présence aux terminaisons axonales est confortée par une étude fonctionnelle où les auteurs utilisent l'aspartate marqué qu'ils observent en microscopie électronique. L'absence de capture d'aspartate dans les terminaisons axonales en présence de dihydrokainate ou dans les terminaisons de CA1 des souris KO EAAT2 $^{-/-}$ suggère sa localisation dans ces terminaisons (Furness et al 2008). De plus l'utilisation d'une souris EAAT2-eGFP montre une localisation du transporteur dans les astrocytes mais également dans plusieurs populations de neurones du cortex somatosensoriel et de l'hippocampe de souris (incluant 80% des cellules pyramidales de CA3) à des taux considérablement plus bas que dans les astrocytes (de Vivo et al 2009). Une localisation synaptique de EAAT2 est également retrouvé dans le cortex somatosensoriel de rat (Melone et al 2009) ainsi que celui de l'humain (Melone et al 2010). Le KO conditionnel de EAAT2 montre que le transporteur localisé dans l'astrocyte protège de l'épilepsie et que celui localisé dans le neurone permet la capture de glutamate dans le synaptosome (Petr et al 2015). La délétion d'EAAT2 dans les neurones réduit de moitié la capture de glutamate tandis que sa délétion dans l'astrocyte n'entraîne qu'une réduction mineure. Par contre sa délétion dans l'astrocyte entraîne une perte de 80% de la protéine et induit des convulsions et une augmentation de la mortalité des souris (Petr et al 2015).

Le marquage immunohistochimique de EAAT3 montre une distribution du transporteur dans les somas et dendrites des neurones, sans marquage astrocytaire (Shashidharan et al 1997). EAAT3 n'est pas spécifique des neurones glutamatergiques (Rothstein et al 1994). Dans des tranches d'hippocampe de jeune rat adulte, le marquage immunohistochimique montre qu'il est largement distribué dans les somas et dendrites de tous les neurones hippocampaux, incluant les neurones GABAergiques, mais n'est pas retrouvé dans les terminaisons synaptiques (Holmseth et al 2012).

Dans le cortex, les mêmes localisations sont retrouvées par immunohistochimie (Conti et al 1998), par contre ces auteurs trouvent un marquage dans des cellules non neuronales. Le marquage en microscopie électronique montre la présence de EAAT3 dans les corps cellulaires des neurones et les dendrites et épines dendritiques, mais pas dans les terminaisons axonales ; EAAT3 serait donc exclusivement postsynaptique (Conti et al 1998). L'analyse du type de terminaisons axonales qui contactent les dendrites et épines marquées par EAAC1/EAAT3 montre que 97% sont des contacts asymétriques, ce qui indique qu'il est exprimé au niveau des synapses excitatrices, le lieu même de la libération vésiculaire de glutamate.

La clairance extracellulaire du glutamate est largement catalysée par les transporteurs astrocytaires du glutamate GLT1 ET GLAST. Le rôle d'EAAT3 est toujours débattu mais des études physiologiques in vitro montrent qu'EAAT3 est un important composant de la machinerie de clairance du glutamate à la synapse. Par ce mécanisme, EAAT3 permet de limiter l'activation des récepteurs NMDA et d'augmenter le seuil d'induction de la potentialisation à long terme (Scimemi et al 2009). De plus des études fonctionnelles suggèrent que EAAT3 est présent dans les terminaisons nerveuses GABAergiques où il aiderait à maintenir le niveau de GABA en fournissant du glutamate pour sa synthèse (Mathews & Diamond 2003, Sepkuty et al 2002, Stafford et al 2010), suggérant que EAAT3 est abondant aux membranes pré et post synaptiques (He et al 2000).

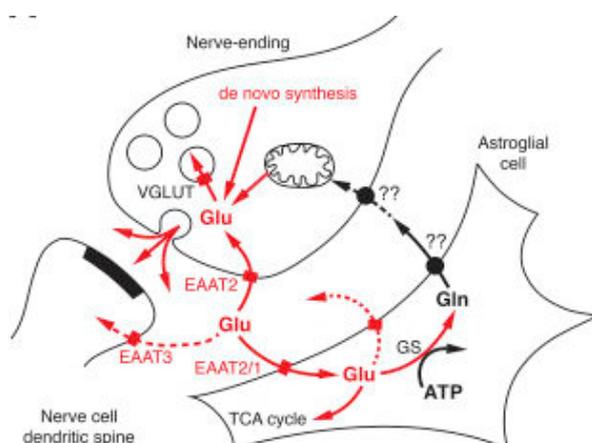


Figure IV-7 Illustration schématique de la localisation des transporteurs du glutamate (Danbolt et al 2016)

IV.4.3. Régulation du transporteur EAAT3/EAAC1

L'activité/expression de EAAT3 est régulée par l'activité neuronale, ainsi que par les voies de signalisation intracellulaires impliquant principalement la protéine kinase C α (α PKC) et la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) (Nieoullon et al 2006). Ces processus agiraient soit au niveau post-traductionnel ou au niveau de la transcription.

INTRODUCTION

De plus, il faut noter que EAAT3 présente une spécificité, par rapport aux autres transporteurs d'acides aminés excitateurs, car il est présent principalement dans le compartiment intracellulaire et pour environ 20% seulement à la membrane plasmique (Conti et al 1998, He et al 2000, Holmseth et al 2012, Rothstein et al 1994, Shashidharan et al 1997).

Les variations dans la capture neuronale de glutamate sont associées à des changements rapides dans le trafic du transporteur altérant sa localisation membranaire. Une stimulation à haute fréquence entraîne une translocation d'EAAT3 du cytosol vers la membrane plasmique (Levenson et al 2002), la capture de glutamate peut être augmentée *in vitro* durant la LTP et *in vivo* par un conditionnement de peur. La régulation au niveau de la transcription est suggérée par des expériences chez les rongeurs qui ont montré que l'augmentation de l'activité locomotrice est associée à une augmentation concomitante de l'expression du gène EAAT3 au niveau hippocampique (Molteni et al 2002).

Dans les cellules de gliome C6 et dans les neurones en culture, l'activation de la PKC augmente l'activité de EAAT3 (Casado et al 1993). Cet effet est associé à une redistribution du transporteur à la membrane et apparaît dépendant d'un sous-type particulier de la PKC, l'isoforme PKC α . Une telle interaction pourrait contribuer à la stabilisation du transporteur à la membrane plasmique à partir du pool intracellulaire (Davis et al 1998), augmentant ainsi le taux de transport du neurotransmetteur (Fournier et al 2004, Gonzalez et al 2003, González et al 2002). S'ajoutent à celle de la PKC d'autres voies de régulation par la PKA ou la PI3K qui permet une régulation différentielle de l'activité et de l'expression d'EAAT3 dans les cultures de neurones (Guillet et al 2005).

De plus des interactions avec d'autres protéines pourraient moduler la fonction du transporteur de glutamate. En effet, des études de co-expression dans des ovocytes de Xénope indiquent que la syntaxine-1A régule négativement la capture du glutamate et le courant anionique. Les expériences de co-immunoprécipitation suggèrent une interaction directe entre la syntaxine 1A et EAAT3 (Zhu et al 2005). La syntaxine-1A potentialise spécifiquement l'internalisation d'EAAT3 dans les cultures de neurones d'hippocampe (Yu et al 2006), ce qui conduit à une inhibition fonctionnelle du transport du glutamate.

IV.5. Source de glutamine

IV.5.1. Métabolisme de la glutamine

Les neurones n'expriment pas la pyruvate carboxylase (PC, E.C. 6.4.1.1), enzyme nécessaire pour les réactions anaplérotiques et qui est seulement présente dans les astrocytes (Yu et al 1983). Par conséquent, les neurones ne sont pas capables de synthétiser du glutamate ou du GABA à partir du glucose. La PC est une enzyme qui catalyse la formation de l'oxaloacétate à partir du pyruvate. L'oxaloacétate est un métabolite du cycle de Krebs, les réactions suivantes du cycle permettant de former l' α -cétoglutarate qui pourra ensuite être transformé en glutamate par la glutamate synthase (EC 1.4.1.13), une transaminase. L'absence de PC empêche de reconstituer les intermédiaires du cycle de Krebs perdus lors de la libération du glutamate ou du GABA (Shank et al 1985). La PC permet une synthèse nette de neurotransmetteurs dans les astrocytes à partir du glucose pour maintenir l'approvisionnement des pools neuronaux de glutamate et de GABA.

Une navette transcellulaire entre les neurones et les astrocytes, connue sous le nom de cycle de glutamate/GABA-glutamine, permet le recyclage du glutamate et du GABA via leur transformation en glutamine dans les astrocytes suivi de sa sécrétion dans l'espace extracellulaire (Bak et al 2006). Le GABA capturé par les transporteurs GAT1 des astrocytes est catabolisé en succinate, un intermédiaire du cycle de Krebs, par l'action de concert de la GABA transaminase [EC 2.6.1.19] et de la succinate semialdehyde dehydrogenase [EC 1.2.1.24]. Le succinate entre alors dans le cycle de Krebs pour former après plusieurs transformations enzymatiques l' α -cétoglutarate. La glutamate dehydrogenase (GDH, E.C. 1.4.1.3), enzyme localisée dans la matrice mitochondriale, catalyse la transformation de l' α -cétoglutarate en glutamate. Un deuxième pool de glutamate provient de sa capture par les transporteurs EAAT2 principalement et EAAT1.

Il est bien établi que les astrocytes expriment spécifiquement la glutamine synthetase (GS, E.C. 6.3.1.2), une ligase qui a besoin d'ATP et d'une source d'ammonium pour transformer le glutamate en glutamine (Norenberg & Martinez-Hernandez 1979). La glutamine néosynthétisée est ensuite transférée aux neurones grâce à deux transporteurs de glutamine (système N et A) ayant des couplages énergétiques différents. La glutamine libérée dans l'espace extracellulaire par inversion des transporteurs SNAT3 (correspondant au système N des astrocytes) est ensuite capturée par les transporteurs SNAT1 et SNAT2 (correspondant au système A des neurones) où elle sera transformée en glutamate par la phosphate activated glutaminase (PAG, EC 3.5.1.2 (Kvamme, Roberg et al. 2000)). Cette réaction produit une molécule d'ammonium dans le neurone, réassimilée dans l'astrocyte, pour chaque glutamate formé (Marcaggi & Coles 2001). La PAG est préférentiellement exprimée dans les neurones, bien qu'une faible activité soit observée dans les cultures d'astrocytes, elle est a priori localisée sur la surface externe de la membrane interne mitochondriale lorsqu'elle est dans sa forme active (Bak et al 2008). Il existerait un pool dormant de PAG sur le feuillet interne de la membrane mitochondriale; cette forme soluble inactive de l'enzyme a une affinité plus faible pour la glutamine (K_m 30-40 mM) que la forme liée à la membrane (K_m 2 mM). Les principaux inhibiteurs de la PAG sont les produits de la réaction, le glutamate et l'ammonium, et le principal activateur est le phosphate (Hogstad et al 1988, Kvamme et al 2001). Le rôle de la PAG est très important pour l'approvisionnement en

INTRODUCTION

glutamate, en effet dans des tranches de cerveau de souris déficientes en PAG, la consommation de glutamine et l'accumulation de glutamate sont moins importantes que chez les souris sauvages (El Hage et al 2012).

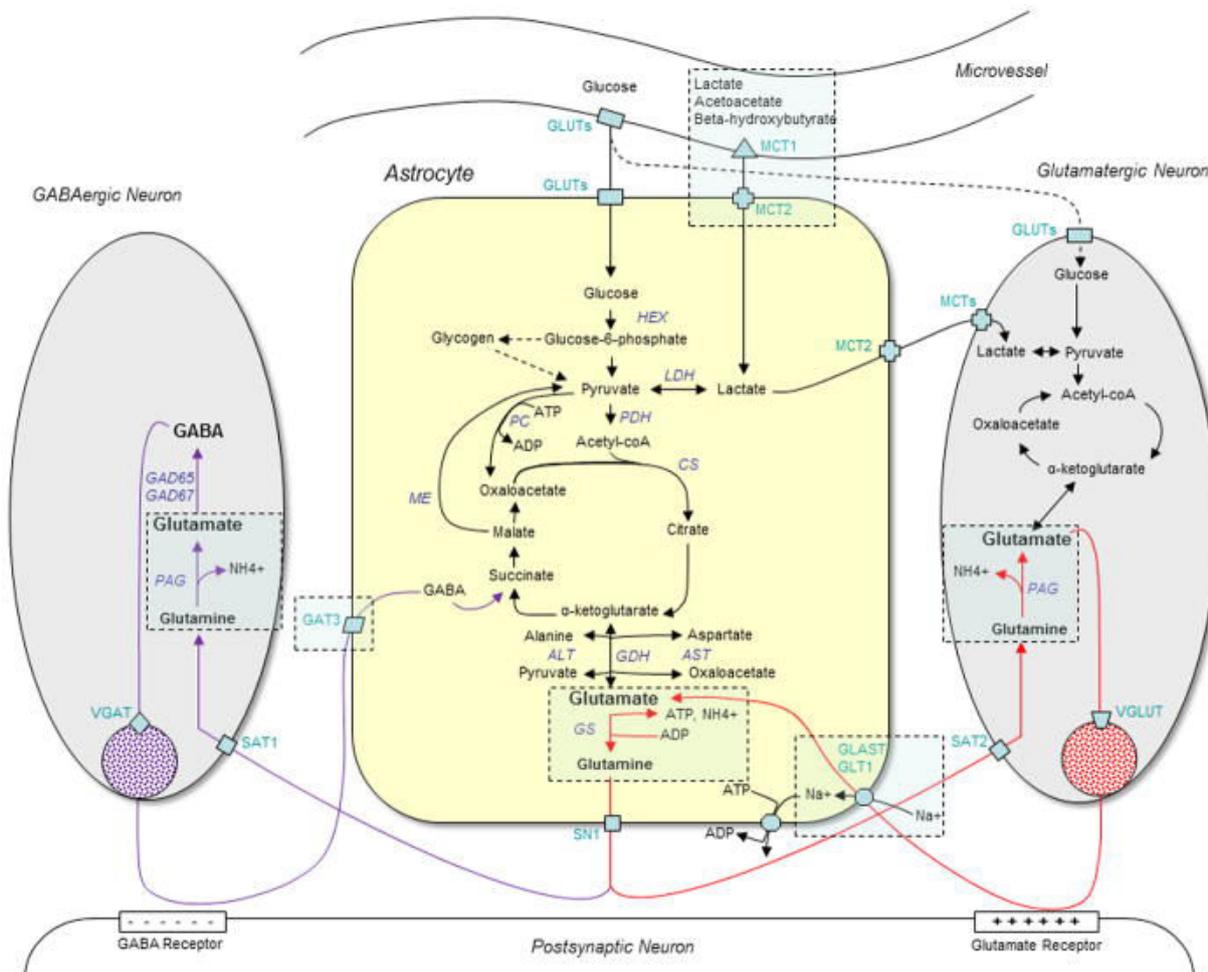


Figure IV-8 Schéma représentant quelques-unes des principales voies métaboliques et des compartiments cellulaires impliqués dans l'homéostasie du glutamate dans le cerveau (Coulter & Eid 2012)

IV.5.2. Les transporteurs de la glutamine

Les transporteurs membranaires astrocytaires et neuronaux de la glutamine ont un rôle essentiel dans l'approvisionnement du stock cytosolique de glutamate ou de GABA. Ils ne sont pas spécifiques pour la glutamine et peuvent également transporter d'autres acides aminés neutres. Les différents noms des transporteurs de glutamine inventés au moment de leur clonage et identification ont produit une certaine confusion dans leur nomenclature. Ils sont néanmoins tous regroupés dans la famille SLC38 couplé au sodium et nous utiliserons la nomenclature des Sodium-coupled Neutral Amino-acid Transporter (SNAT) (Mackenzie & Erickson 2004).

SNAT3 (SLC38A3) (Chaudhry et al 1999) et SNAT1 (SLC38A1) (Varoqui et al 2000) sont les premiers membres de la famille à avoir été clonés en raison de leur homologie de séquence

avec le transporteur vésiculaire d'acides aminés inhibiteurs VIAAT. La famille SLC38 comprend six gènes codant pour des transporteurs (SNAT1 à SNAT6) d'acides aminés neutres et dépendants du sodium (SNAT6 est un transporteur orphelin).

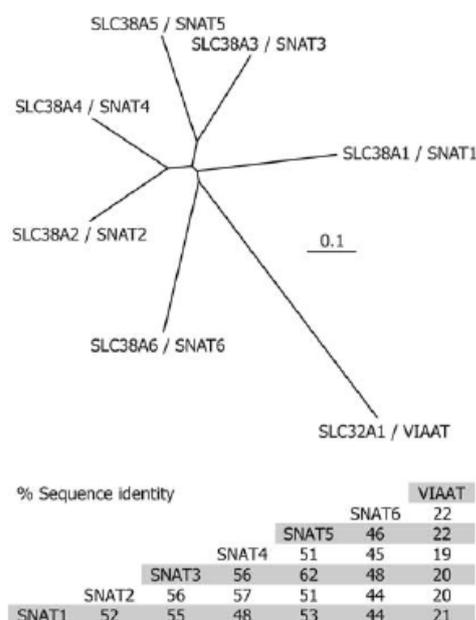


Figure IV-9 Homologie de séquence entre les transporteurs de la glutamine et VIAAT (Mackenzie & Erickson 2004)

Les membres de cette famille sont regroupés en deux systèmes, le système A pour les petits acides aminés neutres incluant l'alanine et le système N préférant la glutamine, l'asparagine et l'histidine. Les membres du système A fonctionnent comme des cotransporteurs dans lequel la translocation d'une glutamine est couplé au transport d'un ion Na^+ (Chaudhry et al 2002, Mackenzie et al 2003). Le système N cotransporte un acide aminé avec un Na^+ en échange d'un H^+ (Chaudhry et al 2001, Chaudhry et al 1999).

Le **système N** comprend les transporteurs SNAT 3 et 5 (Mackenzie & Erickson 2004).

SNAT3 est exprimé dans les astrocytes dans toutes les régions du système nerveux central. Son expression la plus importante est détectée dans les processus astrocytaires proches des synapses glutamatergiques, glycinergiques et GABAergiques (Boulland et al 2002). Dans plusieurs régions, comme l'hippocampe, le cervelet et les ganglions de la base, l'immunoréactivité de SNAT3 est plus élevée dans les processus astrocytaires associées aux synapses GABAergiques que ceux associés aux synapses glutamatergiques. Cette localisation de SNAT3 dans la glie, proche des synapses glutamatergiques et GABAergiques, fait de lui le principal transporteur facilitateur de l'efflux de glutamine des astrocytes.

Le **système A** comprend SNAT1, SNAT2 et SNAT4 (ce dernier est spécifique du foie). Les transporteurs du système A sont inhibés par le MeAIB. L'inhibition par le MeAIB appauvrit le pool de neurotransmetteurs dans les tranches de cortex et d'hippocampe (Mackenzie et al 2003).

SNAT1 et 2 ont un profil similaire de spécificité de substrat. Ils transportent les petits acides aminés neutres ou hydrophiles, incluant la glutamine, l'asparagine et l'histidine. SNAT1 montre une préférence pour la glutamine par rapport à tous les autres acides aminés avec un Km de 0,3 mM (Mackenzie et al 2003) alors qu'il est de 1,65 mM pour SNAT2.

SNAT1 permet la capture de glutamine dans les neurones excitateurs et inhibiteurs après sa libération par les astrocytes, alors que l'activité de transport SNAT2 est plutôt utilisée lorsque les acides aminés sont requis pour la croissance cellulaire ou l'augmentation de la synthèse des protéines.

IV.5.3. Distribution cellulaire et régulation de SNAT1 et 2

SNAT1 est localisé dans le cerveau principalement, SNAT2 est plus largement répandu, incluant le cerveau et la moelle épinière. SNAT1 est présent dans les neurones glutamatergiques et GABAergiques avec une localisation somatodendritique, excluant les terminaisons axonales et les épines (Armano et al 2002, Mackenzie et al 2003, Melone et al 2004).

L'expression de SNAT1 est importante dans les neurones GABAergiques du néocortex et de l'hippocampe, où son marquage par immunohistochimie n'apparaît pas uniquement sur le soma et les dendrites mais aussi dans les processus neuronaux incluant les segments axonaux (Solbu Tom et al 2010). Son expression n'est pas restreinte à la membrane plasmique, elle est aussi retrouvée dans des organelles intracellulaires colocalisées avec la syntaxine 6. Son marquage ubiquitaire est proche de celui de la GAD67.

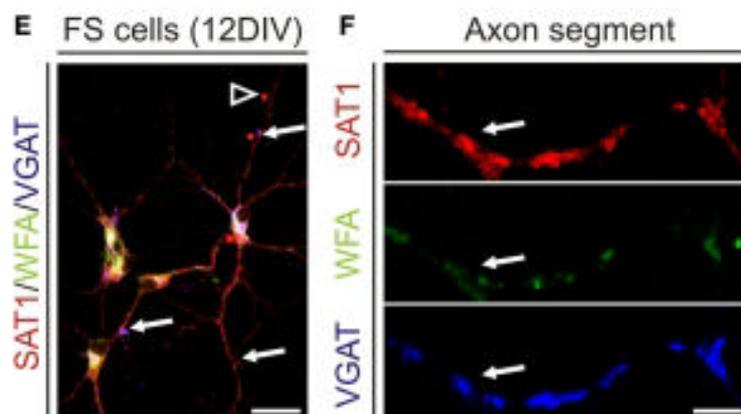


Figure IV-10 SNAT1 est localisé dans les interneurons PV⁺ de l'hippocampe en culture et ciblé dans les segments axonaux contenant VGAT (Solbu Tom et al 2010)

En revanche, l'expression de SNAT1 dans les terminaisons axonales est débattue. Dans des tranches de cortex cérébral de rat adulte, 0,07% des marquages punctiformes de SNAT1 sont des terminaisons axonales (Melone et al 2004), ce qui met en doute le rôle de SNAT1 dans un cycle glutamate/GABA-glutamine local pour réapprovisionner le pool de neurotransmetteurs au niveau de la terminaison. Dans des conditions similaires, le marquage de SNAT2 est également confiné au compartiment somatodendritique (Melone et al 2006).

Cependant dans des neurones d'hippocampe en culture, SNAT1 et 2 sont exprimés dans tous les compartiments neuronaux y compris les axones (Armano et al 2002). SNAT1 est présent jusqu'à la pointe du cône de croissance axonal alors que SNAT2 n'est pas observé dans la partie distale de l'axone incluant le cône de croissance. Dans les cultures matures SNAT1 et 2 sont exprimés dans le soma et presque tous les processus neuronaux. SNAT1 apparaît en cluster

membranaire et/ou pool intracellulaire, tandis que SNAT2 apparaît uniformément distribué dans les processus neuronaux. SNAT1 est très marqué dans les corps cellulaires et les dendrites, mais il est aussi détecté aux sites de contact synaptique, contrairement à SNAT2 qui est indétectable aux synapses.

Cette observation est supportée par l'enregistrement direct en patch-clamp de l'élément présynaptique du calyx de Held démontrant la présence d'un transporteur de la glutamine présynaptique possédant les propriétés du système A (Billups et al 2013). Cette étude montre que la capture présynaptique de glutamine peut être contrôlée dynamiquement par l'activité neuronale grâce à une régulation de l'expression des transporteurs à la membrane plasmique. L'exocytose des transporteurs est dépendante des SNAREs et du calcium alors que leur endocytose est dépendante de la clathrine. L'inhibition du transport de la glutamine par le MeAIB ($26 \pm 4\%$) entraîne une diminution de l'amplitude des mEPSCs, ce qui suggère que l'approvisionnement présynaptique en glutamate est partiellement dépendant du transport de glutamine. En sectionnant les axones entre CA3 et CA1 dans une tranche d'hippocampe, les terminaisons nerveuses excitatrices de la collatérale de Schaeffer sont séparées de leurs corps cellulaires tout en conservant la relation des structures présynaptiques avec les neurones post-synaptiques et les astrocytes environnants. Dans ces conditions, une stimulation alternée de périodes à haute fréquence (20 Hz) et de périodes de repos (0,2 Hz) entraîne une réduction de l'efficacité synaptique dépendante de l'activité, corrélée avec une libération réduite de glutamate. Cette dépression de la transmission est renforcée lorsque la glutamine synthétase astrocytaire est inhibée par la méthionine sulfoximine. Elle est au contraire empêchée par une application exogène de glutamine (Tani et al 2014). Ces résultats supportent le rôle physiologique du cycle glutamate-glutamine localisé au niveau synaptique pour le maintien de la synthèse de neurotransmetteurs excitateurs et la libération des vésicules pendant les périodes de forte activité.

Une étude a montré un lien direct entre le métabolisme du GABA et le contenu vésiculaire en GABA (Engel et al 2001). Dans les tranches en culture d'hippocampe de rat, l'inhibition de la dégradation du GABA en bloquant la GABA-transaminase par le γ -vinyl-GABA augmente la concentration de GABA intracellulaire ce qui se traduit par une augmentation de l'amplitude et de la fréquence des IPSCs miniatures. A l'inverse, bloquer la synthèse de GABA avec de l'acide mercaptopropionique donne le résultat opposé. Le contenu vésiculaire en neurotransmetteurs peut donc varier, cette variation étant dépendante de la concentration cytosolique. Mais alors est-ce que l'étape de remplissage peut influencer sur le cycle vésiculaire ? Quelques études indiquent que ce n'est pas le cas, puisque les différents groupes travaillant sur différents neurotransmetteurs observent un recyclage de vésicules vides, comme par exemple dans le cas d'une inhibition de l'acidification (Zhou et al 2000), d'un KO pour le transporteur vésiculaire (Croft et al 2005) ou d'une inhibition du transporteur vésiculaire (Parsons et al 1999, Wojcik et al 2004).

V. Les différents pools de vésicules

Il est bien établi qu'une stimulation répétée peut induire une facilitation ou une dépression de la transmission synaptique. Ces deux types de plasticité peuvent coexister pour un même neurone postsynaptique recevant des entrées inhibitrices distinctes ou sur des cibles différentes d'un même neurone GABAergique (Gupta et al 2000). Ces deux formes de plasticité se traduisent respectivement par une potentialisation ou une diminution de l'amplitude des IPSCs ; elles sont dites à court terme car l'amplitude initiale des IPSCs est restaurée rapidement après arrêt de la stimulation.

Différents mécanismes présynaptiques sous-tendent ces changements de probabilité de libération (Zucker & Regehr 2002). Ils mettent en jeu la régulation du calcium intracellulaire ou la dynamique de reformation du « readily releasable pool » de vésicules (RRP) (Zucker & Regehr 2002). L'importance des mécanismes de recyclage que nous avons décrit précédemment n'apparaît clairement que pendant des stimulations prolongées dépassant plusieurs centaines de potentiels d'action (Kraushaar & Jonas 2000a). Dans ce cas, le nombre de vésicules mobilisables devient le facteur limitant et la transmission converge vers une sorte d'état stationnaire lorsque le taux de reformation des vésicules équilibre l'exocytose des vésicules à chaque zone active (Kraushaar & Jonas 2000a). La cinétique de cette dépression, qui est dépendante de la dynamique des pools de vésicules et de leur remplissage en neurotransmetteur, est moins bien caractérisée (Zucker & Regehr 2002).

La transmission de l'information à chaque bouton synaptique est de nature stochastique ; elle dépend de la probabilité de libération d'au moins une vésicule du RRP en réponse à un potentiel d'action (Murthy et al 1997). Il est notoirement difficile de corrélérer l'anatomie des synapses, qui doit être réalisée en microscopie électronique, avec les propriétés de libération déduites des enregistrements électrophysiologiques (Branco & Staras 2009). Il a été proposé que chaque zone active ne puisse libérer qu'une seule vésicule (univesicular release), ce qui limite fortement le transfert d'information; toutefois les évidences récentes suggèrent qu'une libération multivésiculaire synchrone ou asynchrone serait plus proche de la réalité, rendant difficile de trouver une corrélation anatomique (Rudolph et al 2015). Le RRP est donc estimé de manière opérationnelle, correspondant au nombre de vésicules libérables pendant une stimulation à haute fréquence sans possibilité de recyclage (Dobrunz & Stevens 1997, Hanse & Gustafsson 2001b, Murthy et al 2001, Schneggenburger et al 1999). Celui-ci intervient pour ajuster la dynamique des pools de vésicules jusqu'à l'état stationnaire apparent. Nous développerons ci-après les différents pools de vésicules et leur redistribution en fonction de l'activité (Goda & Stevens 1994, Murthy et al 2001, Ratnayaka et al 2012, Waters & Smith 2002).

V.1. Les pools de vésicules synaptiques

Les petites synapses de l'hippocampe contiennent environ 200 vésicules (Harris & Sultan 1995, Schikorski & Stevens 1997) qui se distribuent en trois pools majeurs (Denker & Rizzoli 2010, Fowler & Staras 2015, Rizzoli & Betz 2005) :

- Le **total recycling pool** (TRP) représente la population totale de vésicules qui peuvent s'engager dans le recyclage évoqué par la stimulation, il est composé par deux pools :
 - Le **recycling pool** (RP, reserve pool) représente le TRP sans le RRP.
 - Le **readily releasable pool** (RRP) est le pool de vésicules recyclantes qui sont dockées et primées pour la libération, elles sont immédiatement libérées lors d'une stimulation.
- Le **resting pool** (RtP) représente le reste du pool total de vésicules qui ne peuvent pas subir la fusion entraînée par l'activité même dans des conditions de stimulation saturantes.

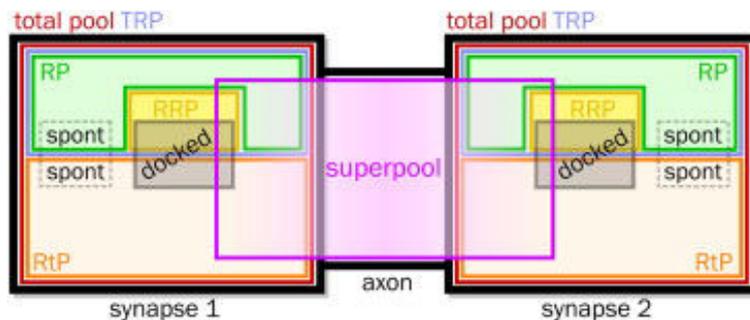


Figure V-1 Représentation schématique des principaux pools (Fowler & Staras 2015)

V.1.1. Le pool recyclant total

Le **TRP** représente une fraction du pool total de vésicules dans la synapse (Darcy et al 2006, Fernandez-Alfonso & Ryan 2008, Harata et al 2001b, Li et al 2005, Marra et al 2012). Il correspond au pool mobilisable, c'est-à-dire le nombre total de vésicules qui participent à l'exo et à l'endocytose pendant une stimulation prolongée (Sudhof 2004). Sa taille peut varier considérablement selon les études, de $\approx 15\text{-}20\%$ (Harata et al 2001b, Marra et al 2012) à plus de 70% (Ikeda & Bekkers 2009, Rose et al 2013) selon les techniques de mesure utilisées, le choix des préparations et la fréquence de stimulation appliquée. Le TRP représente donc seulement une fraction de toutes les vésicules identifiées morphologiquement par la capture de FM lors d'une forte stimulation dans les terminaisons hippocampiques (Fernandez-Alfonso & Ryan 2008, Harata et al 2001b, Ikeda & Bekkers 2009). Le pic du signal FM normalisé à celui d'une vésicule permet une estimation à 30 vésicules dans les terminaisons nerveuses de l'hippocampe (Harata et al 2001a, Murthy et al 1997), estimation confirmée par l'utilisation des QD (Zhang et al 2007). Des résultats récents suggèrent qu'*in vivo*, le pool de vésicules effectivement recyclantes pour des stimulations physiologiques serait de l'ordre de 1 à 5% (Denker et al 2011a), mais des valeurs plus importantes ont aussi été trouvées (5 à 23%) (Marra et al 2012). Compte tenu de la corrélation directe entre la taille du TRP et la probabilité de libération synaptique (Murthy et al 1997, Waters & Smith 2002), la modulation de sa taille peut influencer l'efficacité synaptique et donc la transmission synaptique (Willeumier et al 2006).

V.1.2. Le pool de repos

Le **RtP** peut voir sa taille varier entre 15 et 85% de l'ensemble des vésicules puisque le TRP est une fraction variable du pool total de vésicules. Les vésicules de repos ont été observées, par exemple, dans les neurones d'hippocampe en culture (Fernandez-Alfonso & Ryan 2008, Harata et al 2001a, Harata et al 2001b, Opazo et al 2010). La transmission peut être maintenue sans sa mobilisation (Denker et al 2011a, Marra et al 2012). Ce pool est accessible par la pHluorin, les quantum dots et la photoconversion des sondes FM. Il apparaît comme réfractaire à l'exocytose en réponse à une stimulation électrique ou à une courte application de potassium en forte concentration. Quelle serait la fonction d'un pool majoritaire de vésicules au repos, ne participant pas à la transmission synaptique ? Pour expliquer ce paradoxe, le groupe de Rizzoli proposent que les vésicules du RtP agissent comme un tampon pour les protéines accessoires solubles impliquées dans le recyclage vésiculaire (Denker et al 2011b). Le RtP peut aussi agir comme un donneur et/ou accepteur de vésicules pour le TRP (Jung et al 2014, Kim & Ryan 2010, Marra et al 2012, Ratnayaka et al 2012). Cette fonction de réservoir de vésicules recrutables influencée par la plasticité pourrait expliquer la variabilité de sa taille.

V.1.3. Le pool prêt à être libéré immédiatement

Le **RRP** comprend les premières vésicules qui subissent la fusion pendant une activité synaptique (Dobrunz & Stevens 1997, Rosenmund & Stevens 1996). Ces vésicules ont la probabilité de fusion la plus élevée et contribuent de manière importante à la force synaptique (Dobrunz & Stevens 1997, Waters & Smith 2002). Dans les neurones de l'hippocampe, sa taille est estimée à 5-15 vésicules (Dobrunz & Stevens 1997, Murthy & Stevens 1998, Stevens & Tsujimoto 1995). Ce pool est accessible par l'application d'une solution hypertonique (Rosenmund & Stevens 1996, Stevens & Williams 2007) ou par une stimulation électrique de 10-50 PAs à 10-20 Hz (Murthy & Stevens 1998, Park et al 2012, Waters & Smith 2000). La taille du RRP et la probabilité de libération sont corrélées (Dobrunz 2002, Dobrunz & Stevens 1997, Matz et al 2010, Murthy et al 2001), la modulation de sa taille peut avoir un rôle dans la plasticité à long terme. Par exemple, l'activation de la PKC augmente la taille du RRP (Stevens & Sullivan 1998, Waters & Smith 2000) et augmente son taux de réapprovisionnement en vésicules (Stevens & Sullivan 1998). Une réduction de la taille du RRP a été établie dans les synapses subissant une dépression à long terme (Goda & Stevens 1998), alors que le BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) entraîne un accroissement de la taille du pool pendant la potentialisation à long terme (Tyler et al 2006).

Dans les petites synapses de l'hippocampe, on trouve environ 10 vésicules synaptiques dockées (Harris & Sultan 1995, Schikorski & Stevens 1997). Ce petit pool de vésicules dockées est associé à la zone active, visible et facilement reconnaissable en microscopie électronique sans marquage préalable (Watanabe et al 2013b). Leur position coïncide avec l'aire de la zone active et la taille de la densité post synaptique. Toutes les vésicules dockées n'ont pas forcément un contact membrane-membrane avec la zone active, mais sont plutôt attachées par des liens de longueur variable révélés par les approches de congélation à haute pression (Fernández-Busnadiego et al 2010). La taille du pool de vésicules dockées est corrélée avec la taille du RRP (Murthy et al 2001, Schikorski & Stevens 2001, Watanabe et al 2013b) et la probabilité de

libération synaptique (Branco et al 2010). Seule une fraction des vésicules synaptiques du RRP est dockée avant la libération (Darcy et al 2006, Harata et al 2001b, Marra et al 2012, Ratnayaka et al 2012).

Il existe également dans le RRP un petit sous-groupe de vésicules pré-primées de taille très variable et rapidement déplété (Taschenberger et al 2016), entraînant une variabilité de la probabilité de libération entre les synapses. Cette hétérogénéité a été observée parmi les synapses hippocampiques individuelles, en tranches (Dobrunz & Stevens 1997) et en culture (Murthy et al 1997), ainsi qu'à des sites de libération unique dans la région CA1 de l'hippocampe (Hanse & Gustafsson 2001a, Hanse & Gustafsson 2001b).

V.1.4. Le pool recyclant ou pool de réserve

Le **RP** est égal à environ trois fois le RRP aux synapses de l'hippocampe, il contient 17 à 20 vésicules (Murthy & Stevens 1999). Dans les terminaisons hippocampiques, le RRP est déplété en quelques secondes à 10-40 Hz (Stevens & Williams 2007), il doit alors être reformé. C'est le RP qui permet de le remplir après sa déplétion. La constante de repopulation du RRP au repos est d'environ 5 à 10 secondes à température ambiante dans les boutons hippocampiques (Murthy & Stevens 1999).

Les vésicules du RRP (Schikorski 2014, Schikorski & Stevens 2001) et celles du TRP (Darcy et al 2006, Harata et al 2001b, Marra et al 2012) sont distribuées à travers la terminaison avec un biais vers le site de libération (Marra et al 2012, Schikorski & Stevens 2001). Le marquage des vésicules avec des nanoparticules révèle une corrélation entre l'apposition de la vésicule à la zone active et sa probabilité de libération (Park et al 2012). La position physique de la vésicule par rapport au site de libération est un déterminant important pour la force de la synapse. Il existe une relation positive entre le pool de vésicules dockées et le nombre de vésicules du RRP (Murthy et al 2001, Schikorski & Stevens 2001, Watanabe et al 2013b) mais le pool docké n'est pas un corolaire morphologique du RRP. Un modèle basé sur l'attachement des vésicules synaptiques du RRP dans une ligne s'étendant à partir de chaque site d'ancrage de la zone active semble plus compatible avec la position physique des vésicules dans la terminaison et avec leurs caractéristiques de réutilisation (Gabriel et al 2011).

V.2. Echange de vésicules entre synapses

Il est généralement admis que les synapses fonctionnent comme des unités autonomes, avec un recyclage vésiculaire individuel et peu de mélange entre les terminaux. Ce concept est en accord avec les résultats obtenus à partir de neurones hippocampiques en culture, qui indiquent qu'après stimulation la synaptobrevine est récupérée à partir de la membrane présynaptique et des régions axonales adjacentes par endocytose, et est ensuite adressée au groupe de vésicules (Li & Murthy 2001). De la même manière, la synapsine, protéine supposée participer à l'interconnexion des vésicules synaptiques, diffuse de la synapse vers l'axone pendant l'activité et revient à l'arrêt de la stimulation (Chi et al 2001).

Cependant, des études récentes ont montré un flux important de vésicules entre boutons: les vésicules (et même des groupes de vésicules compétentes pour la libération) marquées avec des sondes FM dans les neurones hippocampiques en culture sont transportées le long des

INTRODUCTION

axones à la fois de manière antérograde et rétrograde (Darcy et al 2006, Krueger et al 2003). La méthode de FRAP (un procédé impliquant le photoblanchiment d'une petite partie de la préparation suivie par l'observation de la récupération de la fluorescence dans cette région) a montré l'arrivée de vésicules dans des boutons synaptiques provenant de boutons voisins. Avec la microscopie de super-résolution, l'échange entre les synapses peut non seulement être confirmé, mais aussi suivi au niveau de la vésicule unique (Kamin et al 2010, Westphal et al 2008). Récemment, l'existence de vésicules non confinées à la synapse a également été montrée dans des tranches d'hippocampe (Staras et al 2010) et sont désignées par le terme « superpool ».

Le « **superpool** » est donc une population de vésicules non confinée à la synapse mais partagée dynamiquement le long des axones entre plusieurs terminaisons présynaptiques, $\approx 4\%$ du pool total par minute par synapse (Staras et al 2010). Ce trafic extrasynaptique des vésicules synaptiques a donc d'abord été montré dans des cultures matures d'hippocampe (Darcy et al 2006, Krueger et al 2003) puis dans des tranches d'hippocampe (Staras et al 2010) et enfin in vivo (Herzog et al 2011). Ces vésicules conservent leur compétence de fusion durant leur transit le long de l'axone (Darcy et al 2006, Ratnayaka et al 2011). Ce superpool est composé de vésicules du RP et du RtP en nombre égal et bougent le long de l'axone en petits groupes de vésicules mixtes (Darcy et al 2006, Fernandez-Alfonso & Ryan 2008, Kamin et al 2010), par diffusion libre ou dépendante de l'actine ou des moteurs sur les microtubules (Darcy et al 2006, Westphal et al 2008). Ce pool peut être une ressource extrasynaptique de vésicules recrutables pour les terminaisons leur permettant de moduler chacune leur capacité de libération synaptique et ainsi faciliter les changements de poids synaptique impliqués dans la plasticité (Staras & Branco 2010). Ce trafic extrasynaptique peut être régulé par le BDNF (Staras et al 2010), la synapsine (Orenbuch et al 2012) ou encore l' α -synucléine (Scott & Roy 2012).

Ainsi les pools définis précédemment ne sont plus limités à des boutons synaptiques simples, mais peuvent être échangés entre les synapses.

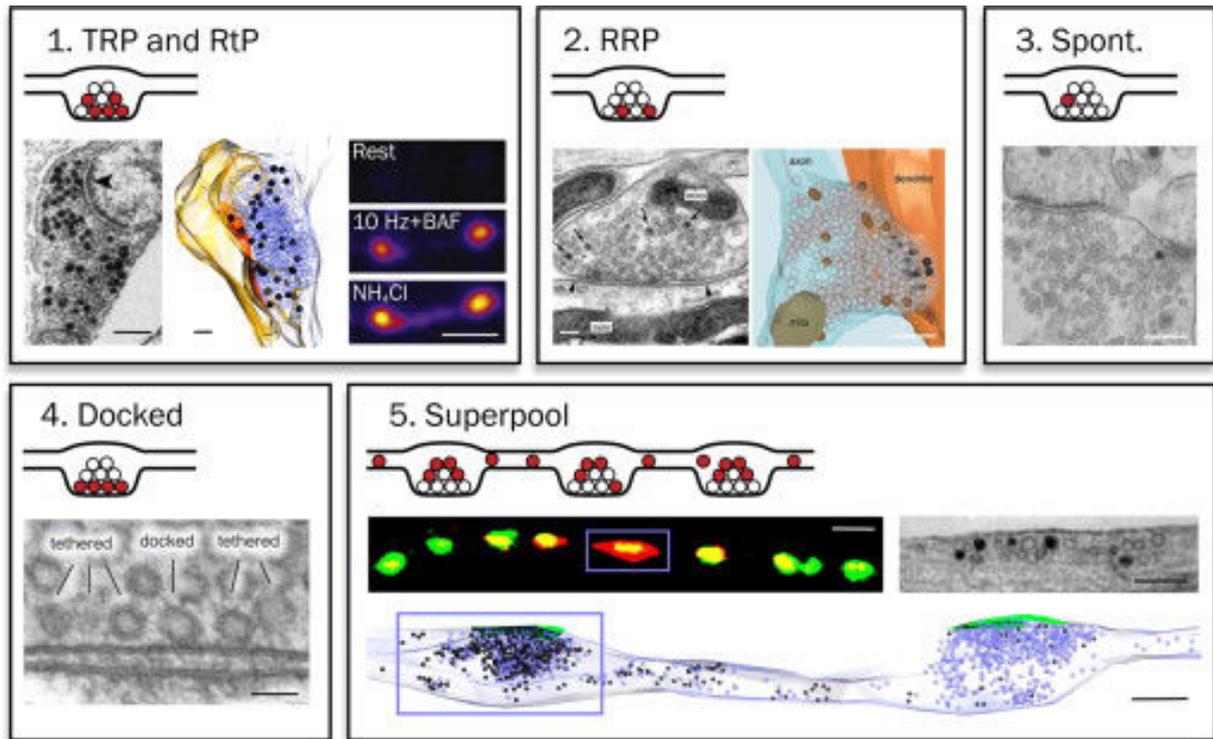


Figure V-2 Visualisations schématisque et expérimentales de la localisation des principaux pools (Fowler & Staras 2015)

V.3. Les techniques d'étude de la dynamique des pools de vésicules

Des trains de stimulation (c'est-à-dire plus d'une centaine de PAs) entraînent la mobilisation de vésicules libérables ou de vésicules recyclantes. De nombreuses méthodes permettent d'étudier les pools de vésicules et leur dynamique.

La pHluorin est une GFP mutée dont l'intensité de fluorescence est dépendante du pH ; elle est éteinte au pH acide des vésicules. Pour suivre les cycles d'exo et endocytose, la pHluorin doit être fusionnée à une protéine vésiculaire de telle sorte qu'elle soit localisée dans la lumière des vésicules. Sa fluorescence, normalement éteinte dans les vésicules acides, est révélée pendant l'exocytose lorsqu'elle est exposée au pH extracellulaire neutre (Fernandez-Alfonso & Ryan 2004, Kavalali & Jorgensen 2014, Miesenbock et al 1998, Sankaranarayanan & Ryan 2000).

Le recyclage vésiculaire peut aussi être visualisé grâce à des petites sondes lipophiliques (FM5-95, FM1-43) dont la fluorescence augmente 100 fois une fois insérée dans le feuillet externe de la membrane plasmique sans possibilité de translocation (Fernandez-Alfonso & Ryan 2004, Kavalali & Jorgensen 2014, Ryan et al 1993). Lorsque la sonde est appliquée sur des neurones pendant une stimulation répétée, elle est internalisée par endocytose sur le feuillet interne des vésicules où elle reste fluorescente jusqu'à l'exocytose suivante, les sondes accrochées sur la membrane plasmique disparaissant pendant des lavages successifs. Après ouverture du pore de fusion, la sonde diffuse dans la membrane plasmique et la fluorescence est perdue lorsqu'elle est lavée.

INTRODUCTION

Les synapses chargées avec une sonde FM peuvent être exposées à un agent chimique, le DAB, dont l'illumination prolongée provoque la conversion en un produit dense aux électrons que l'on visualise en microscopie électronique (Harata et al 2001b).

Les quantum dots sont des nanoparticules semi-conductrices. L'avantage de cette technique est la stabilité et la brillance de leur photoluminescence. La taille du QD permet son absorption dans les vésicules pendant l'endocytose dans un rapport 1: 1. Il est seulement libéré lors de l'exocytose, ce qui implique une fusion complète de la vésicule chargée par le QD dans la membrane plasmique (Zhang et al 2009).

En plus des méthodes optiques, l'exocytose et l'endocytose peuvent être quantifiées avec une très haute résolution temporelle par des techniques électrophysiologiques de mesure de capacitance, qui est proportionnelle à la surface membranaire (Wölfel & Schneggenburger 2003).

La libération présynaptique peut être induite par une stimulation à haute fréquence, par l'application d'une solution de sucrose hypertonique, par l'application d'une concentration élevée de potassium, par des brefs sauts de potentiel dépolarisant en voltage-clamp ou encore par photolyse de composés calciques cagés dans le bouton présynaptique.

V.4. La pHluorin

L'expression vésiculaire de la pHluorin permet de visualiser les cycles d'exo- et endocytose (Miesenbock et al 1998), cette technique a fortement contribué à la compréhension des pools et du recyclage vésiculaire au cours des dernières années (Denker & Rizzoli 2010, Rizzoli 2014, Rizzoli & Betz 2005). La possibilité de suivre l'exocytose et l'endocytose est également l'une des principales difficultés de cette technique: on visualise une seule variation nette de la fluorescence, qui représente la combinaison des deux phénomènes. Par conséquent, pour obtenir des informations sur les pools de vésicules, il faut utiliser des inhibiteurs de la H⁺-vATPase, tels que la bafilomycine, qui en bloquant la réacidification, permettent l'enregistrement d'un signal cumulatif d'exocytose.

Dans les neurones hippocampiques en culture, une augmentation rapide de la fluorescence est souvent observée initialement pendant une stimulation (typiquement de 300 PAs à 20 Hz), pouvant correspondre à l'exocytose du RRP, étape suivie par une phase d'exocytose plus lente correspondant probablement à la libération du pool recyclant (Fernández-Alfonso & Ryan 2004, Fredj & Burrone 2009, Sankaranarayanan & Ryan 2000). Cette observation est parallèle à celle faite dans les études utilisant des sondes FM où l'on observe une perte initiale rapide du FM, suivie d'une phase de libération plus lente dans la plupart des synapses.

La pHluorin permet d'estimer la taille des pools vésiculaires (Fernandez-Alfonso & Ryan 2008, Fredj & Burrone 2009): les synapses fortement stimulées vont libérer le TRP, puis le R₁P sera révélé secondairement avec de l'ammonium qui neutralise le pH des vésicules (Roos & Boron 1981). Lorsque l'on considère ces estimations, il faut cependant rappeler que le traitement à l'ammonium neutralise tous les compartiments, d'autres types de vésicules ou d'organelles acides pourraient participer au signal fluorescent s'ils hébergent une fraction de la pHluorin (Mitchell & Ryan 2004).

Les résultats des expériences avec la pHluorin semblent en accord avec le modèle à trois pools: un pool libérable, avec une libération initiale rapide (RRP) suivie d'une libération plus lente (RP). Lorsque les neurones sont stimulés en continu à 5 Hz ou à 30 Hz en présence de bafilomycine, la fluorescence augmente linéairement pour atteindre la même intensité après 900 PA, soit une fraction de la fluorescence enregistrée en présence d'ammonium (Fernández-Alfonso & Ryan 2004). Un pool réfractaire existe, correspondant au RtP. L'exocytose de ce pool non libérable peut être induite par des fréquences de stimulation inférieures, comme dans les expériences d'électrophysiologie de (Ikeda & Bekkers 2009). En effet, dans les cultures d'hippocampe, la stimulation à 0,2 Hz pendant plusieurs minutes libère ce qui semble être la majorité des vésicules, en dépit de leur réticence à être libérées lors d'une stimulation plus forte (Ikeda & Bekkers 2009).

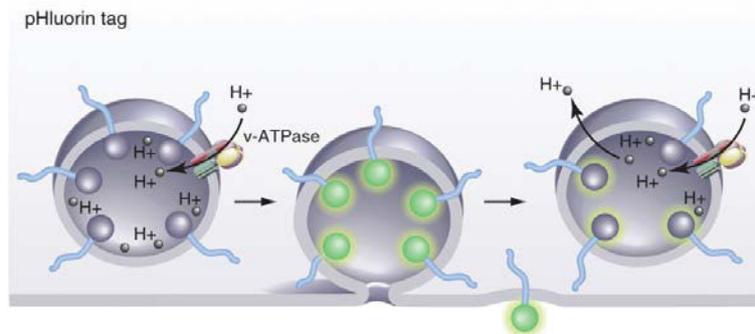


Figure V-3 Représentation schématique de la fluorescence d'une protéine vésiculaire fusionnée à la pHluorin lors d'un cycle d'exo-endocytose (Kavalali & Jorgensen 2014)

VI. Déterminants postsynaptiques de la transmission GABAergique

La plasticité à court terme, résulte principalement de changements présynaptiques de la libération du neurotransmetteur, mais des mécanismes postsynaptiques comme la désensibilisation des récepteurs ou la signalisation métabotrope ont également été décrits.

L'origine présynaptique ou postsynaptique de la variation d'amplitude des IPSCs peut être définie grâce à plusieurs paramètres dont les principaux utilisés sont le paired pulse ratio (PPR), l'amplitude et la fréquence des courants miniatures ainsi que le coefficient de variation.

Le PPR est défini comme le rapport des amplitudes entre la deuxième et la première réponse post-synaptique après une double stimulation rapprochée. La paired pulse facilitation (PPF) est généralement attribuée aux effets dus à une élévation résiduelle de la concentration de Ca^{2+} (Zucker & Regehr 2002). La paired pulse depression (PPD) est généralement attribuée à l'épuisement du RRP (Zucker & Regehr 2002). Par ailleurs, la dépression peut aussi résulter de la rétro activation de récepteurs présynaptiques ou encore de processus postsynaptiques tels que la désensibilisation des récepteurs (Zucker & Regehr 2002).

La localisation de la modulation synaptique peut être identifiée par l'utilisation du coefficient de variation (Clements & Silver 2000), qui représente la variance en fonction de la moyenne des courants postsynaptiques dont la représentation graphique est une parabole. Une modification présynaptique de la force synaptique change le degré de courbure de la parabole et une modification postsynaptique la pente initiale de la parabole.

Le GABA active deux classes différentes de récepteurs : des récepteurs ionotropiques $GABA_A$ et des récepteurs métabotropiques $GABA_B$. De plus on distingue une inhibition synaptique phasique et une inhibition tonique dont l'origine est débattue (Farrant & Nusser 2005).

VI.1. Les récepteurs GABA_A

VI.1.1. Structure et diversité moléculaire des récepteurs GABA_A

Les récepteurs GABA_A appartiennent à la superfamille des canaux ioniques « Cys-loop » activés par un ligand (Sigel & Steinmann 2012) dont l'archétype est le récepteur nicotinique. Les récepteurs GABA_A sont des pentamères hétéromériques, c'est à dire formé par l'assemblage de différentes sous-unités: $\alpha 1$ – $\alpha 6$; $\beta 1$ – $\beta 3$, $\gamma 1$ – $\gamma 3$, $\rho 1$ – $\rho 3$; ϵ , δ , θ et π , qui sont codées par 19 gènes chez l'homme (Miller & Aricescu 2014). Cette hétérogénéité moléculaire explique la diversité fonctionnelle des récepteurs synaptiques et extrasynaptiques.

L'isoforme la plus fréquente chez l'adulte est formée par l'assemblage des sous unités $\alpha 1$, $\beta 2$ et $\gamma 2$, arrangée sous la forme d'un complexe $\gamma 2 : \beta 2 : \alpha 1 : \beta 2 : \alpha 1$ dans le sens antihoraire autour d'un pore central formé par les segments transmembranaires M2 de chaque sous unité (Sieghart et al 1999).

La structure d'un récepteur homomérique GABA_A- $\beta 3$ a été déterminée à une résolution de 3 Å (Miller & Aricescu 2014). Vu perpendiculairement à l'axe central pseudo-symétrique des 5 sous-unités, le récepteur ressemble à un cylindre de 110 Å de hauteur, avec un diamètre allant de 60 à 80 Å, qui traverse la membrane plasmique et forme une protrusion de 65 Å dans l'espace extracellulaire. Ce domaine extracellulaire comprend les sites de liaison du GABA. Vu du dessus, le pentamère a une forme de beignet, entouré par 15 N-glycanes (trois par sous-unité). Chaque domaine extracellulaire (ECD) comprend une hélice α amino-terminale ($\alpha 1$) suivi de dix brins β pliés en un sandwich β recroquevillé. Une deuxième hélice α ($\alpha 2$), entre les brins $\beta 3$ et $\beta 4$, est située sous l'hélice $\alpha 1$. Quatre hélices supplémentaires (M1-M4) par sous-unité sont réunies pour créer le domaine transmembranaire pentamérique, avec les segments M2 délimitant le pore qui se rétrécit lorsqu'il traverse la membrane vers le côté intracellulaire.

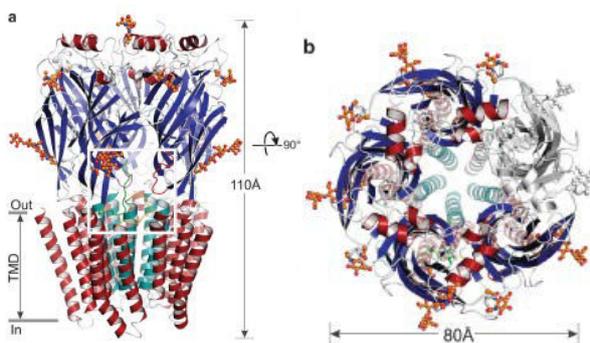


Figure VI-1 Structure cristallographique du GABA_AR- $\beta 3$ a) Vue parallèle à la membrane plasmique b) Vue de l'espace extracellulaire (fente synaptique) (Miller & Aricescu 2014)

VI.1.2. Site de liaison du GABA

Les récepteurs GABA_A possèdent deux sites de liaison pour le GABA (Baumann et al 2003). Ils sont situés aux interfaces entre les sous-unités α et β . L'activation du canal Cl⁻ peut avoir lieu lorsque le récepteur GABA_A est monoligandé, mais elle est favorisée environ 60 fois lorsque le récepteur est diligandé, le site 2 ayant une affinité trois fois plus forte (Baumann et al 2003).

INTRODUCTION

VI.1.3. Propriétés biophysiques des récepteurs GABA_A

La conductance élémentaire des récepteurs GABA_A est de 25-28 pS (Angelotti & Macdonald 1993, Fisher & Macdonald 1997, Verdoorn et al 1990). Le canal est perméant pour les ions Cl⁻ et HCO₃⁻, avec une perméabilité relative PHCO₃⁻/PCl⁻ d'environ 0,2 (Trigo et al 2008).

VI.1.4. Shunt et hyperpolarisation : Les deux composantes de l'inhibition GABAergique

Classiquement, on distingue deux composantes dans l'inhibition GABAergique. La première résulte du shunt électrique produit par l'ouverture des canaux Cl⁻ qui diminue la résistance membranaire du soma et des dendrites et donc l'amplitude des réponses synaptiques excitatrices (Higley 2014). Cette composante de shunt est principalement responsable de l'inhibition périsonotique produite par les BC sur les cellules principales (Vida et al 2006). La deuxième composante de l'inhibition n'apparaît que tardivement, dans les neurones matures, lorsque le potentiel de Nernst du Cl⁻ est plus hyperpolarisé que le potentiel de membrane. Cette composante d'hyperpolarisation membranaire n'est pas observée dans les neurones immatures, l'activation des récepteurs GABA_A produisant au contraire une dépolarisation membranaire indiquant que le potentiel de Nernst du Cl⁻ est plus dépolarisé que le potentiel de membrane.

Le changement de polarité des courants Cl⁻ entre les neurones immatures (entrant) et matures (sortant) est attribué à des différences d'expression durant le développement postnatal de deux transporteurs de chlore électroneutres (Ben-Ari 2002b, Ben-Ari et al 2007, Kaila et al 2014). Le transporteur NKCC1 (cotransporteur Na⁺-K⁺-2Cl⁻) est responsable de l'accumulation de Cl⁻ dans les neurones immatures alors que l'expression tardive de KCC2 (cotransporteur K⁺-Cl⁻) au soma et dans les dendrites est indispensable pour extruder le Cl⁻ et abaisser sa concentration intracellulaire. Ainsi, de multiples évidences in vitro utilisant la technique de patch perforé, qui ne perturbe pas la concentration intracellulaire de chlore, ont montré que l'expression de KCC2 dans les neurones matures était associée aux réponses hyperpolarisantes du GABA, ce qui éloigne le potentiel de membrane du seuil de déclenchement des potentiels d'action.

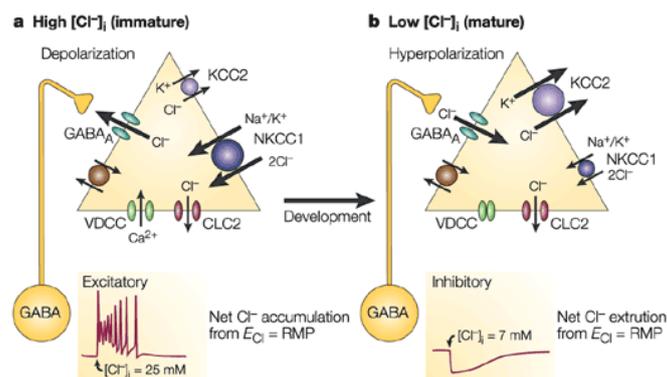


Figure VI-2 L'expression précoce de NKCC1 et tardive de KCC2 détermine les changements développementaux de la concentration de Cl⁻ interne (Ben-Ari 2002a)

KCC2 n'est pas exprimé dans les axones, expliquant la genèse d'un gradient subcellulaire de Cl⁻ entre les compartiments somatodendritique et axonal à l'origine de la dépolarisation axonale produite par l'activation des récepteurs GABA_A présynaptiques (Trigo et al 2008). Les autorécepteurs GABAergiques sont donc excitateurs dans les segments distaux de l'axone mais

pas au niveau du segment initial contrôlé par les terminaisons axo-axoniques qui sont considérées comme inhibitrices.

VI.1.5. Transmission GABAergique phasique et tonique

Les courants postsynaptiques inhibiteurs (nous utiliserons l'acronyme anglais : IPSCs) évoqués par de brefs transitoires de GABA libéré dans la fente synaptique correspondent à un transfert d'information phasique. Cette transmission synaptique rapide nécessite des concentrations élevées de GABA (0,3-1,0 mM) dans la fente pendant un temps court (<1 ms) (Mody & Pearce 2004). L'amplitude des IPSCs est directement proportionnelle au nombre de récepteurs GABA_A activés. En conséquence, toute variation du nombre, de la composition, ou de l'état des récepteurs GABA_A postsynaptiques ou de la quantité de GABA libérée par la terminaison (ie. univésiculaire ou multivésiculaire, quantité de GABA contenue par vésicule) est susceptible de modifier la réponse postsynaptique. Les récepteurs synaptiques à basse affinité contiennent généralement une sous-unité γ (Sieghart & Sperk 2002). Les propriétés d'activation, désactivation et de désensibilisation peuvent varier considérablement d'une isoforme à une autre, reflétant les différences d'affinité pour le GABA (Jones et al 1998, Lüscher & Keller 2004, Stell & Mody 2002, Verdoorn et al 1990).

Il a été montré, initialement dans des tranches de cervelet, que les inhibiteurs spécifiques des récepteurs GABA_A comme le SR95531 (gabazine) ou la bicuculine bloquaient les IPSCs GABAergiques phasiques mais diminuaient aussi le courant de maintien des neurones postsynaptiques. Cette inhibition du courant stationnaire a été retrouvée dans la plupart des structures dont l'hippocampe. Elle révèle une composante tonique de l'inhibition GABAergique liée à l'activation des récepteurs GABA_A par le GABA extracellulaire dont l'origine est encore débattue (inversion des transporteurs de GABA, concentration extracellulaire à l'équilibre, libération multivésiculaire ou extrasynaptique)(Farrant & Nusser 2005, Kullmann et al 2005). Cette inhibition tonique est médiée par des récepteurs GABA_A contenant la sous-unité δ , connus pour être localisés exclusivement de manière extrasynaptique (Nusser et al 1998). Des études expérimentales et théoriques montrent que ce courant tonique GABA est suffisant pour réduire l'excitabilité du neurone (Semyanov et al 2004).

VI.1.6. Variation des IPSCs GABAergiques et régulation postsynaptique des récepteurs GABA_A synaptiques

Dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe, le mouvement des récepteurs GABA_A dans le compartiment synaptique est rapide comparé à l'importation très lente de nouveaux récepteurs à la surface membranaire (Thomas et al 2005). La voie la plus probable pour importer des récepteurs à la synapse est la diffusion dans la membrane à partir des domaines extrasynaptiques. Cette diffusion latérale entre domaines extrasynaptique et synaptique apparaît très dynamique et offre aux neurones un mécanisme important pour moduler l'efficacité des synapses inhibitrices sur une courte période de temps.

Le trafic membranaire des récepteurs à la synapse est fortement régulé. Ainsi, il a été montré que la protéine kinase A réduit l'amplitude des courant miniatures dans les cellules pyramidales de CA1, alors que l'effet opposé est observé avec la protéine kinase C dans les cellules granulaires (Poisbeau et al 1999). Ces changements d'amplitude sont associés à des modifications du nombre de récepteurs post-synaptiques.

VI.2. Les récepteurs GABA_B

Les récepteurs métabotropiques GABA_B sont couplés aux protéines G et influencent la transmission synaptique dans une échelle de temps plus lente (de la subseconde à la minute) que les récepteurs GABA_A (Gassmann & Bettler 2012).

VI.2.1. Composition et organisation du récepteur GABA_B

Les premières sous-unités GABA_B, GABA_{B1a}, GABA_{B1b} et GABA_{B2}, ont été clonées dans les années 1990 (Kaupmann et al 1997). Ces récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Le récepteur GABA_B est un hétérodimère obligatoire qui requiert l'association de deux sous-unités homologues, GABA_{B1} et GABA_{B2}, pour être fonctionnel (Bettler et al 2004, Kniazeff & Pin 2012). En effet, seule la sous-unité GABA_{B1} lie le GABA, alors que GABA_{B2} est nécessaire à l'activation des protéines G. Chacune de ces sous-unités est constituée d'un domaine à sept hélices transmembranaires, commun à l'ensemble des RCPG, et d'un grand domaine extracellulaire en forme de « pacman », également appelé Venus Flytrap (VFT). C'est au sein de ce domaine que se situe le site de liaison du GABA dans la sous-unité GABA_{B1}.

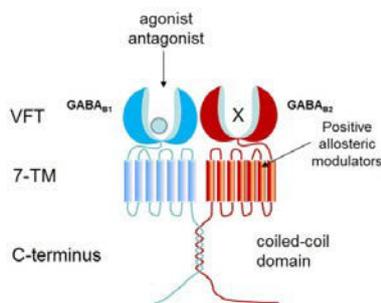


Figure VI-3 Organisation schématique du récepteur GABA_B (Xu et al 2014)

Les mesures de FRET au sein du récepteur ont révélé une nouvelle organisation oligomérique du récepteur GABA_B (Maurel et al 2008). Une analyse comparative indique que les oligomères sont moins efficaces pour activer les protéines G que les hétérodimères stricts (Comps-Agrar et al 2011). Ce résultat indique que le degré d'oligomérisation du récepteur GABA_B définit l'efficacité de couplage aux protéines G mais aussi, probablement, l'efficacité d'activation des diverses voies de signalisation activées par le récepteur.

Les souris déficientes en sous-unité GABA_{B1} sont viables, et présentent des crises épileptiques spontanées, une hyperalgésie, une hyper locomotion et une détérioration de la mémoire (Schuler et al 2001). On retrouve le même phénotype chez les souris KO pour la sous-unité GABA_{B2} (Gassmann et al 2004).

Les récepteurs GABA_B présynaptiques sont présents aux terminaisons inhibitrices et excitatrices où ils fonctionnent comme des autorécepteurs et des hétérorécepteurs respectivement. Le GABA libéré peut se fixer sur les autorécepteurs et inhiber la libération ultérieure du GABA à partir du terminal. Le GABA peut aussi déborder vers les synapses excitatrices voisines où il active les hétérorécepteurs qui inhibent la libération de glutamate. Les récepteurs GABA_B activent les protéines G de type G $\alpha_{i/o}$, qui inhibent l'adénylate cyclase et de type G $\beta\gamma$ qui lient les canaux ioniques.

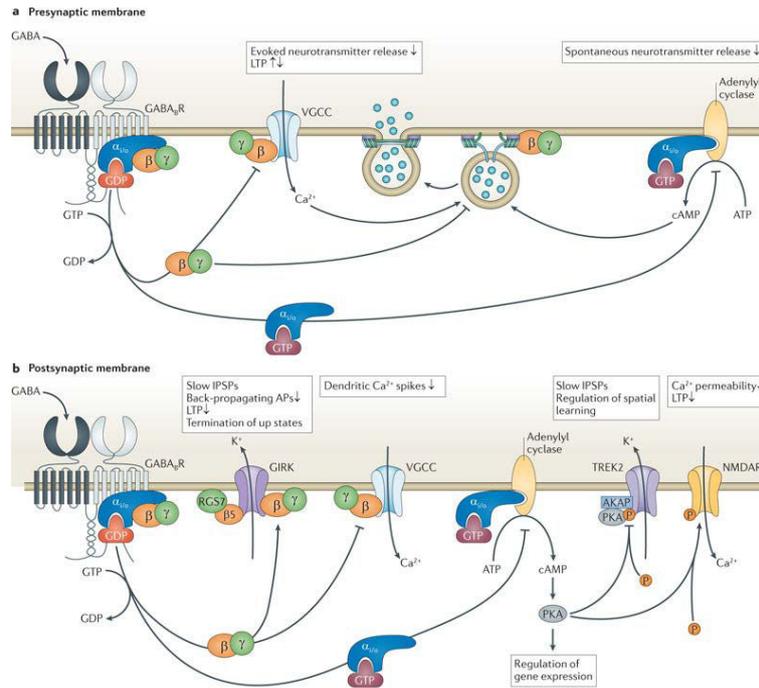


Figure VI-4 Effecteurs en aval des récepteurs $GABA_B$ en aval et leurs rôles physiologiques a) dans le compartiment présynaptique b) dans le compartiment postsynaptique (Gassmann & Bettler 2012)

VI.2.2. Conséquences de l'activation des récepteurs $GABA_B$ présynaptiques

L'inhibition de la libération évoquée de neurotransmetteurs par les récepteurs $GABA_B$ présynaptiques est généralement associée à une inhibition des canaux calciques activés par de hauts voltage dépendant (VGCCs) (Bettler et al 2004) par la $G\beta\gamma$ libérée, ce qui inhibe l'influx calcique dans le terminal puisque l'ensemble de ces canaux calciques sont exprimés dans le terminal présynaptique et sont impliqués dans le déclenchement de la libération de neurotransmetteurs (Poncer et al 1997). De plus les $GABA_B$ inhibent la libération des neurotransmetteurs en ciblant la machinerie de libération vésiculaire en aval des VGCCs. $G\beta\gamma$ peut interagir directement avec les SNAREs, en particulier le C-term de SNAP25 ce qui limite la fusion vésiculaire (Gerachshenko et al 2005). $G\alpha_{i/o}$ peut aussi inhiber la fusion vésiculaire pour réduire la libération spontanée et par conséquent la fréquence des courants post synaptiques miniatures (Rost et al 2011). Une modulation du priming des vésicules pourrait mener à un remplissage plus lent du RRP aux synapses glutamatergiques (Sakaba & Neher 2003).

VI.2.3. Conséquences de l'activation des récepteurs $GABA_B$ postsynaptiques

Une forme prédominante d'inhibition postsynaptique par les $GABA_B$ est réalisée à travers l'activation des GIRKs par la $G\beta\gamma$ libérée. Les GIRKs ou Kir3 sont des canaux potassiques couplés aux protéines G à rectification entrante. L'activation des GIRKs provoque un efflux de potassium qui résulte en une hyperpolarisation (Kulik et al 2006). La génération de ces CPSIs lents (temps de montée de 50-250 ms et décours de 100 à 500 ms) réduit l'excitabilité neuronale. Ils permettent l'inhibition de la rétro propagation des potentiels d'action dendritiques (Leung & Peloquin 2006). Les $GABA_B$ réduisent également l'excitabilité neuronale par l'activation des

INTRODUCTION

canaux potassiques TREK2 qui permettent une sortie de potassium (Deng et al 2009). Les canaux VGCCs dendritiques de type N ($Ca_v2.2$) ou de type P/Q ($Ca_v2.1$) sont inhibés ce qui empêche les spikes calciques dendritiques (Chalifoux & Carter 2011).

VI.2.4. Rôle dans la plasticité et l'activité de réseau

Ces effets pré- et postsynaptiques sont connus pour réguler l'expression de la potentialisation à long terme (LTP), une forme de plasticité synaptique impliquée dans les processus d'apprentissage et de mémoire. Les $GABA_B$ influencent les processus de LTP en réduisant directement ou indirectement l'excitabilité du neurone postsynaptique, ce qui influence finalement l'activité des récepteurs NMDA et l'induction de la LTP (Davies et al 1991). De plus il a été proposé que les récepteurs $GABA_B$ postsynaptiques peuvent moduler les processus de LTP en inhibant directement la perméabilité au calcium des récepteurs NMDA par une voie de signalisation de la PKA (Chalifoux & Carter 2010). Il est de plus en plus reconnu que les récepteurs $GABA_B$ ont un rôle important dans le contrôle de l'activité de réseau spontanée ce qui est fondamental pour les processus cognitifs. Durant une activité de réseau synchronisée, les populations de neurones oscillent entre états actifs et états de repos. Les récepteurs $GABA_B$ sont activés pendant les états actifs, lorsque les interneurones déchargent de manière synchrone, et contribuent à y mettre fin. Le contrôle des oscillations du réseau implique les $GABA_B$ postsynaptiques. Dans des conditions physiologiques, les récepteurs $GABA_B$ peuvent seulement être recrutés durant une activité synchrone des interneurones, comme cela se produit par exemple durant un rythme thêta. Il a été montré que l'activation de ces récepteurs ont un rôle dans l'activité rythmique dans l'hippocampe en contrôlant la fréquence d'oscillations (Scanziani 2000).

MATERIELS ET METHODES

Animaux

Les nouveau-nés sont utilisés au jour postnatal 1 (P1). Pour les expériences avec les souris, les cultures ont été réalisées avec des animaux issus d'accouplements entre des mâles eGFP-GAD65 hétérozygotes (don de Gabor Szabo, élevage dans l'animalerie de l'IBENS) et des femelles C57BL/6J (Charles Rivers, référence 000664). Pour le besoin de certaines expériences, des nouveau-nés OF1 x OF1 ont été utilisés (Janvier, référence SN-SW-GE-GA ; les femelles arrivant gestantes au jour embryonnaire E15 à l'animalerie de l'IBENS). Pour les expériences avec les rats, les cultures ont été réalisées avec les nouveau-nés de rattes Wistar (arrivées gestantes vers E17, accouplement chez Charles Rivers).

Toutes les manipulations d'animaux sont faites dans le respect des directives du comité d'éthique.

Culture primaire de neurones d'hippocampe

La veille de la culture, des lamelles de verre de borosilicate de 15 mm de diamètre (Marienfeld, VWR), placées directement dans les puits d'une plaque 12 puits (VWR), sont nettoyées à l'éthanol 70% avant d'être rincées avec de l'eau milliQ (ddH₂O) et laissées à sécher sous la hotte. Les lamelles sont ensuite recouvertes par 1 mL de polyornithine à 75 µg/mL (cf Table 1) sur la nuit et placées à 37°C dans un incubateur à 5% CO₂.

Le jour même, lors de la dissection des nouveaux nés (P1), les têtes sont coupées rapidement et rincées en les passant dans plusieurs boîtes remplies par différentes solutions, d'abord dans une solution de dissection HBSS/HEPES/Glucose froide (voir Table 2), d'éthanol (très brièvement), de DPBS 1X et de nouveau, solution de dissection HBSS/HEPES/Glucose froide. Les cerveaux sont extraits des boîtes crâniennes et déposés dans la boîte de dissection contenant aussi la solution de dissection HBSS/HEPES/Glucose froide. Les hémisphères cérébraux sont séparés et les hippocampes sont prélevés de chaque côté en veillant à retirer les méninges. Les hippocampes sont transférés dans la solution PAPAINÉ (voir Table 2) préalablement filtrée avec un filtre de 0,22 µm (Sartorius, VWR). Pendant que les hippocampes sont incubés 30 minutes à 37°C, 5% CO₂ dans l'incubateur, la solution de polyornithine recouvrant les lamelles préparées la veille est aspirée et les lamelles sont laissées à sécher sous la hotte. Une fois la période d'incubation terminée, la solution PAPAINÉ est enlevée et remplacée par la solution de dissection HBSS/HEPES/Glucose contenant 600 µg/ml de DNaseI (cf Table 1). Les hippocampes sont dissociés en pipétant doucement sans faire de bulle avec une pipette P1000. Après une première centrifugation de 5 minutes à 1100 rotations par minutes (rpm), le culot est lavé et resuspendu dans de la solution de dissection HBSS/HEPES/Glucose. Une seconde centrifugation de 5 minutes à 1100 rpm permet de reformer un culot de neurones dissociés qui sont resuspendus dans de la solution MEM/HS (cf Table 2). Les neurones sont dilués au 10^{ème} afin d'être comptés à l'aide d'une cellule de Malassez, puis dilués dans la solution MEM/HS afin d'obtenir une solution d'ensemencement de 10⁵ cellules/mL. Pour finir, deux heures après l'ensemencement, le milieu est délicatement aspiré et remplacé par une solution de Neurobasal/B27 (cf Table 2). Tous les 2-3 jours, une partie du milieu est renouvelée.

MATERIELS ET METHODES

Table 1 Produits pour la culture primaire de neurones

PRODUIT	FOURNISSEUR
Neurobasal Medium (1X)	Invitrogen Gibco
HBSS, 10X, no Calcium, no Magnesium, Phenol Red	Invitrogen Gibco
HEPES (1M)	Invitrogen Gibco
B-27 Serum-Free Supplement (50X), Liquid	Invitrogen Gibco
Horse Serum, New Zealand Origin	Invitrogen Gibco
MEM, no glutamine	Invitrogen Gibco
DPBS, no calcium, no magnesium, 1X	Invitrogen Gibco
Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (EDTA)	Sigma
Calcium chloride solution	Sigma
Deoxyribonuclease I from bovine pancreas	Sigma
Papain, Suspension, 100 mg	Serlabo
Poly-DL-ornithine hydrobromide	Sigma
Glutamax 100X	Invitrogen Gibco
D-(+)-Glucose	Sigma
Sodium pyruvate	Invitrogen Gibco
Primocin	Invivogen
L-cystéine, HCl	Euromedex
NaOH	Euromedex

Table 2 Solutions pour la culture primaire de neurones

Solution HBSS/HEPES/Glucose (50 mL)	
HBSS 10X	5 mL
HEPES 1M	1 mL
D-Glucose 20 X	2,5 mL
ddH ₂ O	41,5 mL

Solution Papaïne dans 5 mL de HBSS/HEPES/Glucose	
L-Cystéine, HCl	1 mg
CaCl ₂ 250mM	30 µL
EDTA 0,5M	5 µL
Papaïne	100 U
NaOH	10 µL

Solution MEM/HS (10 mL)	
MEM 1X	8,7 mL
HS	1 mL
D-Glucose 20 X	300 µL
Glutamax	100 µL
Primocin	40 µL

Solution Neurobasal/B27 (10 mL)	
Neurobasal	9,7 mL
B27 50X	200 µL
Glutamax	100 µL
Primocin	20 µL

Transfection

Pour la transfection de la sonde VGAT-pHluorin (Santos et al 2013) avec ou sans DsRed, on utilise la Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Invitrogen). La solution de transfection MEMair (Hepes 20mM, glutamax 0,5mM, sodium pyruvate 1mM dans MEM) est préparée et mise dans l'incubateur pour équilibrage. 30 minutes avant la transfection, le milieu de culture neuronal est collecté et conservé. Les neurones sont lavés une fois avec la solution MEMair. 800 μL de MEMair est ajouté par puits (pour des lamelles de 15 mm dans des plaques 12 puits), avant de remettre les plaques dans l'incubateur. Pendant ce temps-là, un **mix A** d'ADN (1 μg d'ADN dans 100 μL de MEMair) et un **mix B** de lipofectamine (4 μL lipofectamine 2000 pour 100 μL de MEMair) sont préparés et sont laissés à incuber 5 minutes séparément sous la hotte. Les mix sont ensuite mélangés et incubés 20 minutes supplémentaires sous la hotte. Les 200 μL de mix finaux sont ajoutés goutte par goutte dans les puits. Les lamelles sont remises pour 15 minutes dans l'incubateur en présence du mix. Enfin le mix de transfection est enlevé, les neurones sont lavés une fois avec du MEMair et le milieu de culture que l'on a conservé est remis sur les neurones.

Différentes quantités d'ADN et de Lipofectamine ont été utilisées en fonction de l'espèce animale et de la taille des lamelles utilisées pour les expériences. La composition des **mix A** et **B** est résumée dans la Table 3 suivante.

Table 3 Mix utilisés pour la transfection

Espèce	Diamètre lamelle	DNA	MEM air	lipofectamine	MEMair	Temps d'incubation
SOURIS	12 mm	0,4 μg DsRed 0,4 μg VGAT/VGLUT1 pHluorin	50 μL	2 μL	50 μL	15 min
	15 mm	0,8 μg DsRed 0,8 μg VGAT/VGLUT1 pHluorin	100 μL	4 μL	100 μL	15 min
RAT	15 mm	0,8 μg DsRed 0,8 μg VGAT/VGLUT1 pHluorin	100 μL	4 μL	100 μL	15 min
	15 mm	1 μg VGAT-pHluorin	100 μL	4 μL	100 μL	15 min

Immunocytochimie des cultures de neurones d'hippocampe

Les cultures de neurones d'hippocampe de rat préalablement transfectées par la pHluorin et les cultures de souris Gad65-GFP réalisées sur lamelles de verre sont fixées durant 10 minutes à température ambiante en paraformaldéhyde (PFA) 4% (pH 7,4 SIGMA). Elles sont ensuite perméabilisées en 0,5% Triton X-100 (SIGMA) dans du PBS 1X durant 15 minutes (25 min pour SNAT1), puis incubées avec une solution de 1% BSA-PBS 1X (SIGMA) pendant 30 minutes. Les cultures sont ensuite incubées durant 1 heure en chambre humide avec les anticorps primaires (anti-GAD65/67 (1/400, Rabbit, Millipore #MAB1511), anti-GAD65 (1/1000, Mousse, Millipore #MAB351), anti-GAD67 (1/1000, Mousse, Millipore #MAB5406), anti-GABA (1/400, lapin, Immusmol #IS1006), anti-SNAT1 (1/400, Mousse, NeuroMab #75-152), anti-GAT1 (Rabbit, 1/500, Synaptic System), anti-VIAAT (1/500, Guinea pig, Synaptic System #131004), anti-EAAT3 (1/250, lapin, Synaptic System #250303), et un anti-GFP (1/1000, Chicken, Avès #GFP-1020) utilisé pour révéler la pHluorin dont la fluorescence est quasi nulle après fixation PFA 4%). La détection des anticorps primaires est réalisée en utilisant la combinaison appropriée d'anticorps secondaires dilués dans le PBS 1X : Donkey anti-Chicken A488 (1/400, Jackson Laboratories), Donkey anti-Rabbit Cy3 (1/400, Jackson Laboratories), Donkey anti-Mousse A649 (1/400, Jackson Laboratories), Donkey anti-Guinea pig Cy5 (1/400, Jackson Laboratories), Donkey anti-Mousse A555 (1/400, Jackson Laboratories). Les lamelles sont incubées 1 heure en chambre humide à température ambiante puis rincées en PBS 1X avant d'être montées sur lame avec du Fluoromount™ (Sigma F4680). L'acquisition des images sont réalisées avec un microscope confocal (Leica, SP5) avec des objectifs 40X ou 63X et traitées dans ImageJ.

Electrophysiologie

Les pipettes sont étirées avec une étireuse verticale (nom) à partir de capillaires en verre de borosilicate 3.3 ($L = 75 \pm 0,5$ OD = $1,5 \pm 0,05$ ID = $1,05 \pm 0,05$ S = $0,225 \pm 0,03$ mm; Hildenberg; référence 1409250). Les pipettes d'enregistrements ont une résistance comprise entre 2,5 et 4,5 M Ω et sont remplies de solutions internes (pré- ou post-synaptiques, cf Tables 4 et 5). Les pipettes de stimulation ont une résistance autour de 1,8 M Ω et sont remplies par la solution externe (cf Table 6). Les enregistrements en modes voltage clamp et current clamp sont réalisés en configuration cellule entière en utilisant un amplificateur Multiclamp 700B contrôlé par le logiciel d'acquisition Clampex 10.3 (Molecular Devices). Les enregistrements sont échantillonnés à 20 kHz et filtrés à 4 kHz par une Digidata 1440A (Molecular Devices). L'analyse des enregistrements est faite dans Clampfit 11.0. Le stimulateur est un A-M systems isolated pulse stimulator (modèle 2100). Les expériences de stimulation de champs sont réalisées chambre de stimulation (RC47FSLP, Warner instruments) par une paire de fils de platine enduits d'époxyde, placés sur les côtés parallèles de la chambre de forme ovale. La position de la pipette, l'intensité de la stimulation et la durée du pulse sont réglées au cas par cas.

Les cultures de neurones sont installées dans une chambre (Quick change chamber, Warner instruments, RC-42LP) prévue pour des lamelles de 15 mm. La solution externe est perfusée à vitesse de 8,8 mL/min par une pompe péristaltique (IP high precision multichannel pump, ISM940E, Ismatec) et est chauffée par un appareil de chauffage Warner permettant de réaliser les expériences entre 31 et 32°C.

Pour les expériences utilisant la sonde VGAT-pHluorin, une solution de faible pH (cf Table 7) et/ou une solution de NH₄Cl (cf Table 8) sont utilisées.

De plus, certains agents pharmacologiques sont également été ajoutés à la solution externe selon les besoins expérimentaux (cf Table 9).

Table 4 Solution interne présynaptique

Solution interne présynaptique	C_r (mM)
K-Gluconate	140
Na-Gluconate	5
Hepes	10
K ₂ -Phosphate	2,5
KCl	5
Pyruvic acid	0,15
Pyridoxal 5'-phosphate hydrate	0,2
EGTA	0,5
CaCl ₂	0,15
NAD ⁺	0,5
L-Glutathione reduced	1
Phospho-creatine - K ₂	5
GTP-Na salt	0,4
ATP-Mg salt	3,5

300 mosm pH 7,4

Table 5 Solution interne postsynaptique

Solution interne postsynaptique	C_r (mM)
CsCl	140
HEPES	10
MgCl ₂	1
CaCl ₂	1
EGTA	10
BAPTA	1
ATP-Mg	5
QX-314 Cl	5

300 mosm pH 7,4

MATERIELS ET METHODES

Table 6 Solution externe

Solution externe	C_f (mM)
NaCl	145
KCl	2,4
HEPES	10
Glucose	10
CaCl ₂	2
MgCl ₂	1

300 mosm pH 7,4

Table 7 Solution externe pH acide

Solution pH faible	C_f (mM)
NaCl	145
KCl	2,4
MES	10
Glucose	10
CaCl ₂	2
MgCl ₂	1

300 mosm pH 5,5 (5,15)

Table 8 Solution externe NH₄

Solution NH₄Cl 50mM	C_f (mM)
NaCl	95
KCl	2,4
HEPES	10
Glucose	10
NH ₄ Cl	50
CaCl ₂	2
MgCl ₂	1

300 mosm pH 7,4 (6,93)

Table 9 Drogues

Agent pharmacologique	Fournisseur
NBQX	Hellobio
MK-801	Hellobio
SR95531 hydrobromide (gabazine)	Hellobio
CGP55845 hydrochloride	Hellobio

Imagerie

Les expériences d'imagerie sont effectuées sur un microscope inversé Olympus IX71. L'illumination des échantillons est permise par une lumière blanche Lumencor SOLA SE 5-LCR-SB qui génère une sortie continue à 380-680 nm. Les enregistrements sont effectués par une caméra Zyla 4.2 PLUS sCMOS. La fluorescence GFP est observée grâce à un filtre ET-EGFP (FITC/Cy2 ; excitation 470/40 nm et émission 525/50nm; Chroma référence 49002) alors que la fluorescence DsRed est observée avec un filtre TRITC (Rhodamine ; excitation 545/30 nm et émission 620/60 nm ; Chroma référence 41002c). Le logiciel Micromanager est utilisé pour l'acquisition de la fluorescence. Le temps d'exposition est de 400 ms et l'intervalle d'acquisition entre les images est de 500 ms ou 2 s. Les expériences sont faites avec un objectif 60X, où 1µm équivaut à 9,3 pixels. Le logiciel Icy est utilisé pour analyse de la variation de fluorescence de la sonde VIAATpHluorin. Les régions d'intérêt (ROI) sont définies manuellement, avec une taille maximale de 9x9 pixels pour un bouton. La variation de fluorescence au cours d'une acquisition est mesurée par le Plugin ROI Intensity Evolution. Les images exemples types sont ensuite traitées dans ImageJ.

Analyse

Les décours temporels de la restauration des IPSCs par la glutamine à 0,1 Hz et 4 Hz (Figure 11) sont des sigmoïdes et sont fittés par une équation de Gompertz modifiée

$$y = a e^{-e^{-\frac{-(t-t_0)}{\tau}}} + b.$$

Les décours temporels de la décroissance de la fluorescence sont fittés par une simple exponentielle $f = y_0 + a e^{-bx}$ dans SigmaPlot.

Les tests statistiques utilisés sont des paired t-test et des t-test. Ils ont été effectués dans SigmaPlot. Des tests Wilcoxon Signed Rank Test et Mann-Whitney Rank Sum Test ont pu être utilisés en cas de distribution non normale des valeurs.

RESULTATS

Préambule

Mon travail de thèse porte sur les mécanismes unissant l'activité des interneurons inhibiteurs au cycle vésiculaire et à l'approvisionnement des synapses en neurotransmetteurs. J'ai mis en œuvre un paradigme expérimental de déplétion des stocks cytoplasmiques en neurotransmetteurs mis au point précédemment dans l'équipe pour développer deux projets indépendants utilisant les techniques électrophysiologiques et d'imagerie vésiculaire sur des neurones en culture.

Je présenterai dans la **partie I** des résultats quelques considérations méthodologiques générales pour mon projet d'électrophysiologie en paire utilisant la souris transgénique GAD65:eGFP. La **partie II** comprend l'article publié à Neuron qui décrit les protocoles de déplétion en neurotransmetteurs et la démonstration du rôle des transporteurs de GABA/glutamate et glutamine dans l'approvisionnement des synapses en GABA. L'article comprend une série d'expériences avec la sonde FM5-95 que j'ai réalisé en début de thèse pour apporter une évidence expérimentale directe d'une régulation métabolique du cycle vésiculaire. La **partie III** décrit l'ensemble des résultats de mon projet principal qui a cherché à établir comment les transporteurs de GABA et de ses précurseurs régulent l'approvisionnement des synapses en neurotransmetteurs pour couvrir les besoins de remplissage vésiculaire en fonction de l'activité. J'aborderai finalement dans la **partie IV** les développements méthodologiques avec la sonde VGAT-pHluorin qui m'ont permis de combiner l'imagerie présynaptique avec les enregistrements électrophysiologiques en paires pour explorer la dynamique de remplissage des pools de vésicules.

Résultats I

Considérations méthodologiques générales

I.1. Culture neuronale

Pour identifier visuellement des neurones GABAergiques dans des cultures primaires d'hippocampe, nous avons utilisé des souris transgéniques exprimant la eGFP sous le contrôle du promoteur de la GAD65 (lignée GAD65_3e/gfp5.5#30). Les neurones fluorescents dans cette lignée sont GABAergiques et proviennent de l'éminence ganglionnaire caudale. Les hippocampes sont disséqués sur tous les animaux d'une portée à P1 dans un rapport 1:1 (souris transgéniques hétérozygotes et sauvages) pour obtenir une faible densité de neurones GFP⁺, soit environ un neurone GFP⁺ par champ à l'objectif 40X. Cette faible densité permet de suivre l'arborisation axonale et de faciliter l'identification de cellules cibles potentielles. En général, nous avons privilégié des cellules cibles présentant un chapelet de varicosités périsonomatiques comme indiqué par des étoiles rouges sur la figure 1.

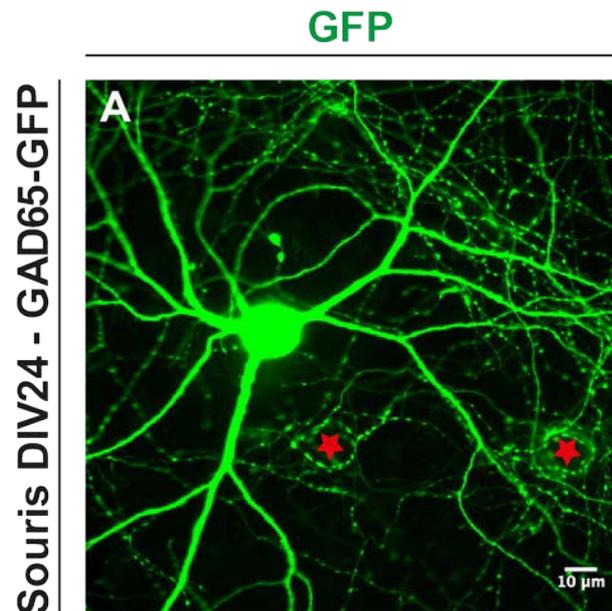


Figure 1. Neurone GFP⁺ dans une culture mixte d'hippocampe de souris GAD65:eGFP

Les étoiles rouges montrent l'emplacement de cellules cibles putatives, décorées par des varicosités périsonomatiques (40X).

Les interneurones GFP⁺ présentent la diversité morphologique attendue des neurones GABAergiques issus de la CGE (Figure 2). Les marquages immunocytochimiques de la GAD65 et de la GFP ne colocalisent pas entièrement car une fraction des varicosités inhibitrices n'exprime pas la GFP (Figure 3).

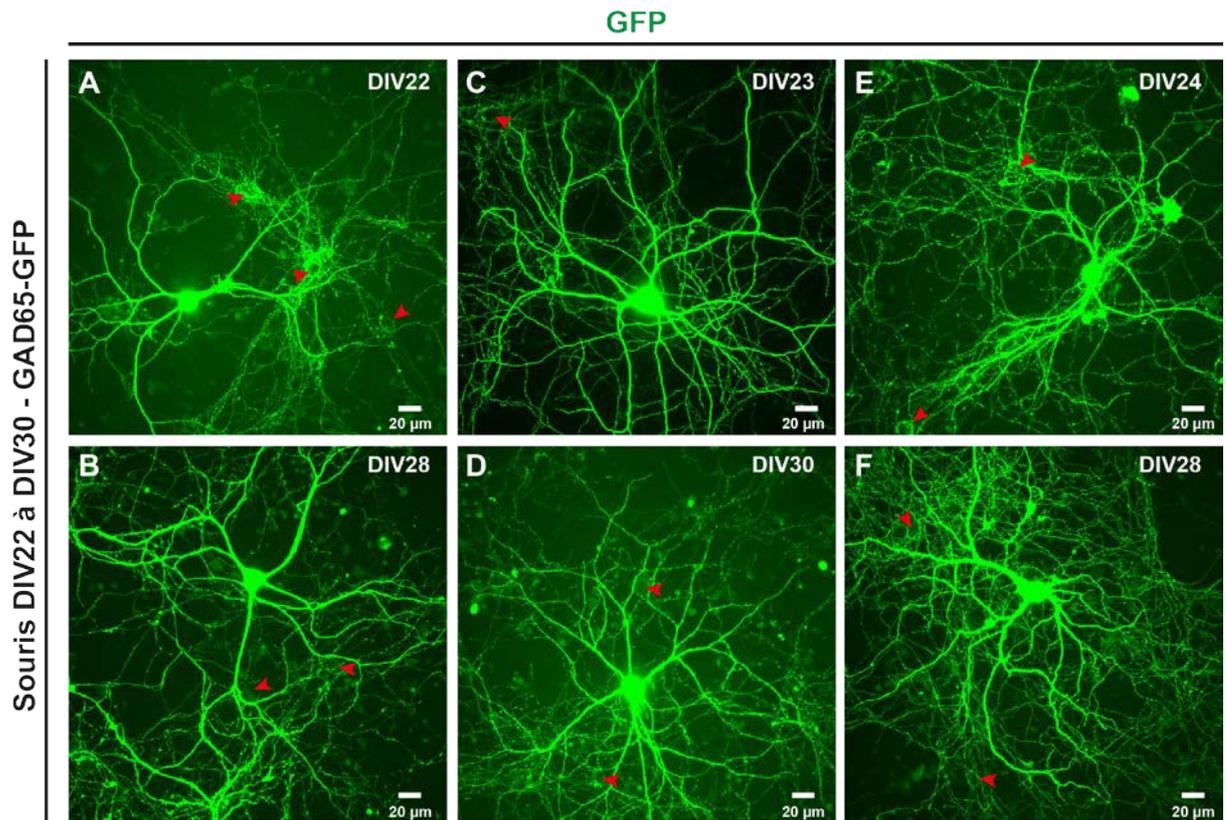


Figure 2. Exemple de la diversité morphologique des interneurons GAD65⁺ dans des cultures d'hippocampe de souris GAD65:eGFP

A-F) Images en fluorescence (GFP) montrant le corps cellulaire, les principaux neurites et une partie de l'arborisation axonale de 6 interneurons GAD65⁺ représentatifs (40X). Les flèches rouges indiquent des choix possibles de cellules cibles.

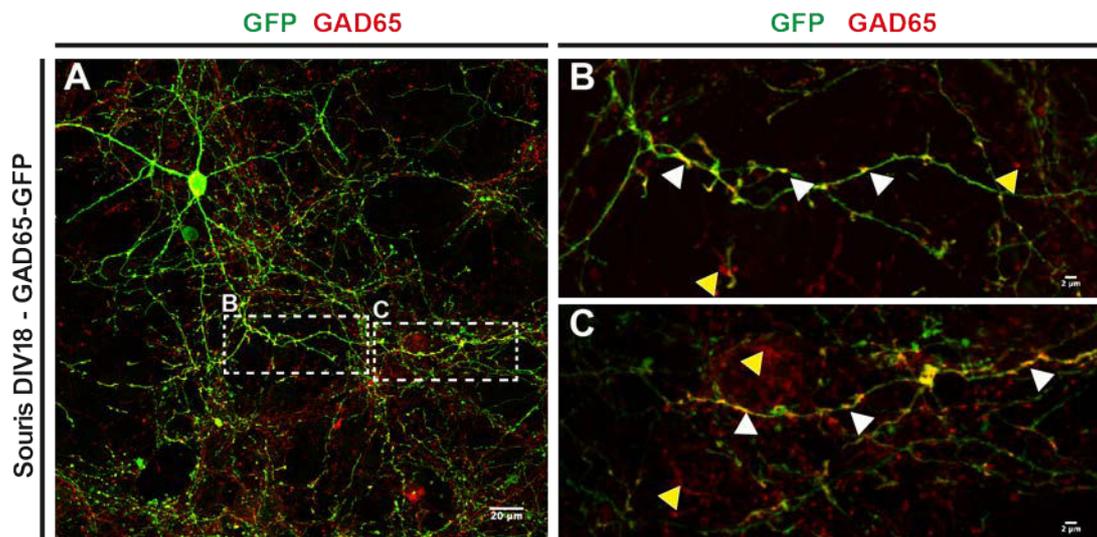


Figure 3. Co-marquage de la GFP et de la GAD65 en immunofluorescence

A) Image de microscopie confocale au 40X.

B-C) Agrandissements des zones encadrées en pointillé dans le panneau A (zoom numérique 3,17). Les flèches blanches montrent des évidences de colocalisation GFP/GAD65. Les flèches jaunes montrent un marquage GAD65.

Durant ma thèse, j'ai utilisé un protocole de cultures primaires mixtes (neurone/glie) d'hippocampe. Dans ce protocole, les cellules gliales, notamment les astrocytes, se développent en parallèle des neurones pour former un fin tapis cellulaire sous-jacent, qui peut être révélé par immunocytochimie avec des anticorps anti-GFAP, un marqueur spécifique des astrocytes (non montré). Ce protocole de culture mixte diffère de celui des cocultures utilisées précédemment au laboratoire (cf Neuron 2013) dans lequel les neurones fraîchement dissociés sont déposés sur des cultures primaires d'astrocytes matures préalablement préparées, dont la prolifération est stoppée à l'atteinte de la confluence par un traitement à l'AraC (5 μ M). Un autre changement concerne le remplacement de la glutamine par un dipeptide (GlutaMAX: L-alanyl-L-glutamine) dans le milieu de culture des neurones. Ce dipeptide ne forme pas spontanément du glutamate, à la différence de la glutamine, ce qui diminue les risques de neurotoxicité et d'accumulation d'ammonium. La conséquence de ce remplacement sur les stocks cytosoliques de GABA des neurones n'a pas pu être évaluée directement mais il est à noter que ce dipeptide est capturé et métabolisé différemment de la glutamine, ce qui pourrait donc modifier les stocks initiaux de neurotransmetteurs. L'utilisation d'un antibiotique (Primocine, (100 μ g/mL)) et d'un incubateur à CO₂ plus stable ont aussi pu contribuer à utiliser des cultures plus tardivement que précédemment, jusqu'à DIV30 (au lieu de DIV16-21 précédemment). Bien que l'impact individuel de ces différents changements ne soit pas connu, il semble que les cultures utilisées durant ma thèse (hors papier Neuron) présentaient des profils de maturité plus retardés que les cocultures utilisées précédemment.

1.2. Protocole en paire

La figure 4A schématise la configuration expérimentale utilisée pour les enregistrements en paire dans nos cultures. Les courants postsynaptiques inhibiteurs (IPSCs) sont évoqués par de brefs (2-3 ms) sauts de courants dépolarisants avec une intensité suffisante pour déclencher un potentiel d'action (PA) dans la cellule présynaptique GAD65⁺. Dans ces conditions, chaque potentiel d'action évoque un IPSC (Figure 4B), pratiquement sans échec de transmission même pendant des trains de plusieurs milliers de potentiels d'action. Un courant est injecté pour maintenir le potentiel de membrane du neurone présynaptique à une valeur de -65 mV, l'activité synaptique excitatrice spontanée étant bloquée par du NBQX (2 μ M) et du MK-801 (5 μ M), des antagonistes des récepteurs AMPA et NMDA, respectivement. Le taux de succès d'identification d'une cellule cible ayant une connexion synaptique inhibitrice est très élevé dans ces cultures hippocampiques. La connectivité réciproque de la cellule cible n'a pas pu être testée à cause de l'ajout de QX314, un inhibiteur des canaux sodiques, dans la solution de la pipette postsynaptique. Les courants postsynaptiques évoqués par la stimulation d'un neurone GFP⁺ sont GABAergiques puisque entièrement bloqués par le SR95531 (Figures 4C, D, E). L'activation des récepteurs GABA_A génère des courants synaptiques entrants du fait de la concentration élevée de Cl⁻ de la solution interne de la pipette de la cellule postsynaptique. L'amplitude moyenne des IPSCs (2834 \pm 355 pA, n = 22) confirment la multiplicité des contacts synaptiques (l'amplitude moyenne d'un quanta GABAergique dans les cultures d'hippocampe est de 29,7 \pm 2,3 pA, Wang et al. Neuron 2013).

Résultats I

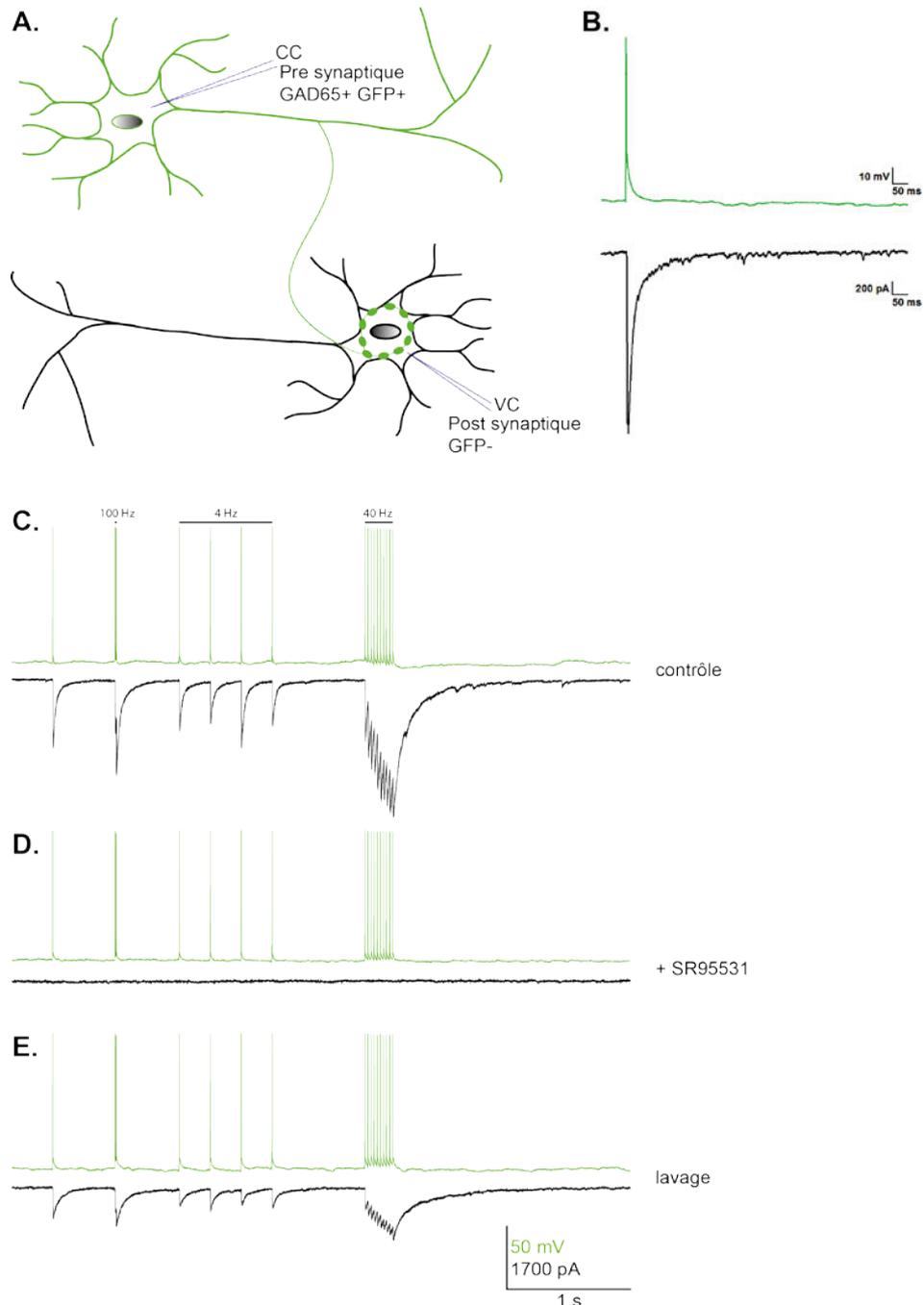


Figure 4. IPSCs GABAergiques enregistrés sur une paire de neurones avec un élément présynaptique GFP⁺

A) Schéma de la configuration de patch-clamp (CC : mode courant imposé, VC : mode voltage imposé) pour une paire de neurones avec un neurone présynaptique identifié GAD65⁺.

B) Traces du potentiel de membrane du neurone présynaptique (vert) et du courant postsynaptique (noir) pour une paire comme montré en A, en présence de NBQX (2 µM) et MK-801 (5 µM).

C-E) Les courants postsynaptiques enregistrés en présence de NBQX (2 µM) sont bloqués par le SR95531, un inhibiteur spécifique des récepteurs GABA_A.

(C) contrôle ; (D) SR95531 (100 µM) ; (E) lavage.

I.3. Protocoles de déplétion du GABA cytosolique

Différents types de plasticité synaptique à court terme (facilitation et/ou dépression) sont observés pendant la première centaine de potentiels d'action d'une stimulation répétitive à 4 Hz, (cf Figure 1, Wang et al. Neuron 2013). Après cette phase initiale très variable d'une paire à l'autre, on observe généralement une stabilisation de l'amplitude des IPSCs à une fraction de l'amplitude maximale, suggérant un mode de fonctionnement des synapses en condition quasi stationnaire (Figure 5A), mode qui peut se maintenir pendant plusieurs milliers de PAs. Cette dépression à court terme est réversible à l'arrêt de la stimulation à 4 Hz, soit en totalité (Figure 5A), soit partiellement dans la majorité des paires enregistrées ($62 \pm 4\%$ de l'amplitude initiale, $n = 22$). L'amplitude moyenne des IPSCs dans les cultures mixtes n'est pas significativement différente de celle calculée dans les cocultures (2834 ± 355 pA, $n = 22$ et 2892 ± 316 pA, $n = 26$, $p = 0,702$, Mann Whitney rank sum test). En revanche, on observe une restauration plus complète de l'amplitude initiale dans les co-cultures avec glutamine ($76 \pm 4\%$, $n = 26$, $p = 0,008$, t-test).

L'amplitude de chaque IPSC évoqué à 4 Hz (Figure 5BC, croix bleue) ou à 0,1 Hz (Figure 5BC, cercle rouge) peut être représentée en fonction du temps (Figure 5B) ou du nombre de potentiels d'action (Figure 5C). Ces différentes représentations permettent de distinguer les évolutions dépendantes du temps comme les périodes de récupération à 0,1Hz ou la dialyse du neurone par la solution interne de la pipette de patch, de celles dépendantes de l'activité et donc du nombre de PAs. Nous avons utilisé l'amplitude cumulée des IPSCs pendant des protocoles successifs comme un index de la quantité de GABA libérée dans la fente synaptique, en agrégeant les IPSCs en fonction du nombre de PAs, indépendamment de leur fréquence de stimulation. En effet, l'amplitude des IPSCs étant proportionnelle au nombre de récepteurs GABA_A activés, nous pouvons supposer qu'elle soit, en première approximation, proportionnelle à la quantité de GABA libérée pour chaque exocytose si les récepteurs ne sont pas saturés. La figure 5D illustre la différence d'amplitude cumulée (et donc la quantité de GABA libérée) pendant une stimulation à 0,1 Hz et 4 Hz (183 nA vs 2171 nA) pour une même période de temps.

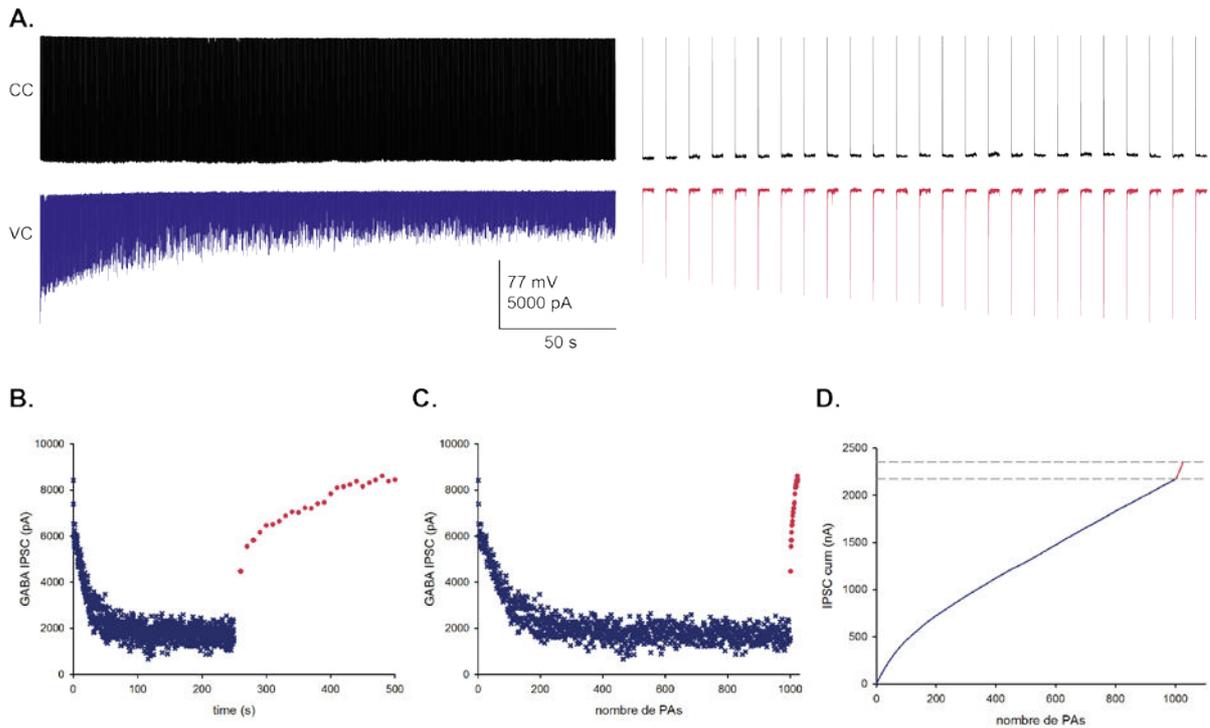


Figure 5. La dépression synaptique à court terme pendant un train de stimulation est réversible

A) Traces du potentiel de membrane (noir) et du courant postsynaptique pendant un train de 1000 PAs à 4 Hz (bleu) suivi de la récupération à 0,1Hz (rouge) enregistrés en présence de NBQX (2 μ M) et MK801 (5 μ M).

B-C) Amplitude des IPSCs de la trace montrée en A représentée en fonction du temps (B) ou du nombre de potentiels d'action (C).

D) Amplitude cumulée des IPSCs en fonction du nombre de PAs évoqués à 4 et 0,1Hz. Les lignes pointillées représentent l'amplitude cumulée maximale à la fin du train à 4 Hz et de la récupération à 0,1 Hz pour une même période de temps.

Lorsque ces trains de stimulation à 4 Hz sont répétés toutes les dix minutes, on observe un effondrement de la transmission qui semble en apparence irréversible, sans possibilité de restauration à l'arrêt de la stimulation (Figure 6A). Les résultats exposés dans le papier à Neuron démontrent que cet effondrement est la conséquence directe d'une déplétion quasi complète des stocks cytosoliques de GABA. L'amplitude cumulée tend alors vers un plateau dont l'amplitude, proportionnelle à la consommation de neurotransmetteurs, est une indication du stock de neurotransmetteurs disponible initialement (Figure 6B).

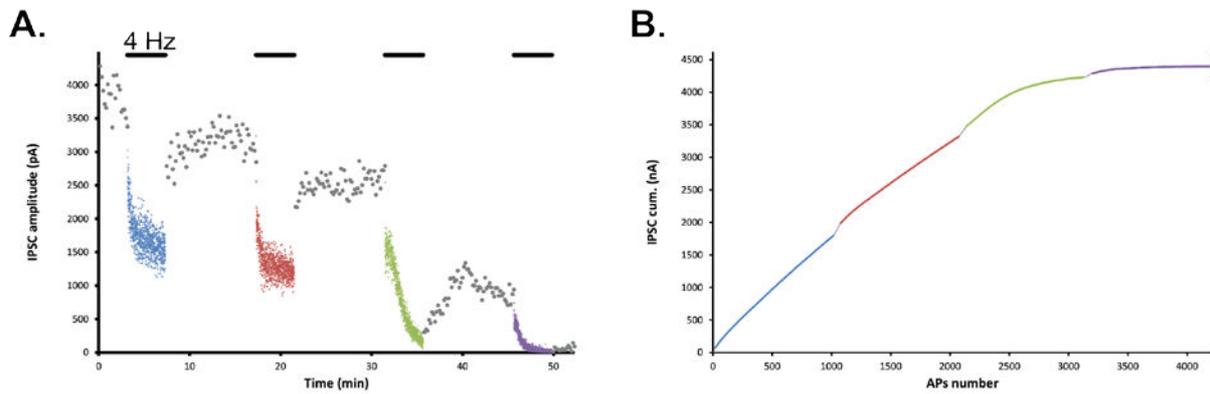


Figure 6. Effondrement de la transmission par épuisement du stock cytosolique de GABA

A) Amplitude des IPSCs évoqués à 0,1 Hz (points gris) et 4 Hz (croix de couleur), en présence de NBQX (2 μ M) et MK801 (5 μ M). Les barres horizontales noires représentent les périodes de stimulation à 4 Hz.

B) Amplitude cumulée des IPSCs montrés en A (les couleurs correspondent).

Distinguer ou identifier la transition entre les dépressions réversibles induites à chaque train de stimulation et l'effondrement irréversible produit par la disparition des stocks de GABA peut s'avérer difficile, sinon impossible lorsque l'état stationnaire est compromis dès le premier train de stimulation. En effet, deux phénomènes concourent à l'épuisement des stocks. Le premier est indépendant de l'activité synaptique et correspond à la dialyse de l'axoplasme imposée par la solution intracellulaire de la pipette de patch qui ne contient ni GABA, ni ses deux précurseurs directs (glutamate et glutamine). Néanmoins, on peut supposer qu'une partie importante de la dialyse a lieu pendant la phase initiale de l'expérience pendant laquelle aucun IPSC n'est enregistré (Figure 7). En effet la diffusion d'une molécule fluorescente à partir de la pipette jusqu'à des varicosités éloignées est complète à 77% quinze minutes après le passage en configuration cellule entière. Durant cette période, aucun IPSC n'est enregistré. La condition « IPSC₁ » (ou time = 0) dans les figures inclut ce délai de dialyse minimum de quinze minutes. Le deuxième phénomène est lui directement lié à la consommation de GABA par l'activité puisque le GABA libéré dans l'espace extracellulaire peut diffuser librement et s'échapper du fait du système ouvert des cultures sur lamelle constamment perfusé par un flux de solution contenant uniquement du D-glucose. Une stimulation continue à 4 Hz montre en conséquence différents profils d'effondrement de la transmission après les 1000 premiers PAs (Figure 8, la ligne pointillée rouge indique les 1000 premiers PAs à 4 Hz) en fonction de l'importance relative de la dialyse, de la consommation et du stock initial de GABA. Dans les quatre expériences illustrées dans les figures 6 et 8, l'amplitude cumulée des 1000 premiers PAs à 4 Hz représente $29 \pm 9\%$ (n =4) de l'amplitude cumulée totale de la déplétion, lorsque les stocks sont entièrement consommés.

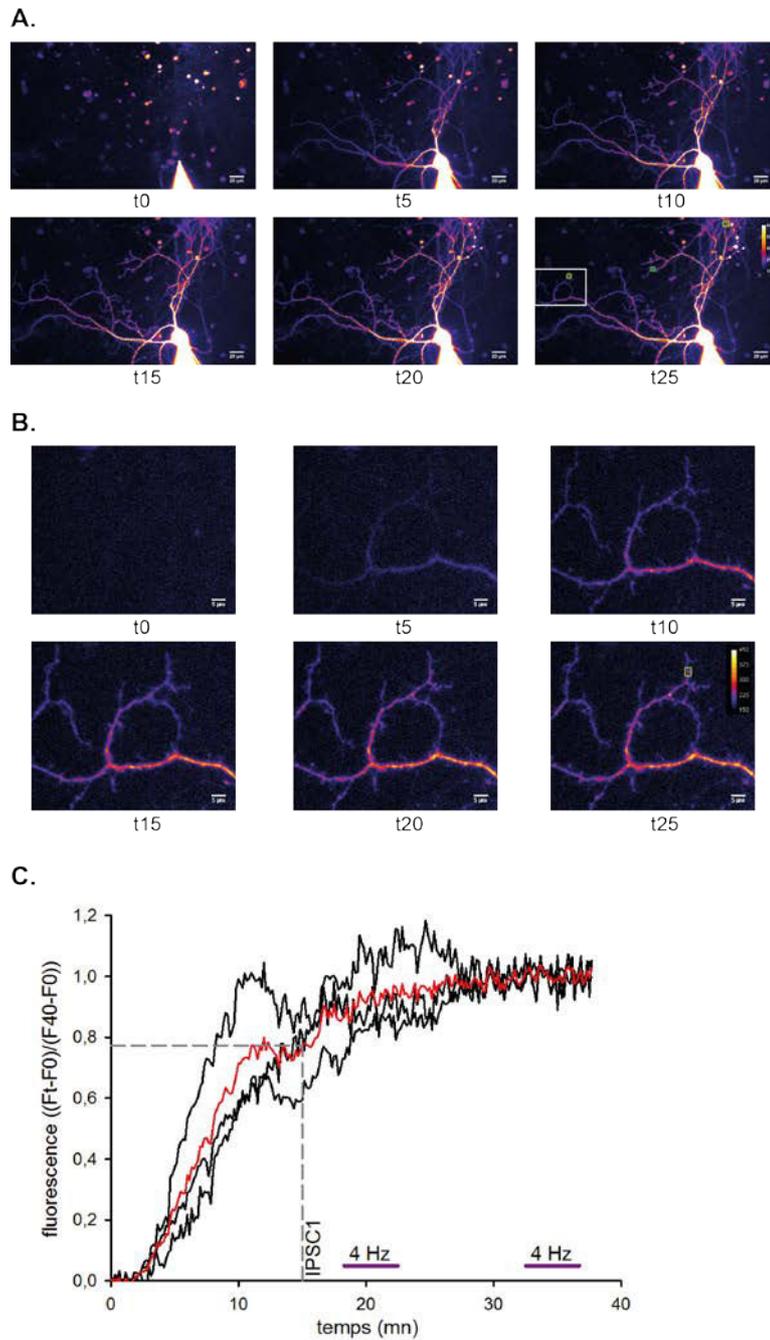


Figure 7. La diffusion axonale d'une sonde fluorescente à partir de la pipette est quasi complète au début des enregistrements électrophysiologiques

A) Images de la diffusion de la sonde fluorescente Alexa 568 (filtre mCherry) à différents intervalles de temps indiqués en minute. Le t0 précède de quelques secondes le passage en configuration cellule entière.

B) Agrandissement de la zone délimitée par un rectangle blanc défini en A à t25.

C) Intensité de la fluorescence mesurée en fonction du temps dans trois boutons synaptiques (courbes noires, carrés verts) situés à ≈ 360 , 280 et $220 \mu\text{m}$ du corps cellulaire identifiés par des rectangles verts en A à t25. La courbe rouge est la variation moyenne des trois boutons.

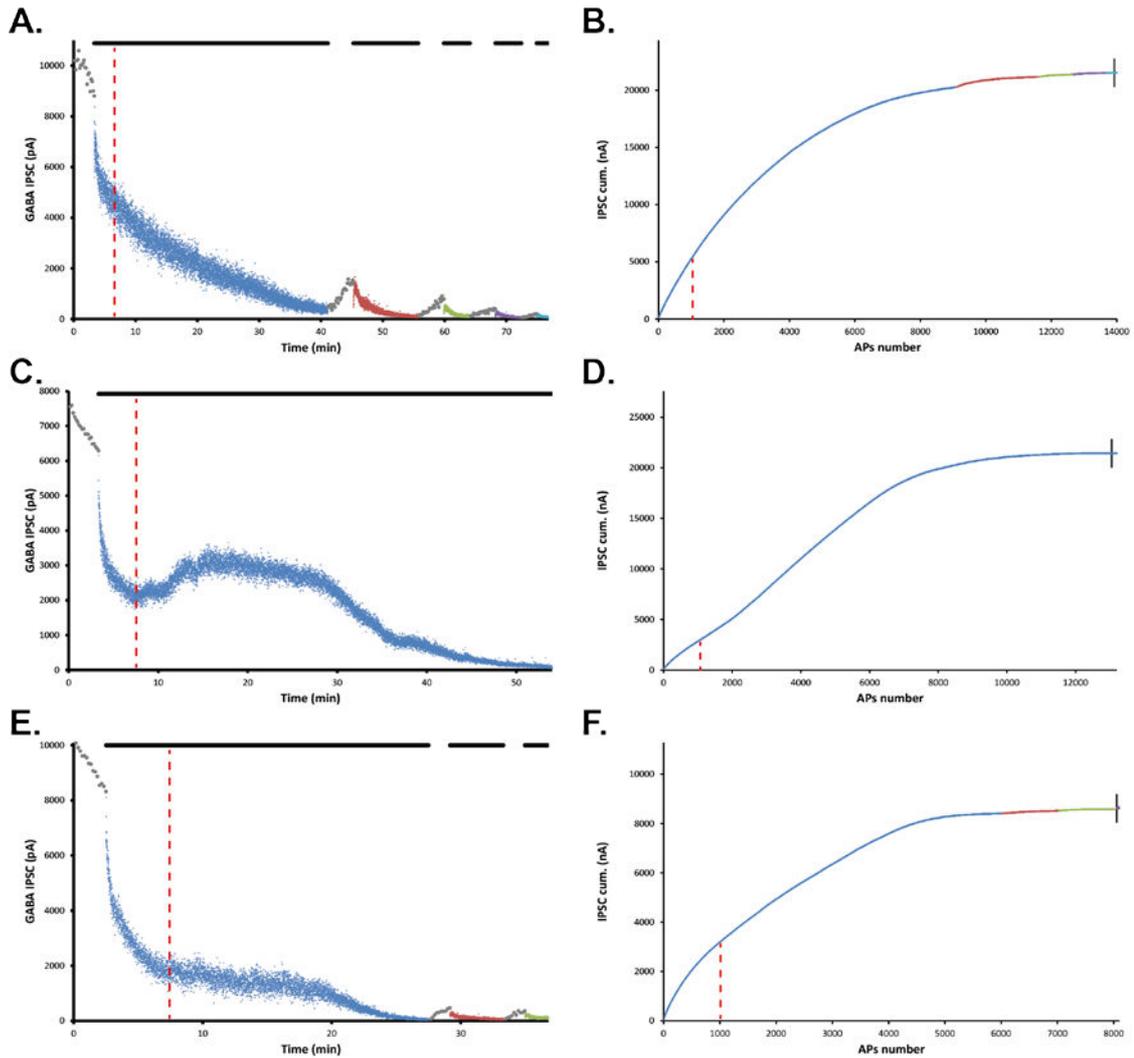


Figure 8. Différentes modalités d'effondrement de la transmission induit par une stimulation continue à 4 Hz

A-F L'amplitude (A, C, E) et l'amplitude cumulée (B, D, F) des IPSCs sont représentées en fonction du temps (A, C, E) ou du nombre de potentiels d'action (B, D, F) pendant une stimulation continue à 4 Hz correspondant à l'équivalent de 6 à 12 trains de 1000 PAs. Après les 1000 premiers PAs à 4 Hz (ligne rouge pointillée), on observe l'effondrement de la transmission qui peut être continu (A, B), qui intervient après un rebond potentialisateur (C, D) ou différé (E, F) comme montré ici pour trois paires avec de larges connections inhibitrices, enregistrées en présence de NBQX (2 μ M) et MK-801 (5 μ M).

Résultats II

*Cytosolic Transmitter Concentration
Regulates Vesicle Cycling at
Hippocampal GABAergic Terminals*

Cytosolic Transmitter Concentration Regulates Vesicle Cycling at Hippocampal GABAergic Terminals

Lu Wang,^{1,2,3,4,5,7} Peng Tu,^{1,2,3,7} Laurine Bonet,^{1,2,3} Karin R. Aubrey,^{1,2,3,6} and Stéphane Supplisson^{1,2,3,*}

¹INSERM, U1024, F-75005 Paris, France

²CNRS, UMR 8197, F-75005 Paris, France

³Ecole Normale Supérieure, Institut de Biologie de l'ENS, IBENS, F-75005 Paris, France

⁴Shanghai Key Laboratory of Brain Functional Genomics, East China Normal University, 200062 Shanghai, China

⁵Present address: Institute of Neuroscience and State Key Laboratory of Neuroscience, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, 200031 Shanghai, China

⁶Present address: Pain Management Research Institute, Kolling Institute of Medical Research, Northern Clinical School, University of Sydney at Royal North Shore Hospital, Sydney, NSW 2065, Australia

⁷These authors contributed equally to this work

*Correspondence: stephane.supplisson@biologie.ens.fr

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2013.07.021>

SUMMARY

Sustained synaptic transmission requires vesicle recycling and refilling with transmitter, two processes considered to proceed independently. Contrary to this assumption, we show here that depletion of cytosolic transmitter at GABAergic synapses reversibly reduces the number of recycling vesicles. Using paired recordings in hippocampal cultures, we show that repetitive activity causes two phases of reduction of the postsynaptic response. The first involves the classical depletion of the readily releasable and recycling pools, while the second reflects impairment of vesicle filling as GABA is consumed, since it can only be reversed by uptake of GABA or its precursors, glutamate or glutamine. Surprisingly, this second phase is associated with reduced quantal release, a faster depression rate and lower FM5-95 labeling, suggesting that the size of the cycling vesicular pool is regulated by cytosolic transmitter availability. Regulation of vesicular cycling may represent a general mechanism of presynaptic plasticity, matching synaptic release to transmitter supply.

INTRODUCTION

Information transfer between neurons requires a precise temporal and spatial balance of excitatory and inhibitory synaptic inputs. In the hippocampus, inhibitory interneurons, which represent ~10% of the total neuronal population, are able to shape the network activity of large cellular ensembles by releasing GABA at high frequency along extensive axonal arborizations (Klausberger et al., 2003). Since small central synapses contain a limited set of vesicles, release sites, and transmitters, several recycling schemes cooperate to maintain a pool of GABA-filled vesicles available for release (Edwards, 2007; Kraushaar and Jonas, 2000; Neher, 2010; Sara et al., 2002; Südhof, 2004).

Vesicle trafficking and pools have been studied in great detail (Kavalali, 2006; Rizzoli and Betz, 2005; Rizzoli and Jahn, 2007; Südhof, 2004) but much less is known about where and how vesicles are filled with GABA via VIAAT (also named VGAT), the shared vesicular transporter for GABA and glycine (Aubrey et al., 2007; Wojcik et al., 2006). After exocytosis, vesicles retrieved by clathrin-mediated endocytosis are rapidly acidified (Atluri and Ryan, 2006) and recycled either directly or through endosomes (for review see Rizzoli and Jahn, 2007; Südhof, 2004). Direct recycling implies that filling may be interrupted before its completion if partially filled vesicles are recruited for release. In addition, the time course of GABA accumulation should be sensitive to variation in VIAAT copy number and VIAAT occupancy. In contrast, vesicles processed through larger VIAAT-containing acidic endosomes may be more homogeneously preloaded with GABA before burgeoning.

Manipulations that alter GABA metabolism have been shown to change the amplitude of evoked and miniature IPSCs in brain slices, suggesting that the amount of GABA stored in vesicles is regulated (Barberis et al., 2004; Engel et al., 2001). However, it has proven difficult to dissect the relative contribution of different supply sources: diffusion from the cell body reservoir, capture by transporters located in axon and terminal membranes, and de novo synthesis from glutamate by the two isoforms of glutamate decarboxylase (GAD65 and GAD67). Although genetic invalidation in knockout mice has identified GAD67 and VIAAT as the two critical elements for the vesicular release of GABA (Asada et al., 1997; Wojcik et al., 2006), membrane-anchored GAD65 is important for GABA synthesis during intense synaptic activity (Tian et al., 1999; Walls et al., 2011). The role of presynaptic plasma membrane transporters for maintaining GABA homeostasis and vesicle filling is less understood, although there is evidence that glutamate and glutamine uptakes potentiate GABAergic IPSCs in brain slices and cultures (Bak et al., 2006; Brown and Mathews, 2010; Ertunc et al., 2007; Fricke et al., 2007; Mathews and Diamond, 2003).

Here, we consider the reversible and irreversible changes that occur in inhibitory signaling while neurons are continuously firing and actively consuming transmitter. In contrast to the well-described depression caused by vesicle depletion (Kraushaar

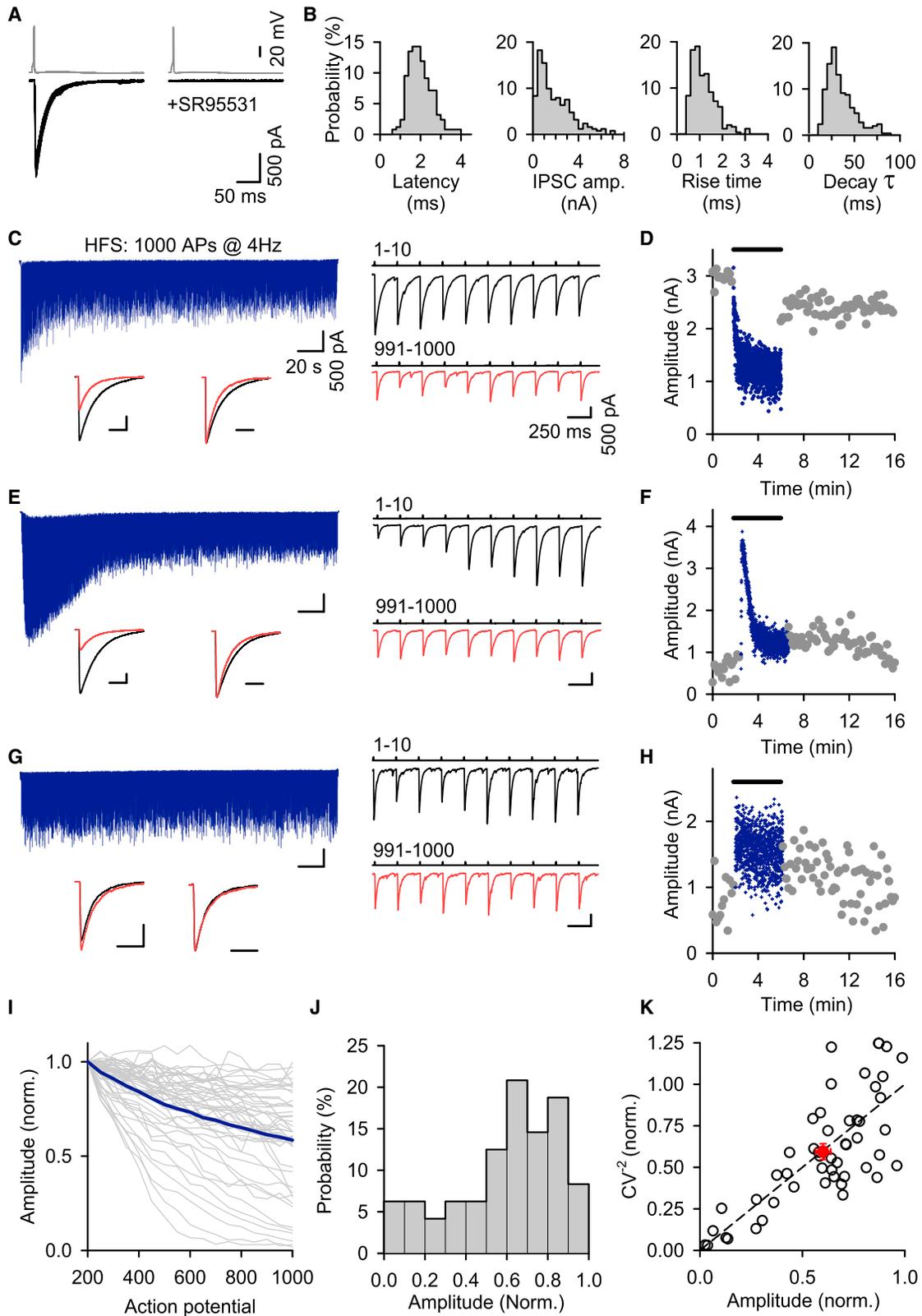


Figure 1. Vesicle Recycling Supports Steady GABA Release during Repetitive Stimulation

(A) Sample traces of IPSCs (bottom) evoked by ten APs (top) at 0.1 Hz in pairs with a presynaptic GAD65(+) cell in control condition (left) and in the presence of 20 μ M SR95531 (right).

(legend continued on next page)

and Jonas, 2000; see review in Zucker and Regehr, 2002), we show that GABA consumption induces a collapse of transmission that is only restored by GABA, glutamate, and glutamine transporter-mediated uptake. Changes in kinetic and quantal parameters during transmission rundown suggest a decrease in the pool of neurotransmitter-containing vesicles available for release, and FM5-95 uptake confirmed reduced vesicle trafficking in transmitter-depleted terminals. This cytosolic GABA regulation of vesicle cycling represents a previously uncharacterized form of presynaptic plasticity.

RESULTS

Vesicle Recycling Maintains the Strength of Inhibition during Repetitive Activity

We identified inhibitory neurons by fluorescence in hippocampal cultures derived from transgenic EGFP-GAD65 mice. Putative pairs composed of a GAD65(+) presynaptic element and a nearby nonfluorescent postsynaptic cell were whole-cell patched in current- and voltage-clamp modes, respectively, and tested for synaptic connection by injecting depolarizing current steps that triggered action potentials (APs) in the presynaptic cell (Figure 1A). The probability of connection was high (>90%) and the evoked inhibitory postsynaptic currents (IPSCs) were entirely blocked by SR95531 (20 μ M), a specific GABA_A receptor inhibitor (Figure 1A). The connections were monosynaptic, as indicated by the absence of transmission failures and the short latency (2.0 \pm 0.04 ms, n = 252, Figure 1B). With high intracellular Cl⁻, typical inward IPSCs had large amplitude (2.04 \pm 0.11 nA, n = 252, Figure 1B), when recorded in cells held at -70 mV, and fast kinetics, with a 20%–80% rise time of 1.17 \pm 0.03 ms and a decay time constant of 35.3 \pm 0.99 ms (n = 252, Figure 1B).

We first set out to evaluate whether transmission could be maintained during repetitive stimulation in the absence of an exogenous mechanism for GABA supply. We recorded IPSCs during long trains of 500–2,000 APs evoked at 4 Hz, a moderate frequency with rare AP failures (0.8% \pm 0.08% failure, n = 88 pairs). Repetitive stimulation triggered a broad range of short-term synaptic plasticities, which were always followed by a long-lasting phase of relatively steady release, indicating that newly formed GABA-containing vesicles are at equilibrium with vesicle exocytosis. Figure 1 shows this long phase of steady release for three representative pairs displaying initial short-term depression (Figures 1C and 1D), facilitation followed by depression (Figures 1E and 1F), or stable responses (Figures 1G and 1H). On average, IPSC decay kinetics were slightly faster by the end of the train (insets, 32.6 \pm 1.7 ms at the beginning [black trace] and 28.4 \pm 1.3 ms at the end of the train [red trace], n = 63 pairs, p = 0.05). To compare the late phase of release for

all tested pairs, we averaged the peak amplitude by groups of 50 consecutive IPSCs normalized by the value at the 200th AP, after initial facilitation and/or depression. Figure 1I shows the amplitude change during the last 800 APs for individual (gray line) and average (solid line) pairs. The final IPSC amplitude was maintained at 62.5% \pm 3.5% (n = 48, p < 0.001, Figures 1I and 1J), indicating robust recycling activity in a majority of pairs. The linear relationship between the normalized inverse of the square of the coefficient of variation (CV⁻²) and the IPSC amplitude was compatible with a presynaptic locus for this slow depression (Figure 1K).

These results confirm that the initial cytosolic stock of GABA that had been built up for days in glutamine-enriched culture media supports the filling of rapidly recycling vesicles in the absence of exogenous GABA supply.

Sustained Vesicle Recycling Collapses Transmission in the Absence of Exogenous GABA Supply

Despite the existence of a pseudo steady-state described above, multiple repetitions of the 4 Hz train every 10 min induced a gradual but near complete rundown of GABA transmission as shown in Figure 2A. After five consecutive 500 AP trains, the maximal IPSC amplitude was reduced by 96.3% (from 1,000 \pm 36 pA to 37.5 \pm 2.5 pA), and the cumulative amplitude by 99% (Figure 2B). Impairment in vesicle recycling or vesicle filling with GABA was indicated by the reduction in steady release observed during the third and subsequent 4 Hz trains (Figures 2C and S1 available online). This reduction was maintained even if the stimulation frequency was reduced to 0.1 Hz (Figure 2A, gray circle and Figure S2). Rundown was present for depressing (Figure 2A) and facilitating synapses (Figure S3) and also developed by continuous stimulation at 1 Hz (Figure S3), with linear CV⁻²-IPSC relationship (Figure S3; slope = 1.05, r^2 = 0.89, n = 59), in agreement with a presynaptic origin.

To examine whether the time of whole-cell dialysis or the number of synaptic events was critical for this rundown, we increased the number of APs delivered per train, from 500 to 1,000 and occasionally up to 4,000 APs. Longer trains were often associated with a biphasic time course for the rundown, as shown in Figures 2D and 2E. The linear cumulative amplitude for the first and second train (r^2 = 1.00, Figure 2F) suggests that the recycling capacity was initially able to match release, until an imbalance appeared during the third train and transmission eventually collapsed (Figures 2D, 2E, and 2F). We compared the time (Figures 2D and 2G) and AP number (Figures 2E and 2H) that achieved 90% reduction in cumulative amplitude (t_{90} , AP₉₀, respectively) for trains of 500 (blue line) and 1,000 (brown line) APs. There was a significant decrease in t_{90} , from 48.8 \pm 3.5 min (500 APs/train, n = 16) to 29.4 \pm 2.6 min (1,000 APs/train,

(B) Probability distribution histograms for IPSC latency, amplitude, rise time, and decay time constant (n = 252).

(C, E, and G) Steady GABA release triggered by 1,000 APs at 4 Hz. Left: sample IPSCs traces having (C) short-term depression; (E) facilitation followed by short-term depression; (G) stable release probability. Right: traces of IPSCs at the onset (black) and at the end (red) of the sample in the left panel. Insets: average (left) and peak scaled (right) traces of IPSCs in the right panel, same colors. Horizontal bars represent 50 ms; vertical bars represent 500 pA.

(D, F, and H) Peak amplitude evoked at 0.1 Hz (gray circles) and at 4 Hz (blue crosses) for the pairs described in (C), (E), and (G), respectively.

(I) Individual (gray line) and average (blue line, n = 50) time courses of IPSC amplitude between 200 and 1,000 APs, normalized by the value at the 200th AP.

(J) Probability distribution of the steady amplitude (APs: 951–1,000) normalized by the amplitude at the 200th AP (n = 50).

(K) Normalized changes in CV⁻² and mean amplitude between 200 and 1,000 APs (open circles, red circle: mean \pm SEM).

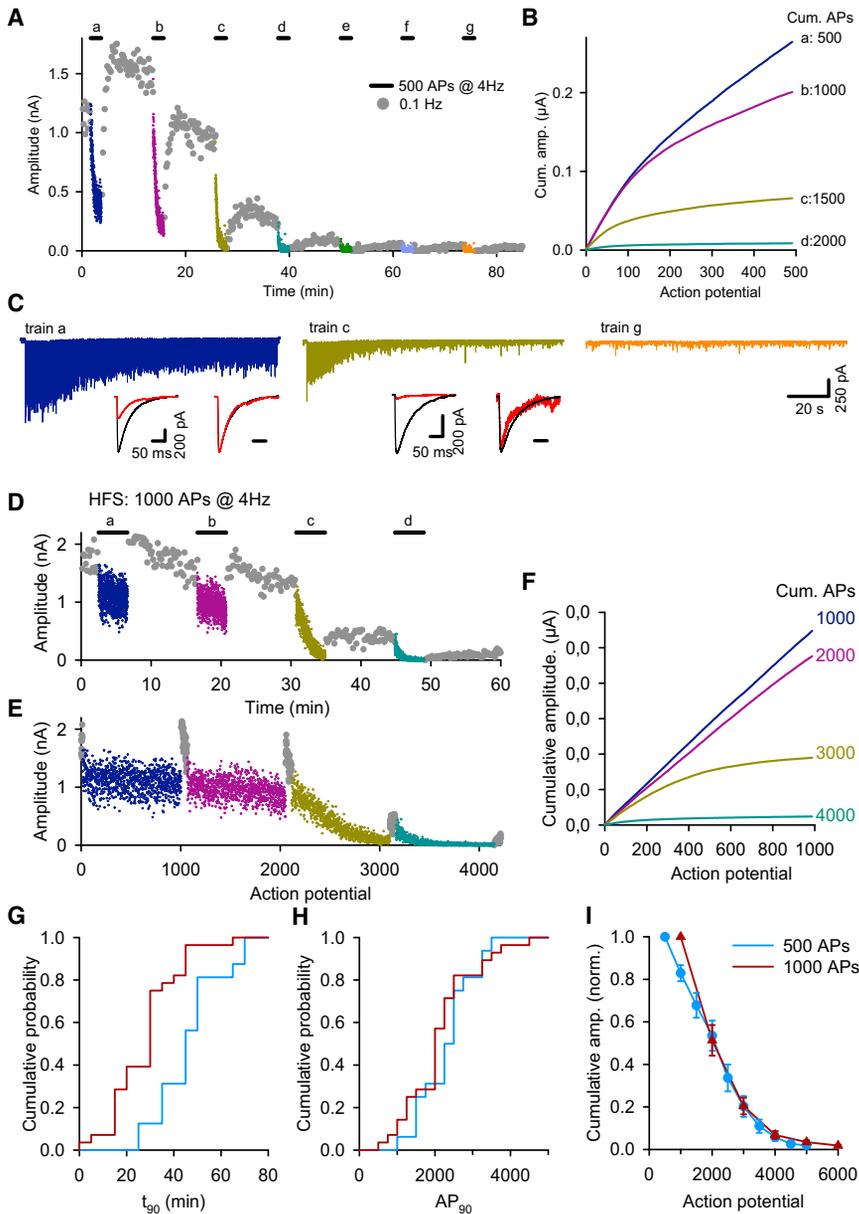


Figure 2. Sustained Activity Induces a Complete Rundown of GABAergic Transmission

(A) Rundown of IPSC amplitude evoked during seven 4 Hz trains (500 AP/train; bars a to g; crosses with different colors). (B) Cumulative amplitude for the trains (a to d) shown in (A). (C) IPSCs traces of the (a) (left), (c) (middle), and (g) (right) 4 Hz trains. Inset: average (left) and peak scaled (right) IPSCs at onset (APs: 1–10, black line) and end (APs: 491–500, red line) of the train. (D and E) IPSC amplitude evoked at 0.1 Hz (gray circles) and 4 Hz (solid bars, four trains of 1,000 APs labeled a to d) plotted as function of time (D) or AP number (E) for a cell with biphasic rundown. (F) Cumulative amplitude for the trains (a) to (d) shown in (D). (G and H) Cumulative probability of the time (t_{90}) and number of APs (AP_{90}) needed to reach 90% of the cumulative IPSC peak amplitude for pairs stimulated with trains of 500 (light blue line, $n = 15$) and 1,000 APs (dark red line, $n = 21$). (I) Cumulative amplitude \pm SEM for 4 Hz trains of 500 (light blue, $n = 15$) and 1,000 APs (dark red, $n = 21$) normalized by the value of the first train. See also Figures S1, S2, S3, and S4.

Diffusion of Transmitters from the Cell Body Partially Maintains Recycling Activity

To examine whether depletion of presynaptic GABA was the cause of rundown, we added GABA or glutamate to the presynaptic pipette. Figure 3 shows reduced rundown for representative cells patched with a pipette containing GABA (10 mM; Figures 3A and 3B) or glutamate (20 mM; Figures 3C and 3D). In control neurons, the cumulative amplitude for trains recorded after $\sim 3,000$ APs decreased to $7.3\% \pm 1\%$ ($n = 44$) of the initial value, whereas IPSC amplitude was maintained after 6,000 APs when the pipette solution contained GABA

($43.7\% \pm 9.1\%$, $n = 6$, $p < 0.001$) or glutamate ($62.5\% \pm 11\%$, $n = 8$, $p < 0.001$). We used the cumulative IPSC amplitude normalized by the initial amplitude (i.e., the equivalent number of full size IPSC [fsIPSC]) as a proxy for GABA release. In control conditions, the cumulative amplitude reached a plateau of 970.4 ± 71 fsIPSCs ($n = 44$; Figures 3E and 3F) and half of this maximum was achieved after $1,063 \pm 73$ APs ($n = 44$). In contrast, Figures 3E and 3F show that when GABA or glutamate was present in the presynaptic pipette solution, the cumulative amplitude was still increasing after 6,000 APs, reaching $2,904 \pm 540$ fsIPSCs for GABA (10–20 mM, $n = 6$, $p < 0.001$) and $2,637 \pm 358$ fsIPSCs for glutamate (20 mM, $n = 8$, $p < 0.001$). These results demonstrate that rundown is primarily caused by the loss and consumption of a finite stock of presynaptic GABA.

$n = 28$; $p < 0.001$), whereas AP_{90} s were similar: $2,408 \pm 171$ APs ($n = 16$) and $2,245 \pm 173$ APs ($n = 28$, $p = 0.54$, Figure 2H). The 19.4 min difference for the 500 APs/train can be accounted for by the two additional resting periods of 10 min needed to achieve the same number of APs as in the 1,000 APs/train protocol. Figure 2I shows the similar reduction in cumulative IPSC amplitude for consecutive trains when plotted as function of AP number.

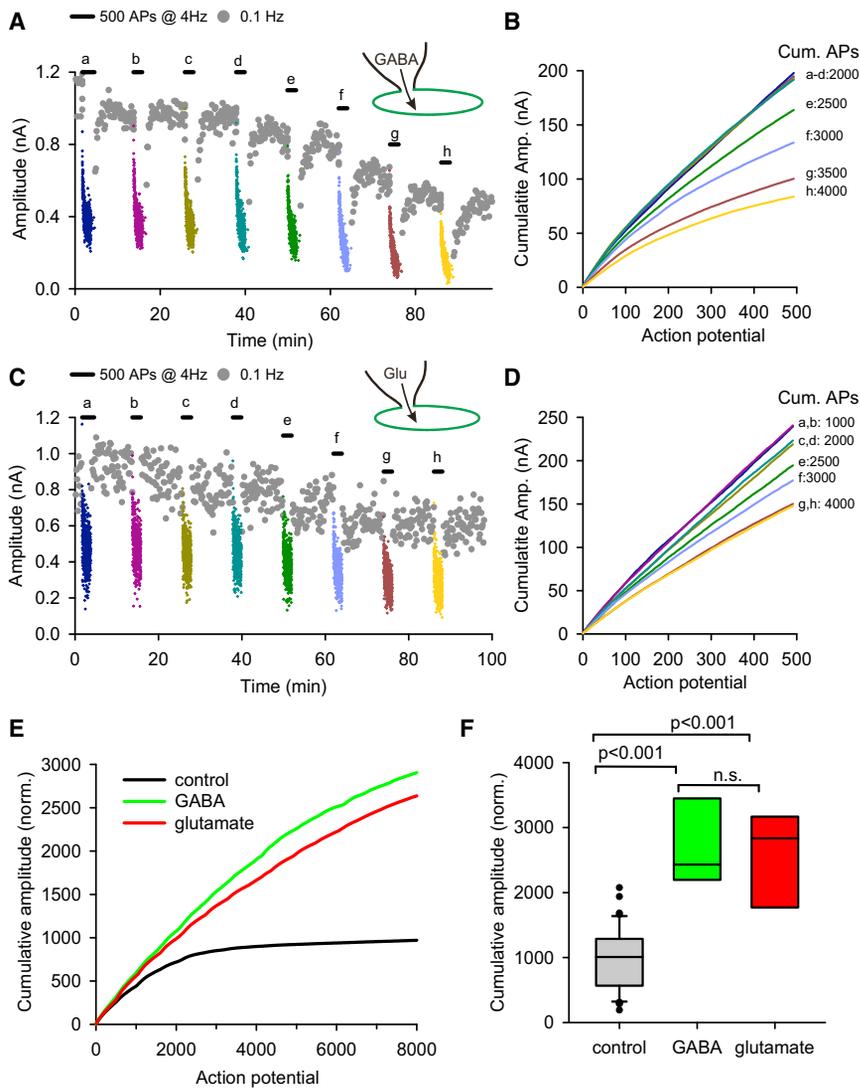


Figure 3. Somatic Supply of GABA or Glutamate Maintains Vesicle Recycling

(A) IPSC evoked by the same protocol as in Figure 2A but with GABA (10 mM) added to the presynaptic pipette solution. (B) Cumulative amplitude for the eight trains in (A). (C) Same as in (A) but with glutamate (20 mM) and 200 μ M PLP added in the pipette solution. (D) Cumulative amplitude for the eight trains in (C). (E) Average cumulative IPSC amplitude for repeated trains normalized by the initial IPSC amplitude in control (black line, $n = 20$) or in the presence of GABA (10–20 mM, green line, $n = 4$) or glutamate (20 mM with 200 μ M PLP, red line, $n = 5$). (F) Box plot showing the distribution of the final cumulative IPSC amplitude normalized by the initial amplitude with the same pairs as in (E). Mann-Whitney U test.

depleted neurons to $66.5\% \pm 6\%$ after glutamate, $n = 9$, $p < 0.001$; Figure 4G). Surprisingly, uptake of glutamine, which requires two enzymatic transformations to produce GABA, induced a similar fast and complete recovery of IPSC amplitude (from $6.4\% \pm 1.5\%$ in depleted neurons to $101\% \pm 18.3\%$ after glutamine, $n = 16$, $p < 0.001$; Figure 4G). Furthermore, GABA uptake restored the initial capacity of presynaptic neurons to support release during long stimulus train, as the cumulative IPSC amplitude after GABA application was comparable to the initial 4 Hz train ($95.3\% \pm 7\%$, $n = 8$, $p < 0.001$; Figures 4D and 4E). In contrast, lower cumulative amplitudes were observed after glutamate ($67.3\% \pm 5\%$, $n = 8$, $p < 0.001$; Figures 4D and 4E) or glutamine ($69.4\% \pm 9\%$, $n = 15$, $p < 0.001$; Figures 4D and 4E) uptake, suggesting a smaller buildup of presynaptic GABA stores via these transporters.

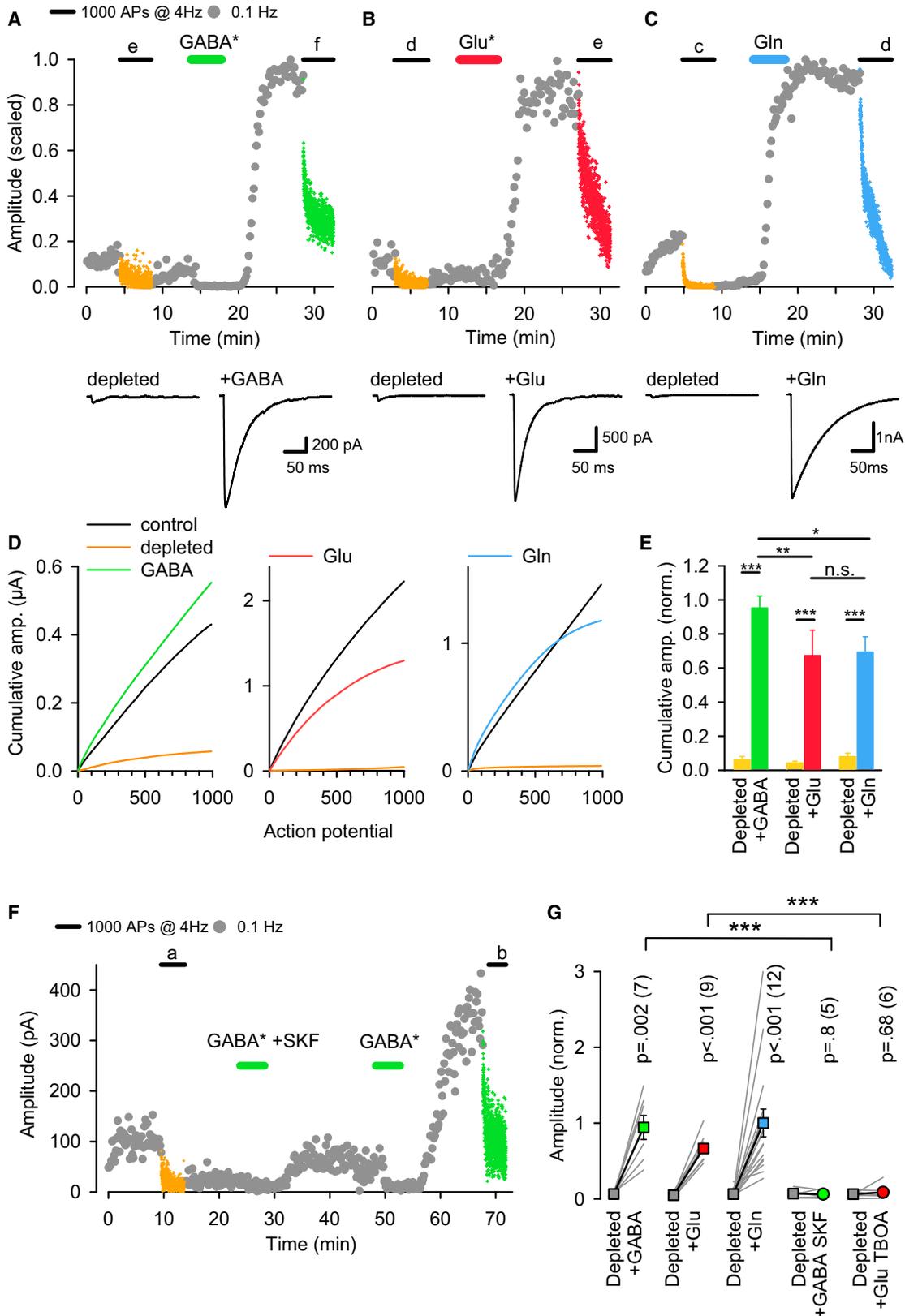
Three Neuronal Transporters Restore Vesicle Recycling in GABA-Depleted Neurons

To examine how uptake via neuronal transporters supports VIAAT-mediated vesicle loading, we first GABA depleted neuronal pairs by repeated stimulation with 4 Hz trains until the IPSC amplitude was $<10\%$ of the initial value (data not shown). We then added GABA (100 μ M; Figure 4A), glutamate (50 μ M; Figure 4B), or glutamine (2 mM; Figure 4C) to the extracellular solution and examined whether uptake could restore vesicular release and transmission. GABA and glutamate were applied in the presence of high concentrations of specific receptor inhibitors to avoid tonic activation of GABA and glutamate receptors.

The three uptake systems similarly restored synaptic release of GABA as indicated by the large potentiation in IPSC amplitude (Figures 4A–4C). On average, the normalized IPSC peak amplitude showed a 15-fold potentiation at 0.1 Hz, from $6.4\% \pm 0.9\%$ in depleted cells to $94\% \pm 1.6\%$ after a single GABA application ($n = 7$, $p = 0.002$; Figure 4G). Glutamate uptake restored a smaller fraction of the initial amplitude (from $4.8\% \pm 0.8\%$ in

To verify that the restorations were the result of transporter-mediated uptake, we applied GABA (10 μ M) in the presence of SKF-89976 (20 μ M), a specific GAT1 inhibitor (Figure 4F). There was no significant increase in IPSC amplitude after washout: $6.9\% \pm 2.8\%$ in depleted cells and $6.2\% \pm 2.7\%$ in the presence of SKF-89976 ($n = 5$, n.s.; Figure 4G). Similarly there was no restoration when glutamate (20 μ M) was applied in the presence of the EAAT1–EAAT3 inhibitor TFB-TBOA (4 μ M), with relative amplitude of $6.2\% \pm 1.7\%$ in depleted cells and $8.6\% \pm 4.2\%$ after glutamate + TFB-TBOA ($n = 6$, n.s.; Figure 4G). Since SKF-89976 and TFB-TBOA are competitive inhibitors, lower concentrations of GABA (10 μ M) and glutamate (20 μ M) were used in these experiments; these lower concentrations were also able to effectively restore transmission (Figure 4F).

The time courses of restoration for the three amino acids had t_{20-80} of 169 ± 33 s ($n = 5$) for GABA, 70.4 ± 10 s ($n = 5$) for glutamate, and 148 ± 27 s ($n = 5$) for glutamine. The values for GABA



(legend on next page)

and glutamate applications were probably overestimated, as their measurement required prior washout of the receptor inhibitors.

Glutamine Uptake Directly Supports the Filling of Rapidly Recycling Vesicles

Next, we examined whether neuronal uptake of glutamine, which is the main physiological precursor for GABA synthesis, could directly support the replenishment of vesicles during repetitive activity. **Figure 5A** shows that continuous application of extracellular glutamine (500 μ M) prevented rundown of GABA transmission, as the cumulative amplitude was maintained at $111\% \pm 31\%$ ($n = 8$, $p = 0.31$; **Figure 5B**) of the initial value after six trains of 1,000 APs compared to $1.8\% \pm 0.4\%$ in control condition ($n = 21$, $p < 0.001$; **Figure 5B**). The rate of glutamine uptake was not limiting for GABA supply, since increasing the glutamine concentration to 2 mM had no further effect on IPSC amplitude (**Figure 5C**; Cumulative Amplitude_{Gln = 2mM}/Cumulative Amplitude_{Gln = 0.5mM} = 1.0 ± 0.06 , $n = 3$, $p = 0.841$). In contrast, initiation of glutamine uptake (2 mM) during 4 Hz trains potentiated the IPSC amplitude of GABAergic neurons whole-cell patched with a pipette solution containing 20 mM glutamate (**Figure 5D**). On average, the cumulative amplitude increased 3.2-fold ± 0.75 -fold ($n = 9$, $p = 0.025$), suggesting that glutamine transporters supply recycling vesicles with a more readily available GABA source than glutamate diffusion along the axon. Similarly, during the continuous stimulation of a GABA-depleted cell (red line), glutamine uptake restored vesicle filling and IPSC amplitude (blue line) with an average time constant of 39.3 ± 4.5 s (**Figure 5E**; $n = 6$).

To gain insight into the quantal changes induced by GABA rundown and its recovery by glutamine uptake, we plotted the CV^{-2} for the experiment shown in **Figure 5E** (**Figure 5F**). The onset of depression and its restoration by glutamine were associated with marked changes in CV^{-2} , excluding a pure effect in quantal size (q , dotted line, **Figure 5F** and Monte Carlo simulations in **Figure S5**). On the other hand, the decrease in CV^{-2} was smaller than predicted for a pure effect on release probability (p , dashed line, **Figures 5F** and **S5**) and was best fit assuming a mixed change in p by 42% and q by 58% (blue line, **Figures 5F** and **S5**).

The CV^{-2} -mean amplitude relationships shown in **Figure 5G** for four representative pairs confirmed a mixed change in p and q during GABA depletion with an average reduction in p of 0.54 ± 0.056 ($n = 9$).

Together, these results demonstrate an efficient coupling between glutamine uptake and GABA synthesis for activity-dependent vesicle filling. In addition, the p and q mixed changes suggested that GABA depletion reduced both the quantal size by decreasing the amount of GABA stored and released per vesicle and, unexpectedly, the release probability.

Cytosolic GABA Regulates Release Probability

As evidence in the literature suggested that empty vesicles continue to be released and recycled after blocking the H^+ -vAT-Pase or the vesicular transporter (Croft et al., 2005; Parsons et al., 1999; Tabares et al., 2001; Wojcik et al., 2004; Zhou et al., 2000), we examined whether alteration in vesicle filling caused by GABA depletion simply scaled down transmission. **Figure 6A** compares the time course of depression for six 4 Hz trains (1,000 APs; labeled a–f) and their partial recovery at 0.1 Hz for a pair with high initial release probability. The sharp reduction in amplitude during the third train suggested a decline in GABA-filled vesicle cycling, which almost vanished in later trains (d–f; **Figures 6A** and **6C**). Uptake of extracellular glutamate (50 μ M for 4 min, data not shown) restored 75% of the initial amplitude and 46% of the cumulative amplitude (labeled g; **Figures 6B** and **6C**), confirming that the rundown was indeed caused by GABA depletion.

GABA depletion increased the paired-pulse depression (PPD) for the nine high-probability pairs analyzed (**Figure 6D**), and reinstating GABA supply restored the initial PPD value (**Figure 6D**), reinforcing the suggestion that changes in cytosolic GABA alter p . The parabolic shape of the variance-mean plot at 0.1 Hz provides further evidence for a decrease in release probability during the rundown (**Figure 6E**).

Although a reduction in p should slow the time course of depression, as in trains b and c (**Figures 6F** and **6G**), we observed instead a marked transition toward faster time course after the third train (trains d–f; **Figures 6F** and **6G**). Furthermore, reinstating GABA supply with glutamate restored p and the slow time course of depression (train g; **Figures 6F** and **6G**). This transition toward faster kinetics in GABA-depleted neurons was present in all nine high-probability pairs analyzed (**Figure 6H**), with an average 51% reduction in the weighted time constant (73.1 ± 8.1 s to 37.6 ± 4.7 s, $n = 9$, $p < 0.001$, inset **Figure 6H**).

Because the steady release probability during long train of stimulation should be related to the pool size of recycling vesicles, we hypothesized that both phenomena, the decrease in p

Figure 4. Uptake of GABA or its Precursors Restores Transmission in Transmitter-Depleted Neurons

Neurons were stimulated with three to five trains of 1,000 APs at 4 Hz (solid bar, numbered a to e) to deplete GABA stores. Only the last 4 Hz train is shown (orange crosses) with the time origin set to 0 for clarity.

(A–C) Top: scaled amplitude of IPSCs evoked at 0.1 Hz (gray circles) or 4 Hz (1,000 APs, colored crosses). Transmission recovered after applications of (A) GABA (100 μ M) in the presence of SR95531 (100 μ M); (B) glutamate (50 μ M) in the presence of a cocktail of GluR inhibitors (see **Supplemental Experimental Procedures**); and (C) glutamine (2 mM); bottom: average trace of ten IPSCs evoked at 0.1 Hz before (left) and after (right) recovery.

(D) Cumulative IPSC amplitude during trains of 1,000 APs evoked at 4 Hz for the pairs shown in (A) (left), (B) (middle), and (C) (right). The black lines correspond to the first train evoked at the onset of the recording (not shown in A–C), and the colored lines correspond to the trains shown in (A)–(C).

(E) Average \pm SEM cumulative IPSC amplitudes for the 4 Hz trains in GABA-depleted neurons (orange) and after application of GABA (green, $n = 7$), glutamate (red, $n = 9$), and glutamine (blue, $n = 16$), normalized by the first value.

(F) GABA* (+ SR95531) was applied in the presence or absence of SKF89976A (20 μ M).

(G) Normalized mean IPSC amplitude \pm SEM before (gray square) and after application of GABA ($n = 7$, green square), glutamate ($n = 9$, red square), glutamine ($n = 12$, blue square), GABA + SKF89976A ($n = 6$, green circle), and glutamate + TFB-TBOA ($n = 5$, red circle). Paired t test: *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, n.s., not statistically significant.

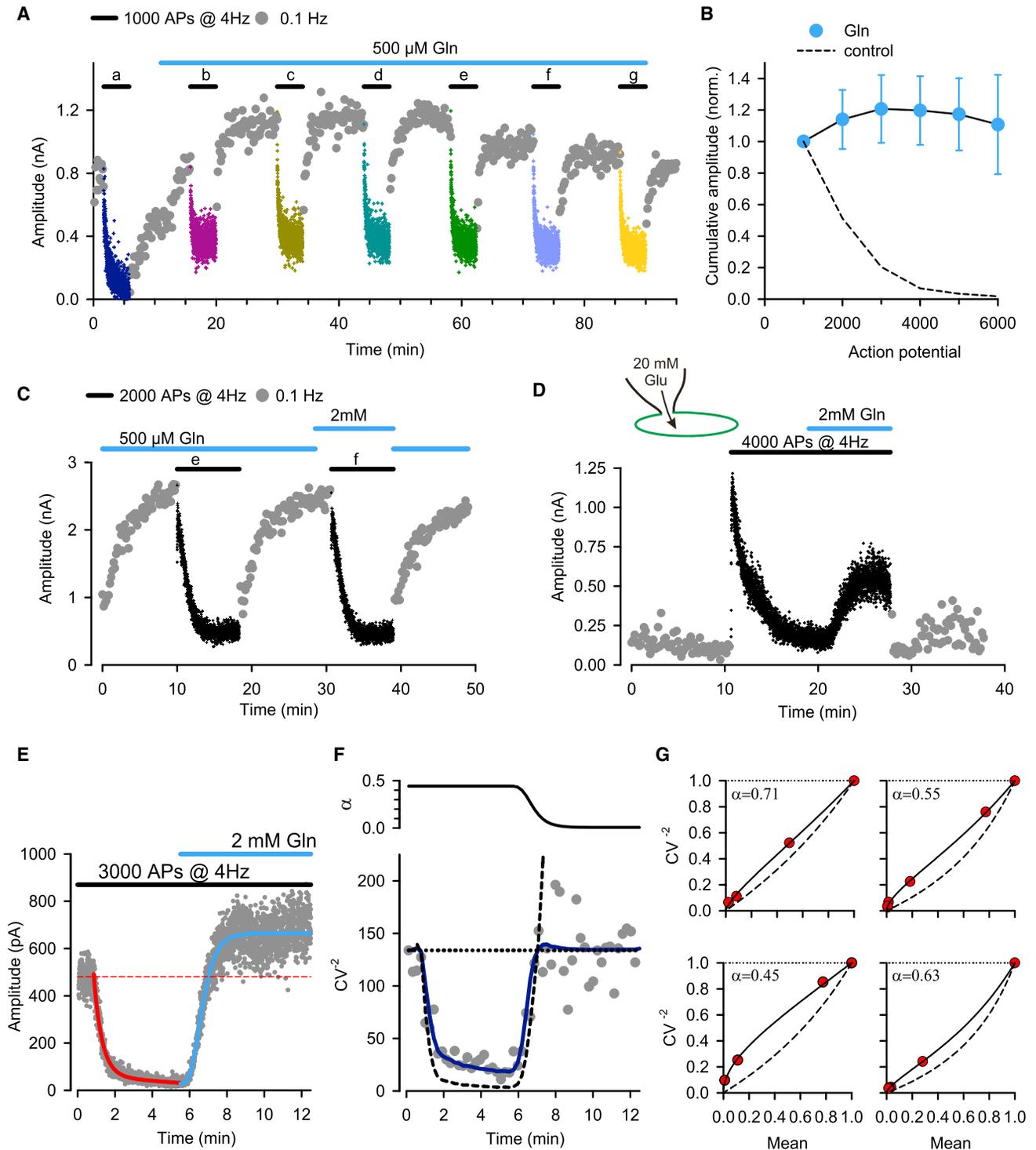


Figure 5. Glutamine Uptake Directly Supports GABA Filling of Recycling Vesicles

(A) Continuous application of glutamine (500 μ M) maintains IPSC amplitude for multiple 4 Hz trains (a to g).

(B) Cumulative IPSC amplitude \pm SEM for consecutive trains of APs in the continued presence of 500 μ M glutamine (blue circles, $n = 8$) and in control neurons (dashed line, $n = 21$), normalized to the value of the first train.

(C) The steady IPSC amplitudes are similar during 4 Hz trains of 2,000 APs when glutamine is applied at 500 μ M (train e) or 2 mM (train f).

(D) Time course of the IPSC amplitude evoked at 0.1 Hz (gray circles) and at 4 Hz (black crosses, solid line) in a facilitating pair. The presynaptic pipette contained 20 mM glutamate that maintained 28.7% of the initial cumulative amplitude after five trains of 2,000 APs (data not shown). Application of extracellular glutamine (2 mM, blue bar) potentiated GABA release.

(legend continued on next page)

associated with a faster time course of depression, could be explained if the number of recycling vesicles was dynamically controlled by the cytosolic GABA concentration.

GABA Depletion Reduced the Frequency of Miniature Asynchronous Release

To address this hypothesis, we recorded asynchronous miniature events to directly examine the quantal change during GABA depletion. Substitution of Sr^{2+} for Ca^{2+} in the extracellular solution reduced synchronous evoked IPSCs (eIPSCs) triggered at 1 Hz (Figure 7A, green trace). Evidence for asynchronous release in Sr^{2+} was indicated by a 2.2-fold increase in the frequency of miniature IPSCs (amIPSCs) detected over 200 ms after the stimulation (37.5 ± 4.0 Hz, $n = 10$; Figures 7A and 7B, red), compared to spontaneous miniature IPSCs (mIPSCs) measured before the AP (17.4 ± 2.1 Hz, $n = 10$, $p < 0.001$, Figures 7A and 7B, blue). On average, the amIPSCs frequency decayed to the mIPSCs frequency with a $\tau_w = 302 \pm 65$ ms ($n = 8$) and their initial mean amplitudes were not significantly different (amIPSC = 42 ± 6 pA and mIPSC = 29.7 ± 2.3 pA, respectively, $n = 10$, $p = 0.24$, Figure 7C).

Repetitive 1 Hz stimulation in Sr^{2+} induced a gradual rundown of the eIPSCs by $86.3\% \pm 2.5\%$ after 3,000 APs ($n = 10$, $p < 0.001$, Figures 7D, 7E, and 7K). This rundown was associated with a $77.9\% \pm 7.7\%$ reduction in amIPSC frequency (Figures 7F, 7H, 7J, and 7K; $n = 10$, $p < 0.001$) and a reduction in amIPSC amplitude of $33.3\% \pm 7\%$ ($n = 10$, $p = 0.007$, Figures 7G, 7I, and 7K). Application of glutamine in a predepleted cell restored eIPSC to 45% of their initial amplitude (initial: 3,815 pA [data not shown]; depleted: 50 pA; restoration by glutamine: 1,700 pA; Figure 7L) and potentiated the frequency and amplitude of amIPSCs (Figures 7M and 7N). In four GABA-depleted pairs, the frequency of amIPSCs increased after glutamine application, from 15.2 ± 8.1 Hz to 41.3 ± 11.2 Hz ($p = 0.026$), whereas the frequency of mIPSCs remained unchanged (16.3 ± 9.3 Hz and 15.5 ± 8.2 Hz, $p = 0.55$). In addition, glutamine increased the amplitude of amIPSCs from 30.5 ± 4.2 pA to 47 ± 7.5 pA ($p = 0.017$) but not the amplitude of mIPSCs (34.3 ± 4.0 pA before and 37.7 ± 6.7 pA after glutamine uptake, $p = 0.41$).

The larger reduction in amIPSC frequency is in agreement with the hypothesis of a smaller pool of vesicles available for release as GABA is depleted.

Reduced Vesicles Cycling in Transmitter-Depleted Terminals

To directly examine vesicle recycling, we measured the labeling of synaptic vesicles in control (i.e., $[\text{Gln}]_i = 2$ mM) and transmitter-depleted neurons with the fluorescent dye FM5-95

applied during the last train of the electrical field stimulation protocol (FM protocols are illustrated in Figure S6).

In contrast to the high-intensity fluorescence of FM5-95-stained puncta observed in control neurons (Figure 8A, left), we found that neurons incubated for 2 hr in a medium containing a reduced concentration of glutamine (20 μM) showed a significant reduction in FM5-95 labeling (Figure 8A, right). On average, the mean fluorescence intensity of FM5-95 spots decreased by 49%, from 2.8 ± 0.33 a.u. ($n = 7$) in control neurons to 1.47 ± 0.1 a.u. ($n = 5$, $p = 0.005$) in glutamine-depleted neurons (Figure 8B). The reduction in FM5-95 labeling indicated lower vesicle trafficking when transmitter supply was limiting for filling during a train of stimulation.

Next, we examined whether glutamine uptake restored vesicle cycling in transmitter-depleted neurons. Following electrical field stimulation that mimicked our depletion protocol in pairs (Figure S6), transmitter-depleted neurons were weakly stained with FM5-95 (Figure 8Ca). Repeating the electrical stimulation in the presence of glutamine (2 mM, see protocol in Figure S6) significantly increased the fluorescence intensity of FM5-95 puncta during a second FM application (Figures 8Cd and 8E). These results confirm that vesicle trafficking is regulated by the cytosolic transmitter concentration during sustained recycling activity.

FM-staining at EGFP-expressing varicosities was also specifically examined. A large fraction of these were colabeled by a fluorescent antibody against the C terminus of VIAAT ($42\% \pm 1.7\%$; $n = 3$ experiments; Figure 8D). Comparison of the FM5-95 fluorescence in EGFP-varicosities and all puncta shows similar potentiation in the presence of glutamine, as shown in the inset of Figure 8E, although the absolute fluorescence was lower at EGFP-expressing varicosities (Figure 8C).

Together, these results confirm that cycling vesicle trafficking was reduced as cytosolic transmitter is depleted, a mechanism that preserves GABA resource and a threshold amount of GABA in released vesicles.

DISCUSSION

The availability of release-ready vesicles is considered the limiting factor in sustaining Ca^{2+} -evoked exocytosis at small central synapses (Neher, 2010; Zucker and Regehr, 2002), although maintaining transmission obviously requires that vesicles be filled with neurotransmitter before release (for review see Südhof, 2004). At inhibitory synapses, the VIAAT-mediated loading process remains poorly characterized, despite evidence indicating that alterations in GABA release are a presynaptic source of variability and plasticity (Barberis et al., 2004; Engel et al., 2001; Frerking et al., 1995).

(E) Time course of IPSC amplitude evoked at 4 Hz for 3,000 APs in a prestimulated neuron (5,000 APs, data not shown). Application of glutamine (2 mM, blue bar) restored GABA release. The red dashed line is the mean amplitude at the onset of the train. The solid red line is a biexponential fit with $\tau_1 = 26.4$ s and $\tau_2 = 376$ s. The solid blue line is the fit with a modified Gompertz equation with $\tau = 29$ s.

(F) CV^{-2} plotted as function of time for the experiment shown in (E). The lines are the predicted CV^{-2} for a pure change in q (dotted line), pure change in p (dashed line), and mixed change (blue solid line). Top panel represents α , the relative fraction for the change in p ($p = x^\alpha$ and $q = x^{(1-\alpha)}$, where x is the normalized amplitude).

(G) CV^{-2} -mean relationship for four representative pairs. The mean amplitude and CV^{-2} were calculated for the last 270 APs of each train and normalized by the initial value. The lines are the predicted CV^{-2} for a binomial equation assuming pure change in q (dot line), pure change in p (dashed line), or mixed change (solid line). The α value is indicated for each pair, see also Figure S5.

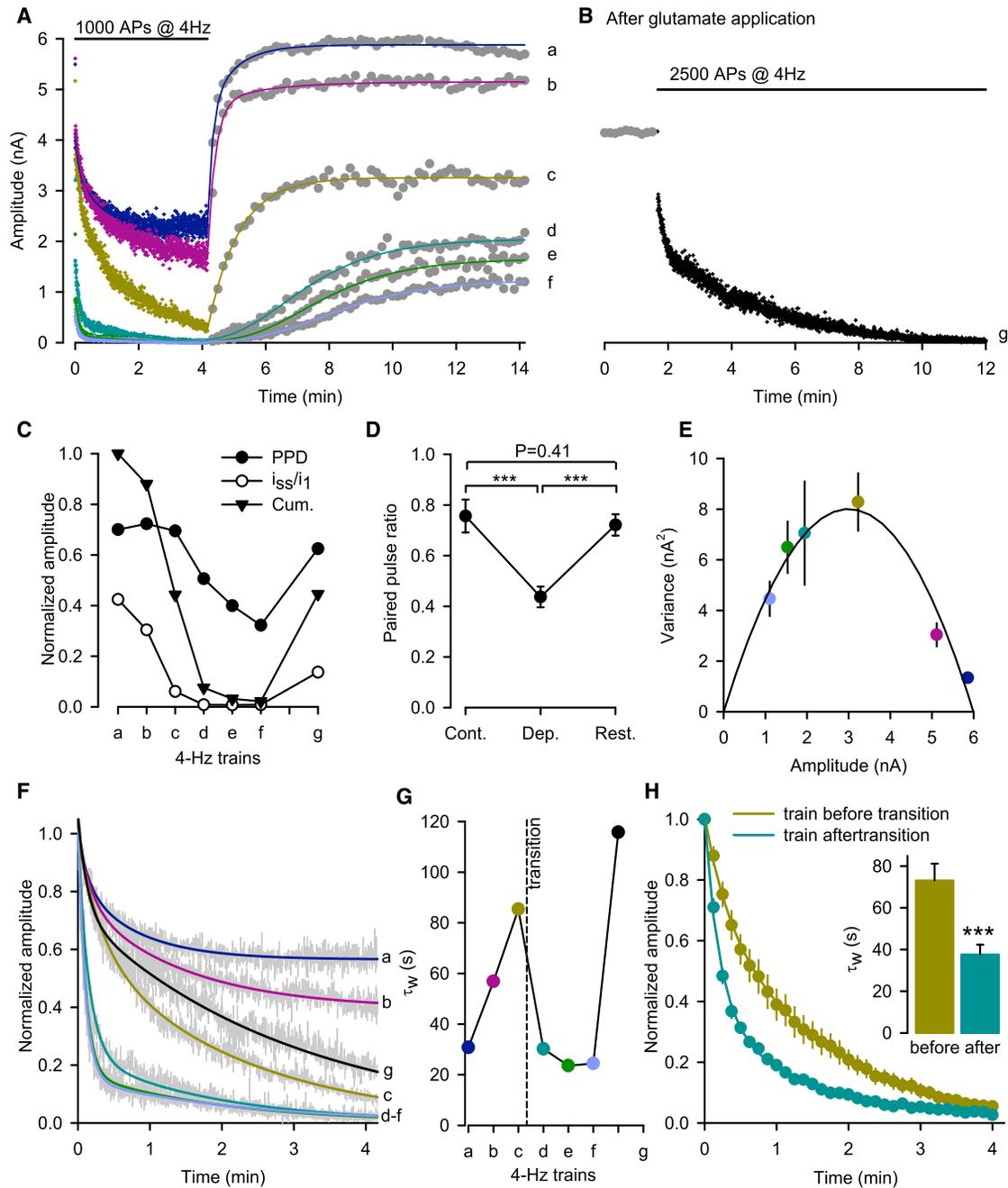


Figure 6. GABA Depletion Decreases the Release Probability

(A) Change in the time course of depression during six (a to f) consecutive 4 Hz trains of 1,000 APs (colored crosses) and recovery (0.1 Hz, gray circles) in a high-releasing cell. The solid lines represent exponential fits to the data at 0.1 Hz.

(B) Collapse of transmission within 2,500 APs at 4 Hz after recovery by glutamate application (50 μ M, data not shown) for the (same cell as in A).

(C) Paired-pulse depression (closed circles) at onset of 4 Hz train, average steady-state amplitude (open circles) for the last 30 APs of each train normalized to the initial amplitude and cumulative amplitude (closed triangles) for each 4 Hz train normalized by the first value.

(D) Average \pm SEM paired-pulse depression in control (cont), after GABA depletion (dep), and restoration of GABA supply (rest) for nine pairs with high releasing properties. Paired t test.

(E) Variance \pm SEM mean amplitude plot for the recovery at 0.1 Hz after each train as indicated by the same color code as in (A). The solid line represents the fit for a simple binomial model with pure change in p.

(F) Biexponential fit of the time course of depression for the six 4 Hz trains shown in (A). The first IPSC was disregarded.

(G) Weighted time constants for each train shown in (F).

(H) Average \pm SEM time course of depression for trains evoked before and after the kinetic transition induced by GABA depletion in nine pairs. The solid line represents biexponential fits. Inset: average \pm SEM weighted time constants for the train before and after the transition. Paired t test.

Somatic GABA Supply Partially Supports VIAAT Loading at Presynaptic Terminals

We show that sustained vesicle recycling together with whole-cell dialysis can exhaust all cytosolic sources of GABA when neurons have access only to D-glucose, as neurons cannot synthesize GABA from D-glucose (Bak et al., 2006). This starvation condition is opposite to the ad libitum access to glutamine prevailing in culture media (2 mM) or in vivo (~0.5 mM). Although soluble cytosolic factors may have been diluted by prolonged whole-cell recordings—e.g., GABA stocks, factors involved in the vesicle cycle (Ertunc et al., 2007; Kraushaar and Jonas, 2000), or GABA synthesis—we showed that the GABA depletion described here originates mainly from an activity-dependent consumption of the cytosolic stocks of GABA and its precursors. This transmitter depletion suggests that the amount of GABA needed to fill the pool of recycling vesicles is not negligible, as expected if VIAAT operates near its thermodynamic equilibrium (1,000-fold accumulation for 1 H⁺/1 GABA stoichiometry; see Edwards, 2007).

High concentrations (10–20 mM) of GABA or glutamate in the presynaptic pipette partially prevented rundown of transmission, indicating that diffusion from the cell body can supply GABA to fast recycling vesicle, as shown for glycine at spinal cord and brainstem synapses (Apostolides and Trussell, 2013; Rousseau et al., 2008).

GABA Availability Regulates the Vesicle Cycle

It is generally accepted that the vesicle and the transmitter cycles are not directly coupled (Edwards, 2007) because empty vesicles can undergo futile cycles of exo-/endocytosis (Croft et al., 2005; Hori and Takahashi, 2012; Parsons et al., 1999; Tabares et al., 2001; Wojcik et al., 2004; Zhou et al., 2000).

However, our data suggest that the accumulation of empty vesicles in GABA-depleted synapses during long episodes of stimulation somehow slows their reuse. Quantal analysis of amIPSCs recorded in Sr²⁺ during GABA depletion shows that their mean amplitude was maintained well above detection threshold, suggesting that vesicles released an amount of GABA that is equal to or greater than some minimum. Furthermore, the reduction in amIPSC frequency and the reduction in release probability suggest that GABA depletion decreased the number of quanta released, as observed in choline-deprived *Aplysia* neurons (Poullain et al., 1986) and consistent with the reduction in frequency of miniature and spontaneous IPSCs produced by inhibition of GABA synthesis (Engel et al., 2001; Obata et al., 2008).

Our results confirm that rapid filling of recycling vesicles maintains the plateau phase of GABA release during repeated stimulation (Ertunc et al., 2007; Kraushaar and Jonas, 2000). Manipulations that compromise vesicle filling either by reducing vesicle reacidification (Ertunc et al., 2007) or, as shown here, by depleting cytosolic GABA increase the extent but also the rate of synaptic depression, suggesting a reduction of the pool of vesicles available for release. In contrast, increasing the luminal pH buffer of recycling vesicles generated by miniature IPSCs was found to reduce their amplitude but not their frequency (Riazanski et al., 2011). These differences argue for an activity-dependent regulation in the trafficking of empty vesicles. In agreement, we show a significant reduction in FM5-95 vesicle

labeling in glutamine-depleted neurons that is restored by resupplying glutamine.

Reversible reduction of the pool of releasable vesicles may preserve their filling under limited GABA resources. Recent evidence supports the existence of dynamic exchanges between pools of cycling and resting vesicles at small central synapses (see review in Denker and Rizzoli, 2010), for example by regulating the balance of CDK5/calceineurin activity (Kim and Ryan, 2010; Marra et al., 2012).

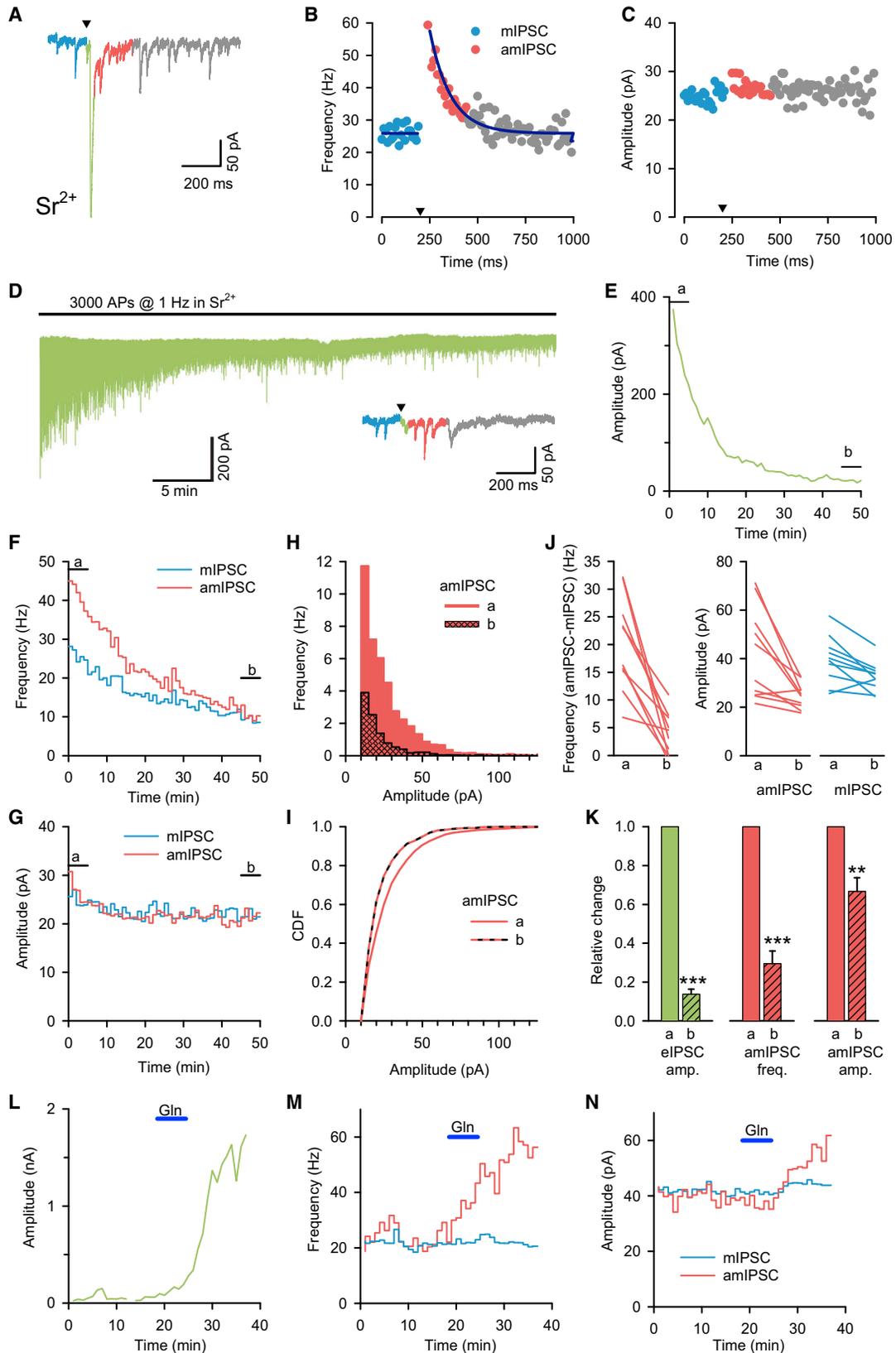
Critical Roles of Neuronal Transporters for Presynaptic GABA Supply

After activity-dependent rundown, inhibitory transmission was restored in minutes by initiating GABA, glutamate, or glutamine uptake. This clearly demonstrates that presynaptic vesicle cycling and GABA synthesis remain functional during the rundown and is in agreement with anatomical evidence indicating that GAT1 (Chiu et al., 2002; Fish et al., 2011), EAAC1 (Conti et al., 1998; He et al., 2000), and SNAT1/SAT1 (Solbu et al., 2010) are expressed in the axon and terminals of GABAergic neurons.

In contrast to the critical role of the neuronal glycine transporter GlyT2 in glycinergic transmission (Apostolides and Trussell, 2013; Gomez et al., 2003; Rousseau et al., 2008), genetic inactivation and pharmacological inhibition of GAT1, EAAC1, or SNAT1/SAT1 show that none of these transporters is essential for vesicular GABA release. Although GAT1 is responsible for 95% GABA uptake in synaptosomes (Chiu et al., 2002), its inactivation in GAT1^{-/-} knockout mice increased extracellular GABA without disrupting transmission or GABA accumulation in terminals (Bragina et al., 2008; Chiu et al., 2005; Jensen et al., 2003) and the behavioral defects phenocopy the clinical side effects of Tiagabine, an antiepileptic GAT1 inhibitor (Chiu et al., 2005). Inhibition of EAAC1 decreased the amplitude of miniature and spontaneous IPSCs in hippocampal slices (Mathews and Diamond, 2003; Sepkuty et al., 2002) and EAAC1 knockdown induces seizures indicating excitation/inhibition imbalance (Rothstein et al., 1996; Sepkuty et al., 2002).

Our results show that GABAergic neurons grown in media containing glutamine have the capacity to maintain significant cytosolic GABA stores and continue to fill vesicles during the prolonged absence of extracellular glutamine. A similar reservoir was also demonstrated for glutamate in excitatory hippocampal neurons (Kam and Nicoll, 2007), indicating that it may be a common feature to glutamine-supplied neurons. This cytosolic GABA stock and the activity- and age-dependent change in SNAT1/SAT1 expression (Brown and Mathews, 2010) makes it difficult to dissect the contribution of the glutamate/glutamine cycle for GABA vesicular release. Nevertheless previous work has shown that blocking neuronal glutamine uptake or astrocytic glutamine synthesis decreased the amplitude of evoked and miniature GABAergic IPSCs in hippocampal slices (Fricke et al., 2007).

In conclusion, our data show the synergy between GABA, glutamate, and glutamine transporters and VIAAT-mediated vesicular accumulation of GABA. In addition, our results suggest that the vesicle cycle adapts to prolonged GABA depletion by reducing the number of recycling vesicles, thus matching available GABA resources.



(legend on next page)

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Primary Neuron Cultures

Neonatal hippocampal neurons derived from heterozygous transgenic mice from the GAD65_{3e/gfp5.5#30} line (López-Bendito et al., 2004) on a C57BL/6 background were cultured on an astroglial monolayer as described in (Kaeche and Banker, 2006) (for more details, see Supplemental Experimental Procedures).

Electrophysiology

Paired whole-cell patch-clamp recordings of identified inhibitory connections were performed at ~30°C in cultured hippocampal neurons (8–20 days in vitro). Neurons were continuously bathed with an external solution containing 140 mM NaCl, 2.4 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM glucose, and 10 mM HEPES (pH 7.4). The internal solution for presynaptic neurons contained 155 mM K-gluconate, 4 mM KCl, 0.1 mM EGTA, 5 mM Mg-ATP, 0.2 mM Pyridoxal 5'-phosphate, and 10 mM HEPES adjusted to pH 7.4 with KOH. The internal solution for the postsynaptic cells contained 140 mM CsCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, 1 mM BAPTA, 5 mM Mg-ATP, 5 mM QX314, and 10 mM HEPES, adjusted to pH 7.4 with CsOH. The osmolarities of all solutions were 290–300 mOsm (for more details, see Supplemental Experimental Procedures).

Asynchronous Events

Sr²⁺ was substituted for Ca²⁺ in the external solution to record miniature-like asynchronous events at 0.1 or 1 Hz. Data were analyzed offline using SpAcAn (<http://www.spacan.net>). Synchronous synaptic responses were detected during the 10 ms period after the peak of AP. Miniature events were detected during the 10 s or 1 s sweeps starting 20 ms after the peak of AP. The threshold was set at 10 pA in most recordings.

Data Analysis

The latency for paired recordings corresponds to the delay between the peak of the action potential and the maximum of the rising slope of the IPSC. The IPSC peak amplitudes are plotted as absolute values in time course plot. The IPSC decay was fitted by the sum of two exponentials: $A_t = A_1 e^{-(t-t_0)/\tau_1} + A_2 e^{-(t-t_0)/\tau_2}$, where A_1 and A_2 are the amplitudes of the two components and τ_1 and τ_2 are the time constants. The amplitude-weighted decay time constant is calculated as: $\tau_w = (A_1 \tau_1 + A_2 \tau_2) / (A_1 + A_2)$.

The time course for short-term depression was fitted by a sum of exponentials (typically 2) with an offset. The first IPSC in a train was not included because of its undefined frequency. Recovery at 0.1 Hz was fitted with mono- or biexponential time course:

$$A_t = A_0 + A_1 \left(1 - e^{-(t-t_0)/\tau_1}\right) + A_2 \left(1 - e^{-(t-t_0)/\tau_2}\right),$$

while sigmoid time courses were best fitted using a modified Gompertz equation:

$$A_t = A_0 + A_1 e^{-e^{-(t-t_0)/\tau}}$$

The cumulative amplitude represents the sum of the peak absolute amplitudes of the IPSC evoked during a 4 Hz train. The cumulative IPSC amplitude for the i_{th} train is indicated as Cumulative Amplitude _{i} .

Segmented variance was calculated for multiple of three IPSCs with no overlap. The normalized changes in CV^{-2} and variance were fitted as function of time (Figure 5F) or mean amplitude (Figures 5G and 6E) using the set of equations for a simple binomial model:

$$\begin{cases} x = \frac{A}{n p q} \\ VAR = n p q^2 x^{(2-\alpha)} (1 - p x^\alpha) \\ CV^{-2} = \frac{n p x^\alpha}{1 - p x^\alpha} \end{cases}$$

where n is the apparent number of release sites, p is the apparent release probability, and q is the apparent quantal size; x corresponds to the amplitude change, with a fraction x^2 for p change and $x^{(1-\alpha)}$ for q change (Kraushaar and Jonas, 2000).

FM-Based imaging

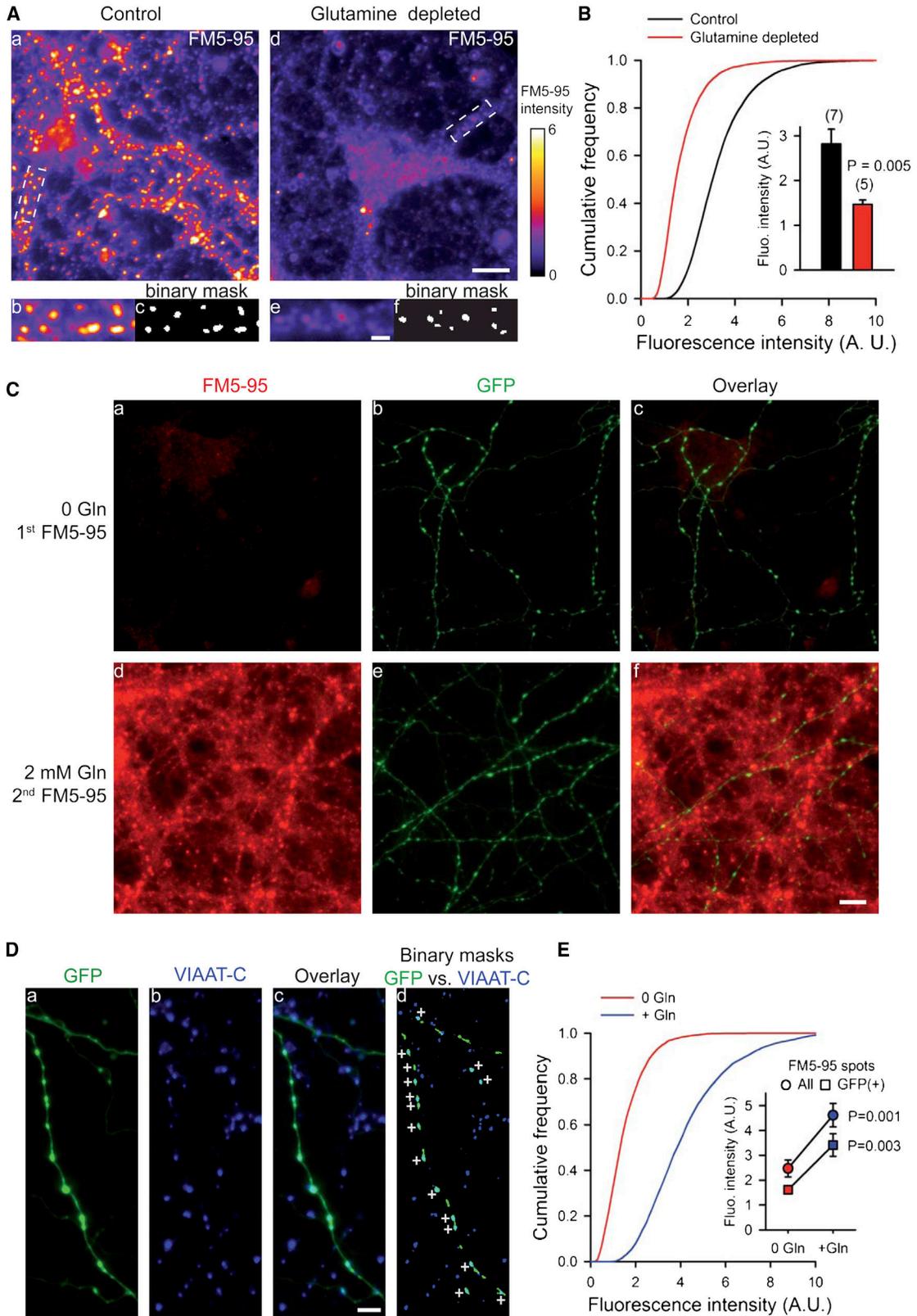
Recycling synaptic vesicles were labeled with the styryl dye FM5-95 (Molecular Probes) during a single train of field stimulation using a pair of platinum wires placed across a 12 mm coverslip (biphasic current pulses of 10 mA using an A-M system 2100 stimulator). Stimulation protocols consisting of cycles of 1,000 pulses at 4 Hz and 60 pulses at 0.1 Hz, similar to those used to induce “rundown” in the electrophysiological experiments, were controlled and chained by PClamp 8 using a Digidata 1200 interfaced with the stimulator. The external solution contained NBQX (5 μ M), MK801 (2 μ M), 5,7-Dichlorokynurenic acid (5 μ M), and SR95531 (5 μ M) to prevent recurrent activity. All experiments were performed at 28°C–30°C, and FM5-95 (5 μ M) was added during the final train of stimulation. Surface FM labeling was washed off for 15 min with control solution + ADVASEP-7 (1 mM) before imaging (see Figure S6).

We used two protocols for depleting the cytosolic stocks of glutamate and GABA, as shown in Figure S6. First, the glutamine concentration in the growth media was decreased from 2 mM (control) to 20 μ M (glutamine depleted) 2 hr before electrical field stimulation. Alternatively, the coverslip was stimulated electrically by seven cycles in the absence of external glutamine and the presence of glutamate and GABA receptor inhibitors. FM5-95 was added only during the seventh train. After image acquisition, electrical stimulation was reinstated for one to three trains. Glutamine (2 mM) was applied for 10 min and a second FM application was carried out during the last train (Figure S6).

Identification of inhibitory synapses at EGFP boutons was carried out using the VIAAT antibody against the C-term luminal domain, fluorescence labeled with Oyster-650 (Synaptic System). Although sparse labeling with VIAAT

Figure 7. Quantal Changes Underlying GABA-Dependent Transmission Collapse and Restoration

- (A) Representative 1 s sweep recorded in Sr²⁺ at the onset of the 1 Hz stimulation shown in (D). A significant evoked IPSC (eIPSC) component was still detectable within a time window of 10 ms after APs (green trace), whereas numerous asynchronous miniature-like IPSCs (amIPSCs, red trace) were detected within a time window of 200 ms following the AP. mIPSCs were analyzed in a 200 ms time window (blue trace) before AP (black triangle).
- (B) Average frequency of mIPSCs (blue) and amIPSCs (red) detected every 20 ms during 1 s sweep for the first 300 APs. The solid line represents the exponential fit, with a time constant of 110 ms.
- (C) Average amplitude of mIPSCs (blue) and amIPSCs (red) detected as in (B).
- (D) Trace of eIPSCs during continuous stimulation (3,000 APs at 1 Hz) in the presence of Sr²⁺. Inset: representative 1 s sweep at the end of the recording.
- (E) Time course of the eIPSC amplitude at 1 Hz in presence of 2 mM Sr²⁺.
- (F and G) Frequency (F) and amplitude (G) of mIPSCs (blue line) and amIPSCs (red line) recorded in the same experiment as in (E).
- (H and I) Frequency (H) and cumulative distribution function of the amplitude (I) for amIPSCs during 300 sweeps at onset (a, red) and end (b, red dashed).
- (J) Change in frequency (left) and amplitude (right) for the mIPSCs (blue) and amIPSC (red) recorded at onset (a) and end (b) of the 1 Hz stimulation for ten pairs.
- (K) Bar graph of the relative change + SEM of eIPSC amplitude (green) and amIPSC amplitude and frequency (red) at onset (a, solid) and end (b, dash) of the 1 Hz stimulation; paired t test.
- (L) Glutamine (2 mM, blue bar) restored the amplitude of eIPSC at 0.1 Hz in a GABA predepleted neuron previously stimulated with 7,000 APs (data not shown; eIPSC_{depleted}/eIPSC_{initial} = 0.013).
- (M and N) Frequency (M) and amplitude (N) of amIPSCs during restoration by glutamine.



(legend on next page)

antibody could be observed after one train of electrical field stimulation, more robust staining was obtained during prolonged incubation with the antibody (2–12 hr; 0.5 $\mu\text{g}/\text{coverslip}$). We found that $13\% \pm 1.2\%$ ($n = 3$) of VIAAT(+)-labeled spots were EGFP(+), in agreement with EGFP being expressed in transgenic GAD65:EGFP mice only in a subset of interneurons derived from the caudal-ganglionic eminence (López-Bendito et al., 2004; Tricoire et al., 2011).

Fluorescence images of FM5-95, EGFP, and Oyster-650 were acquired on an Olympus IX71 microscope using a 60 \times LUCPLFLN 0.7 NA objective and a high-illumination light source (SOLA Lumencor). Images of $1,002 \times 1,004$ pixels were collected using an IXON 885 ANDOR camera controlled by micro-manager (NIH). During image acquisition, Mg^{2+} replaced Ca^{2+} in the external solution to reduce Ca^{2+} dependent exocytosis.

Ten images were typically acquired for each condition and the quantification of fluorescence was carried out on raw images using ICY (de Chaumont et al., 2012). Binary images of FM5-95 and EGFP puncta were generated using the ICY spot detector plugin (Olivo-Marin, 2002), and FM5-95 fluorescence intensities are the average intensity of individual spots, with an average density of 4 ± 0.2 FM spots/ $100 \mu\text{m}^2$ ($n = 15$ experiments). Images were processed using ImageJ (NIH). Panel D in Figure 8 was filtered using ICY median filter (half size of 2).

Statistics

Results are reported as mean \pm SEM with the sample size indicated in parentheses. Student's t test or Mann-Whitney rank-sum test was used to assess differences between two related or independent sample groups using Sigma-Plot software. Asterisks indicate * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. n.s. signifies no statistical difference.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Supplemental Experimental Procedures and six figures and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2013.07.021>.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Gábor Szabó for the generous gift of the EGFP-GAD65 mice. We thank Boris Barbour, Philippe Ascher, and Mariano Casado for critical reading and suggestions; Stéphane Dieudonné, Païkan Marcaggi, and Bernard Poulain for stimulating discussions; Guillaume Dugué and Charly Rousseau for SpAcAn development; and Pr Yinghe Hu for his interest. This project is supported by the CNRS, INSERM, and a grant from the Association Française contre les Myopathies (AFM). L.W. was supported by fellowships from East China Normal University, the CHINA Scholarship Council, the Fondation pour la Recherche Médicale, and a grant from the Region Ile de France. P.T. was supported by postdoctoral fellowships from the Neurosciences pole of Research in Ile de France (NeRF) and the Fondation Pierre-Gilles de Gennes. L.B. is a recipient of Ministère de la Recherche et de la Technologie PhD fellowship. K.A. was supported by a postdoctoral fellowship from the Association Française contre les Myopathies (AFM).

Accepted: July 19, 2013

Published: October 2, 2013

REFERENCES

- Apostolides, P.F., and Trussell, L.O. (2013). Rapid, activity-independent turnover of vesicular transmitter content at a mixed glycine/GABA synapse. *J. Neurosci.* *33*, 4768–4781.
- Asada, H., Kawamura, Y., Maruyama, K., Kume, H., Ding, R.G., Kanbara, N., Kuzume, H., Sanbo, M., Yagi, T., and Obata, K. (1997). Cleft palate and decreased brain gamma-aminobutyric acid in mice lacking the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *94*, 6496–6499.
- Atluri, P.P., and Ryan, T.A. (2006). The kinetics of synaptic vesicle reacidification at hippocampal nerve terminals. *J. Neurosci.* *26*, 2313–2320.
- Aubrey, K.R., Rossi, F.M., Ruivo, R., Alboni, S., Bellenchi, G.C., Le Goff, A., Gasnier, B., and Supplisson, S. (2007). The transporters GlyT2 and VIAAT cooperate to determine the vesicular glycinergic phenotype. *J. Neurosci.* *27*, 6273–6281.
- Bak, L.K., Schousboe, A., and Waagepetersen, H.S. (2006). The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J. Neurochem.* *98*, 641–653.
- Barberis, A., Petrini, E.M., and Cherubini, E. (2004). Presynaptic source of quantal size variability at GABAergic synapses in rat hippocampal neurons in culture. *Eur. J. Neurosci.* *20*, 1803–1810.
- Bragina, L., Marchionni, I., Omrani, A., Cozzi, A., Pellegrini-Giampietro, D.E., Cherubini, E., and Conti, F. (2008). GAT-1 regulates both tonic and phasic GABA(A) receptor-mediated inhibition in the cerebral cortex. *J. Neurochem.* *105*, 1781–1793.
- Brown, M.N., and Mathews, G.C. (2010). Activity- and age-dependent modulation of GABAergic neurotransmission by system A-mediated glutamine uptake. *J. Neurochem.* *114*, 909–920.
- Chiu, C.S., Jensen, K., Sokolova, I., Wang, D., Li, M., Deshpande, P., Davidson, N., Mody, I., Quick, M.W., Quake, S.R., and Lester, H.A. (2002). Number, density, and surface/cytoplasmic distribution of GABA transporters at presynaptic structures of knock-in mice carrying GABA transporter subtype 1-green fluorescent protein fusions. *J. Neurosci.* *22*, 10251–10266.
- Chiu, C.S., Brickley, S., Jensen, K., Southwell, A., McKinney, S., Cull-Candy, S., Mody, I., and Lester, H.A. (2005). GABA transporter deficiency causes tremor, ataxia, nervousness, and increased GABA-induced tonic conductance in cerebellum. *J. Neurosci.* *25*, 3234–3245.
- Conti, F., DeBiasi, S., Minelli, A., Rothstein, J.D., and Melone, M. (1998). EAAC1, a high-affinity glutamate transporter, is localized to astrocytes and gabaergic neurons besides pyramidal cells in the rat cerebral cortex. *Cereb. Cortex* *8*, 108–116.
- Croft, B.G., Fortin, G.D., Corera, A.T., Edwards, R.H., Beaudet, A., Trudeau, L.E., and Fon, E.A. (2005). Normal biogenesis and cycling of empty synaptic vesicles in dopamine neurons of vesicular monoamine transporter 2 knockout mice. *Mol. Biol. Cell* *16*, 306–315.

Figure 8. FM5-95 Uptake Is Reversibly Reduced in GABA-Depleted Neurons

(A) Top: images of FM5-95 staining in (a) control neurons with unrestrained access to glutamine and (d) neurons maintained for 2 hr with 20 μM glutamine (see protocol in Figure S6). The bottom panels show (b and e) enlargements of the dashed boxes shown in (a) and (d), together with (c and f) the ICY binary masks for the detected FM5-95 spots. The scale bar represents 10 μm in (d) and 2 μm in (e).

(B) Cumulative frequency of FM5-95 fluorescence intensity in control neurons (black line, $1,251 \pm 64$ spots/image, nine images) and glutamine-depleted neurons (red line, 986 ± 15 spots/image, eight images, $p = 0.002$) for the experiment shown in (A). Inset: mean \pm SEM fluorescence intensity for control neurons (black, $n = 7$ experiments) and glutamine-depleted neurons (red, $n = 5$ experiments, $p = 0.005$, t test).

(C) Images of FM5-95 staining (a and d), EGFP (b and e), and overlay (c and f) following depletion induced by seven trains of 1,000 stimulations at 4 Hz (a, b, and c) and after 10 min glutamine application (d, e, and f) (same coverslip and intensity scale; see protocol in Figure S6).

(D) EGFP(+) varicosities express VIAAT: EGFP varicosities (a), VIAAT C-luminal antibody (b), overlay (c), and binary masks overlay (d) of ICY-detected VIAAT spots (blue) and EGFP spots (green). The plus signs indicate colocalized VIAAT and EGFP spots.

(E) Cumulative frequency of the fluorescence intensity detected at FM5-95 spots in transmitter-depleted neurons (red line, 717 ± 75 puncta/image, $n = 6$ experiments) and after glutamine application (blue line; 755 ± 83 puncta/image, $p = 0.69$). Inset: mean \pm SEM fluorescence intensity in transmitter-depleted neurons (red) and after application of glutamine (blue) for all puncta (circles, $n = 7$) and EGFP(+) puncta only (squares, $n = 7$). Paired t test.

- de Chaumont, F., Dallongeville, S., Chenouard, N., Hervé, N., Pop, S., Provoost, T., Meas-Yedid, V., Pankajakshan, P., Lecomte, T., Le Montagner, Y., et al. (2012). Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nat. Methods* 9, 690–696.
- Denker, A., and Rizzoli, S.O. (2010). Synaptic vesicle pools: an update. *Front. Synaptic Neurosci.* 2, 135.
- Edwards, R.H. (2007). The neurotransmitter cycle and quantal size. *Neuron* 55, 835–858.
- Engel, D., Pahner, I., Schulze, K., Frahm, C., Jarry, H., Ahnert-Hilger, G., and Draguhn, A. (2001). Plasticity of rat central inhibitory synapses through GABA metabolism. *J. Physiol.* 535, 473–482.
- Ertunc, M., Sara, Y., Chung, C., Atasoy, D., Virmani, T., and Kavalali, E.T. (2007). Fast synaptic vesicle reuse slows the rate of synaptic depression in the CA1 region of hippocampus. *J. Neurosci.* 27, 341–354.
- Fish, K.N., Sweet, R.A., and Lewis, D.A. (2011). Differential distribution of proteins regulating GABA synthesis and reuptake in axon boutons of subpopulations of cortical interneurons. *Cereb. Cortex* 21, 2450–2460.
- Frerking, M., Borges, S., and Wilson, M. (1995). Variation in GABA mini amplitude is the consequence of variation in transmitter concentration. *Neuron* 15, 885–895.
- Fricke, M.N., Jones-Davis, D.M., and Mathews, G.C. (2007). Glutamine uptake by System A transporters maintains neurotransmitter GABA synthesis and inhibitory synaptic transmission. *J. Neurochem.* 102, 1895–1904.
- Gomez, J., Hülsman, S., Ohno, K., Eulenburg, V., Szöke, K., Richter, D., and Betz, H. (2003). Inactivation of the glycine transporter 1 gene discloses vital role of glial glycine uptake in glycinergic inhibition. *Neuron* 40, 785–796.
- He, Y., Janssen, W.G., Rothstein, J.D., and Morrison, J.H. (2000). Differential synaptic localization of the glutamate transporter EAAC1 and glutamate receptor subunit GluR2 in the rat hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 418, 255–269.
- Hori, T., and Takahashi, T. (2012). Kinetics of synaptic vesicle refilling with neurotransmitter glutamate. *Neuron* 76, 511–517.
- Jensen, K., Chiu, C.S., Sokolova, I., Lester, H.A., and Mody, I. (2003). GABA transporter-1 (GAT1)-deficient mice: differential tonic activation of GABAA versus GABAB receptors in the hippocampus. *J. Neurophysiol.* 90, 2690–2701.
- Kaech, S., and Banker, G. (2006). Culturing hippocampal neurons. *Nat. Protoc.* 1, 2406–2415.
- Kam, K., and Nicoll, R. (2007). Excitatory synaptic transmission persists independently of the glutamate-glutamine cycle. *J. Neurosci.* 27, 9192–9200.
- Kavalali, E.T. (2006). Synaptic vesicle reuse and its implications. *Neuroscientist* 12, 57–66.
- Kim, S.H., and Ryan, T.A. (2010). CDK5 serves as a major control point in neurotransmitter release. *Neuron* 67, 797–809.
- Klausberger, T., Magill, P.J., Márton, L.F., Roberts, J.D., Cobden, P.M., Buzsáki, G., and Somogyi, P. (2003). Brain-state- and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons in vivo. *Nature* 421, 844–848.
- Kraushaar, U., and Jonas, P. (2000). Efficacy and stability of quantal GABA release at a hippocampal interneuron-principal neuron synapse. *J. Neurosci.* 20, 5594–5607.
- López-Bendito, G., Sturgess, K., Erdélyi, F., Szabó, G., Molnár, Z., and Paulsen, O. (2004). Preferential origin and layer destination of GAD65-GFP cortical interneurons. *Cereb. Cortex* 14, 1122–1133.
- Marra, V., Burden, J.J., Thorpe, J.R., Smith, I.T., Smith, S.L., Häusser, M., Branco, T., and Staras, K. (2012). A preferentially segregated recycling vesicle pool of limited size supports neurotransmission in native central synapses. *Neuron* 76, 579–589.
- Mathews, G.C., and Diamond, J.S. (2003). Neuronal glutamate uptake contributes to GABA synthesis and inhibitory synaptic strength. *J. Neurosci.* 23, 2040–2048.
- Neher, E. (2010). What is rate-limiting during sustained synaptic activity: vesicle supply or the availability of release sites. *Front. Synaptic Neurosci.* 2, 144.
- Obata, K., Hirono, M., Kume, N., Kawaguchi, Y., Itohar, S., and Yanagawa, Y. (2008). GABA and synaptic inhibition of mouse cerebellum lacking glutamate decarboxylase 67. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 370, 429–433.
- Olivo-Marin, J.-C. (2002). Extraction of spots in biological images using multi-scale products. *Pattern Recognit.* 35, 1989–1996.
- Parsons, R.L., Calupca, M.A., Merriam, L.A., and Prior, C. (1999). Empty synaptic vesicles recycle and undergo exocytosis at vesamicol-treated motor nerve terminals. *J. Neurophysiol.* 81, 2696–2700.
- Poulain, B., Baux, G., and Tauc, L. (1986). Presynaptic transmitter content controls the number of quanta released at a neuro-neuronal cholinergic synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 170–173.
- Riazanski, V., Deriy, L.V., Shevchenko, P.D., Le, B., Gomez, E.A., and Nelson, D.J. (2011). Presynaptic CLC-3 determines quantal size of inhibitory transmission in the hippocampus. *Nat. Neurosci.* 14, 487–494.
- Rizzoli, S.O., and Betz, W.J. (2005). Synaptic vesicle pools. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 57–69.
- Rizzoli, S.O., and Jahn, R. (2007). Kiss-and-run, collapse and ‘readily retrievable’ vesicles. *Traffic* 8, 1137–1144.
- Rothstein, J.D., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C.A., Bristol, L.A., Jin, L., Kuncl, R.W., Kanai, Y., Hediger, M.A., Wang, Y., Schielke, J.P., and Welty, D.F. (1996). Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16, 675–686.
- Rousseau, F., Aubrey, K.R., and Supplisson, S. (2008). The glycine transporter GlyT2 controls the dynamics of synaptic vesicle refilling in inhibitory spinal cord neurons. *J. Neurosci.* 28, 9755–9768.
- Sara, Y., Mozhayeva, M.G., Liu, X., and Kavalali, E.T. (2002). Fast vesicle recycling supports neurotransmission during sustained stimulation at hippocampal synapses. *J. Neurosci.* 22, 1608–1617.
- Sepkuty, J.P., Cohen, A.S., Eccles, C., Rafiq, A., Behar, K., Ganel, R., Coulter, D.A., and Rothstein, J.D. (2002). A neuronal glutamate transporter contributes to neurotransmitter GABA synthesis and epilepsy. *J. Neurosci.* 22, 6372–6379.
- Solbu, T.T., Björkmo, M., Berghuis, P., Harkany, T., and Chaudhry, F.A. (2010). SAT1, a glutamine transporter, is preferentially expressed in GABAergic neurons. *Front. Neuroanat* 4, 1.
- Südhof, T.C. (2004). The synaptic vesicle cycle. *Annu. Rev. Neurosci.* 27, 509–547.
- Tabares, L., Alés, E., Lindau, M., and Alvarez de Toledo, G. (2001). Exocytosis of catecholamine (CA)-containing and CA-free granules in chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* 276, 39974–39979.
- Tian, N., Petersen, C., Kash, S., Baekkeskov, S., Copenhagen, D., and Nicoll, R. (1999). The role of the synthetic enzyme GAD65 in the control of neuronal gamma-aminobutyric acid release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 12911–12916.
- Tricoire, L., Pelkey, K.A., Erkkila, B.E., Jeffries, B.W., Yuan, X., and McBain, C.J. (2011). A blueprint for the spatiotemporal origins of mouse hippocampal interneuron diversity. *J. Neurosci.* 31, 10948–10970.
- Walls, A.B., Eyjolfsson, E.M., Smeland, O.B., Nilsen, L.H., Schousboe, I., Schousboe, A., Sonnewald, U., and Waagepetersen, H.S. (2011). Knockout of GAD65 has major impact on synaptic GABA synthesized from astrocyte-derived glutamine. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 31, 494–503.
- Wojcik, S.M., Rhee, J.S., Herzog, E., Sigler, A., Jahn, R., Takamori, S., Brose, N., and Rosenmund, C. (2004). An essential role for vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) in postnatal development and control of quantal size. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 7158–7163.
- Wojcik, S.M., Katsurabayashi, S., Guillemin, I., Friauf, E., Rosenmund, C., Brose, N., and Rhee, J.S. (2006). A shared vesicular carrier allows synaptic corelease of GABA and glycine. *Neuron* 50, 575–587.
- Zhou, Q., Petersen, C.C., and Nicoll, R.A. (2000). Effects of reduced vesicular filling on synaptic transmission in rat hippocampal neurones. *J. Physiol.* 525, 195–206.
- Zucker, R.S., and Regehr, W.G. (2002). Short-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Physiol.* 64, 355–405.

Neuron, Volume 80

Supplemental Information

Cytosolic Transmitter Concentration Regulates

Vesicle Cycling at Hippocampal GABAergic Terminals

Lu Wang, Peng Tu, Laurine Bonet, Karin R. Aubrey, and Stéphane Supplisson

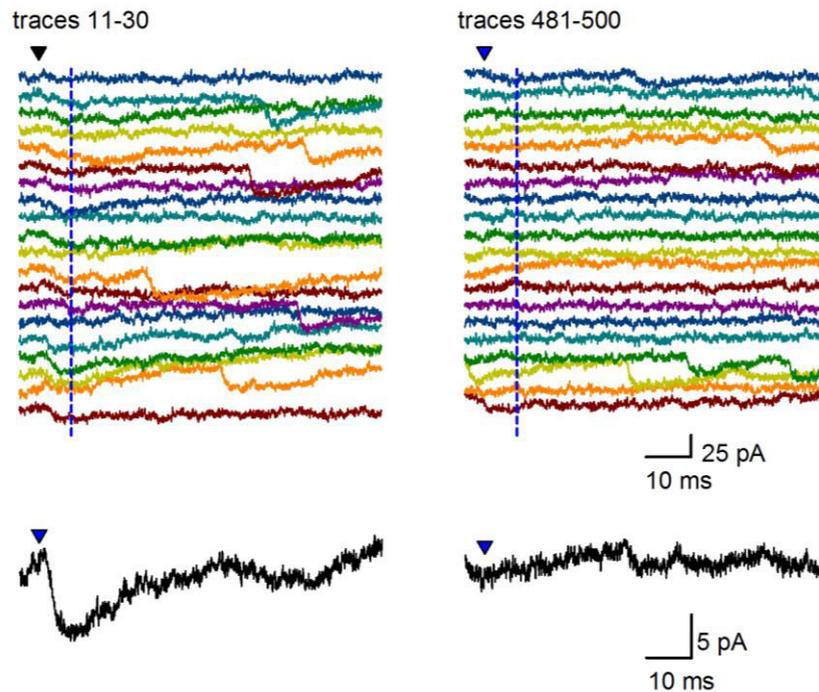


Figure S1: Absence of evoked release at the end of a 4 Hz train in a GABA-depleted neuron, related to Figures 2A and 2Cg

Individual (top panel) and average (bottom panel) current traces during the seventh train of stimulation in Figure 2A, recorded at onset (left, 20 sweeps) and at the end (right, 20 sweeps) of the train. Each sweep represents 80 ms of recording with AP triggered at 11 ms (blue triangle). A small evoked current is present in a majority of traces at onset, as shown with the average inward current after the AP. The vertical dashed blue line represents the time of the peak amplitude taken from the average. In contrast, there is no evoked response by the end of the train.

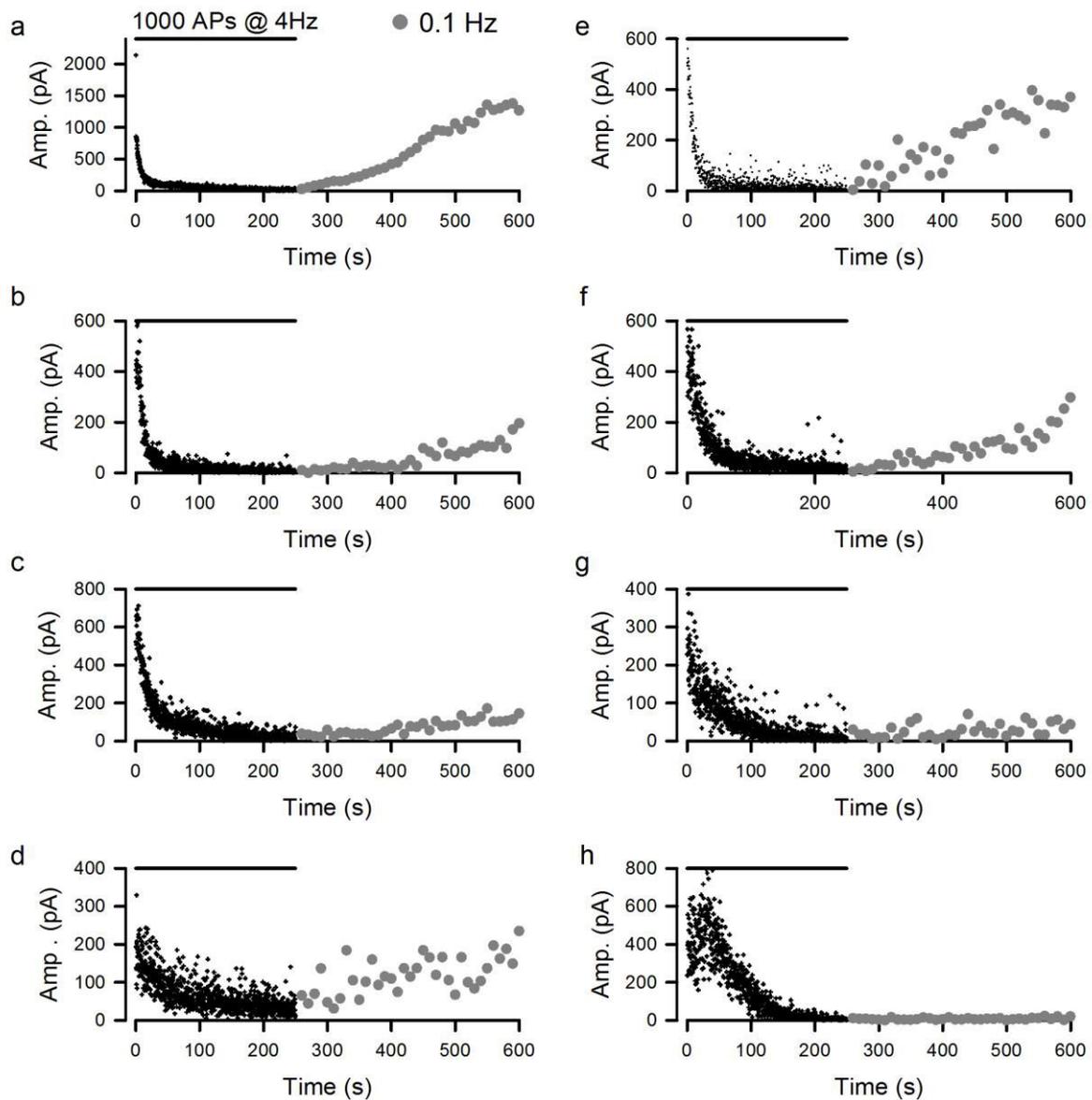


Figure S2: Slow and partial restoration in IPSC amplitude in a GABA depleted neuron – related to Figure 2

Panels a to h represent the amplitude of the IPSC of the last 4 Hz train of 1000 APs for eight representative pairs that achieved GABA depletion, defined by >90% reduction of the steady IPSC amplitude. The amplitude of IPSCs evoked at 0.1 Hz (gray circle) can rise slowly, suggesting small increase in basal GABA concentration can support the filling of releasable vesicles.

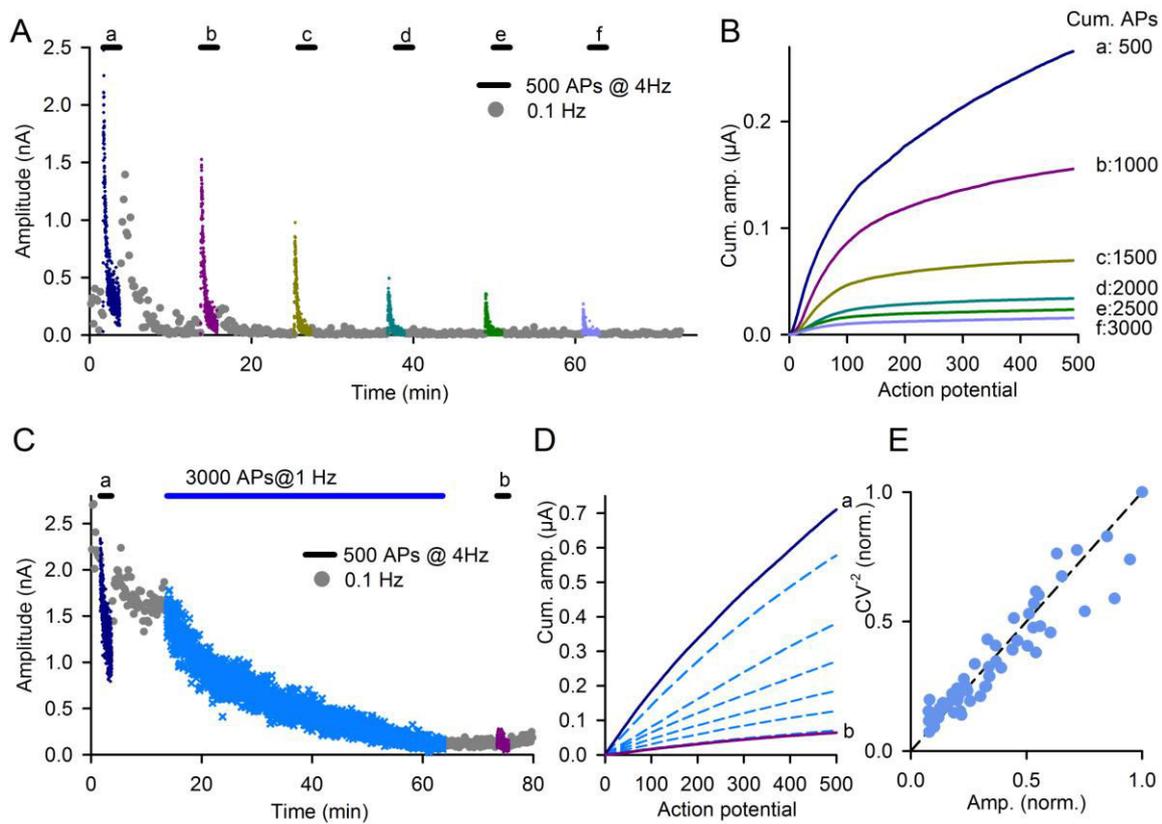


Figure S3: Rundown for a pair with large facilitation or evoked by constant stimulation at 1 Hz, related to Figure 2

(A) 4-Hz trains (bars a to f; crosses with different colors) induced 97.1% rundown for a pair with large facilitation followed by depression. (B) Cumulative amplitude for the trains (a to d) shown in A. The cumulative AP numbers after each train are indicated (APs at 0.1 Hz are not included). (C) Rundown of IPSC amplitude induced by continuous stimulation (3000 APs at 1 Hz; light blue crosses; from 1495 ± 44 pA (IPSCs: 2-11) to 115 ± 11 pA (IPSCs: 2982-2991; $P < 0.001$)). Two 4 Hz trains (solid bars: 500 APs) were triggered before (a, blue crosses) and after (b, pink crosses) the 1 Hz stimulation. (D) Cumulative amplitude for the 4 Hz (solid line) and 1-Hz (blue dashed lines) stimulations for the cell shown in C. For comparison, the continuous 3000 APs triggered at 1 Hz were divided into 6 episodes of 500 APs with the cumulative amplitude reset to 0 for each episode. (E) Relationship between normalized CV^2 and mean amplitude (blue circle: group of 50 IPSCs) during the 1 Hz stimulation shown in C. The dashed line is the unity slope.

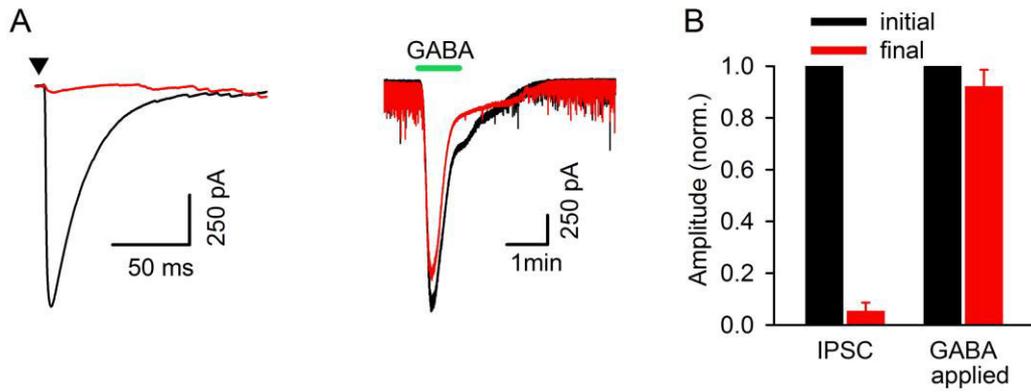


Figure S4: Stable expression of GABA_A receptor during the rundown, related to Figure 2

(A) Traces of currents evoked by action potentials (solid triangle, left panel) and by bath application of 10 μ M GABA (right panel) recorded before (black line) and after (red line) activity-induced rundown. (B) Amplitudes \pm SEM evoked by GABA application and by APs after rundown (red bar; $n = 3$), normalized to the initial value (black bar).

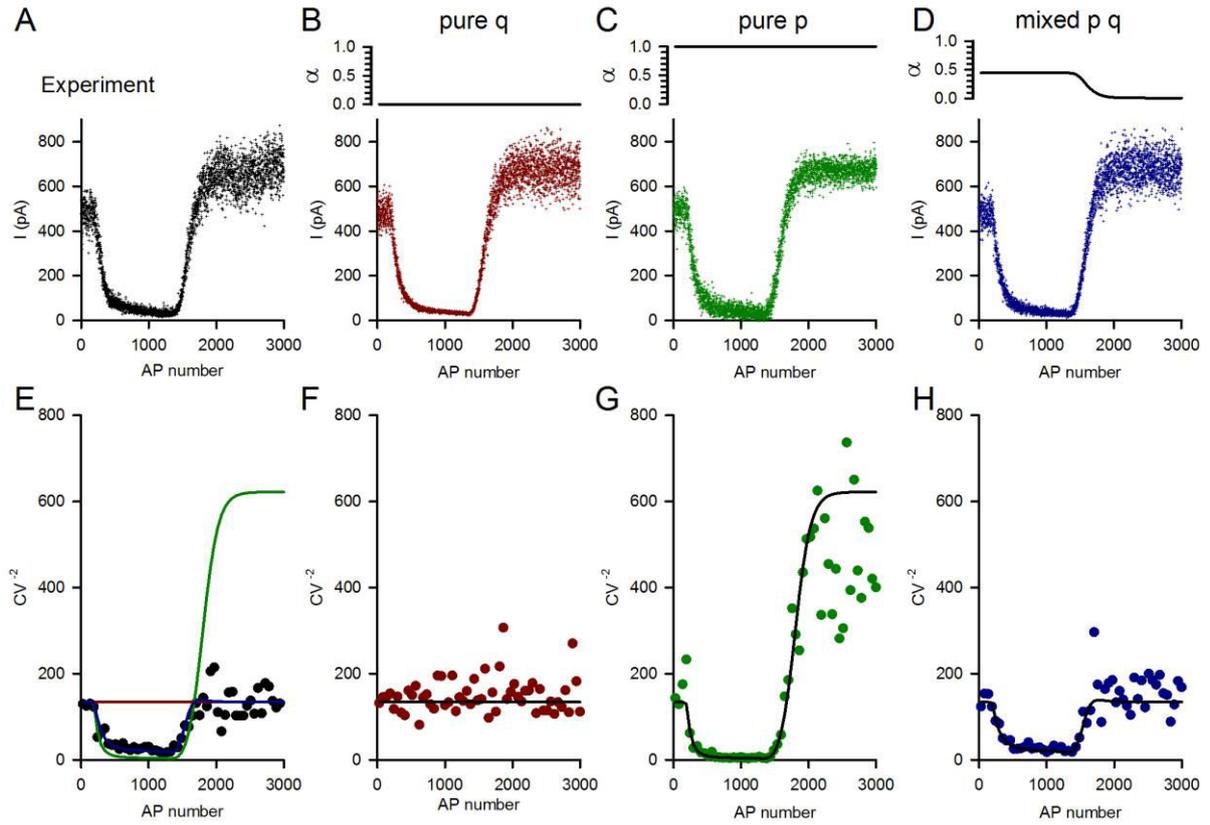


Figure S5: Monte Carlo simulations for changes in amplitude and CV^2 , related to Figures 5E and 5F.

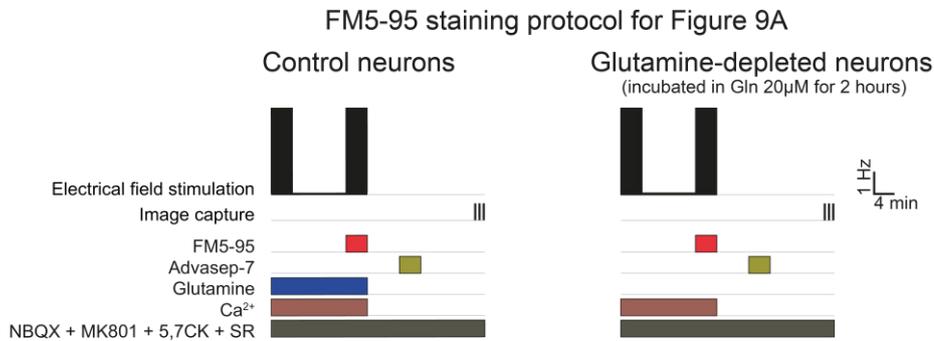
(A) Depression in IPSC amplitude during prolonged stimulation at 4 Hz and after restoration by glutamine (same as Figure 5E but plotted as function of AP number). The relative change (x) in mean amplitude was used as template for the Monte Carlo simulation.

(B-D) Monte Carlo simulations using a binomial model and the relative change in A. The parameters were optimized with $n = 80$ release sites, $p = 0.62 \pm 0.12$ and $q = 9.52 \pm 1.9$ pA with intrasite variability $CV = 0.2$. The change in amplitude was attributed only in q (B) or only in p (C) or for mixed change (D) with x^α the proportion for p and $x^{(1-\alpha)}$ the proportion for q (Kraushaar and Jonas, 2000). Top panels: fraction of p change (α). The best fit of CV^2 corresponds to a mixed change during the depression and a pure change in q for the late potentiation induced by glutamine.

(E) Change in CV^2 as function of AP number were calculated for groups of 54 IPSCs (circle) with segmented variance (average variance of groups of 3 IPSCs with no overlap). The solid lines are the predicted CV^2 for a simple binomial model with pure change in q (red line), pure change in p (green line) and mixed change (blue line) as shown in panels F-H.

(F-H) CV^2 calculated from each simulation for group of 54 IPSCs (circle).

A



B

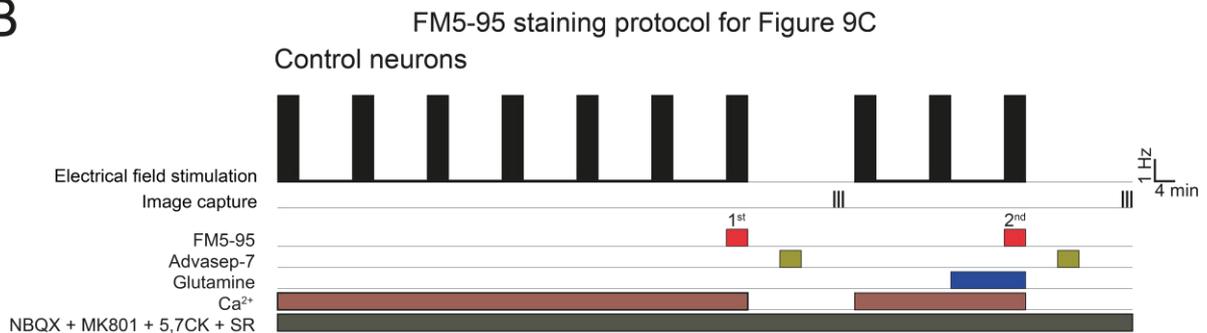


Figure S6: Schematic of FM5-95 staining protocols, related to Figure 8.

(A) Experimental protocols used for the experiments shown in Figure 8A. FM5-95 (5 μ M) was applied during the second 4 Hz train of 1000 pulses with control neurons (left) or with neurons pre-incubated for two-hours in a low-glutamine (right, 20 μ M) containing media. The stimulation was set at 0.1 Hz between trains.

(B) Experimental protocols used for the experiments shown in Figure 8C. FM5-95 (5 μ M) was applied twice, to examine recycling activity after depletion and application of glutamine (2 mM). The first FM5-95 application was carried out during the last of seven trains (1000 pulses at 4 Hz) performed in absence of glutamine with control neurons, a depletion protocol similar to those used in pair recording. After image capture, the same cover slip was stimulated with the same electrical field stimulation protocol and glutamine was applied for ten minutes (one to three trains were applied with similar results). The second FM5-95 application took place during the last train.

2) Supplemental Experimental Procedures

Primary neuron cultures

Briefly, the hippocampi were dissected out from transgenic newborn P0 mice killed by decapitation and incubated for 15 min at 37° C with Papain (20 U/ml) in Hank's balanced salt solution supplemented with D-glucose (0.6 % wt/vol), and buffered with 20 mM HEPES at pH 7.3. Cells were subsequently dissociated by gentle trituration and then plated at a density of 5×10^4 cells/cm². Neurons were maintained for up to 3 weeks at 37°C in 5% CO₂ in serum-free Neurobasal medium (Neurobasal supplemented with B-27, 2 mM L-glutamine, and 5 UI-5 µg/ml Penicillin-Streptomycin). Half of the medium was changed every 2-3 days.

Electrophysiology

Action potentials in the presynaptic neuron were triggered at 0.1 Hz or 4 Hz by 5 ms injection of depolarizing current (300 - 800 pA). IPSCs were recorded at a holding potential of -70 mV, with AMPA and NMDA receptors blocked by 2 µM NBQX and 5 µM (+)-MK801. In the presence of extracellular glutamate, higher concentrations were applied (50 µM NBQX and 10 µM MK801) together with metabotropic glutamate receptor inhibitors (1 µM JNJ 16259685, 2 µM MTEP, 2 µM LY-341,495 and 20 µM CPPG). When required, IPSCs were blocked by 20 µM SR95531 and higher concentration (100 µM) was used when GABA was added to the external solution. Neuronal GABA transporters (GAT1) were inhibited with 20 µM SKF 89976A. Glutamate transporters were blocked with 4 µM TFB-TBOA in the presence of 20 µM glutamate.

Résultats III

Régulation de l'approvisionnement en
GABA en fonction de l'activité

III.1. Les besoins en GABA augmentent pendant une période d'activité prolongée

Nous avons montré que dans nos conditions d'enregistrement électrophysiologique (i.e. avec une solution contenant uniquement du D-glucose comme source de carbone), les neurones GABAergiques ne peuvent pas maintenir très longtemps une libération vésiculaire sans avoir accès à une source extracellulaire de GABA ou de glutamate/glutamine. Cet effondrement de la transmission induit par l'épuisement du stock neuronal de GABA suggère que sa libération durant chaque évènement d'exocytose doit être compensée pour maintenir la capacité de VIAAT à remplir les vésicules recyclées en GABA. Nous avons montré que cet approvisionnement extracellulaire est réalisé par les trois transporteurs pour le GABA, le glutamate et la glutamine. Une régulation de trafic membranaire des transporteurs pourrait constituer un mécanisme simple et efficace pour ajuster l'influx au besoin instantané en neurotransmetteurs, besoin qui varie considérablement en fonction de la fréquence de décharge imposée par le neurone et du régime d'activité du réseau.

Pour estimer la surconsommation de GABA qu'entraîne un train prolongé à 4 Hz par rapport à la fréquence basale de stimulation à 0,1 Hz (i.e. en prenant en compte les plasticités à court terme), nous avons représenté pour chaque paire l'amplitude cumulée pendant le premier train à 4 Hz en fonction de l'amplitude initiale au début du train (i.e. $\langle \text{IPSC}_{2..40} \rangle$, moyenne des IPSC_2 à IPSC_{40} , Figure 9A). La pente de la relation linéaire (0,5 ; les IPSCs cumulés et $\langle \text{IPSC}_{2..40} \rangle$ sont exprimés en μA et nA, respectivement) montre qu'un train de 1000 PAs à 4 Hz est équivalent à 500 fois l'amplitude initiale. En divisant l'amplitude cumulée pendant le train par l'amplitude cumulée attendue pour une stimulation à 0,1 Hz pendant la même durée (Figure 9B), on obtient un index de la surconsommation de GABA pendant toute la durée du train pour chaque paire. La médiane de cet index est de 18,2 pour le protocole standard de 1000 PAs à 4 Hz. Nous avons cherché comment les captures extracellulaires du GABA et de ses précurseurs étaient régulées par l'activité neuronale pour adapter l'approvisionnement des synapses en GABA et faire face à une telle variation « instantanée » de demande métabolique en neurotransmetteurs.

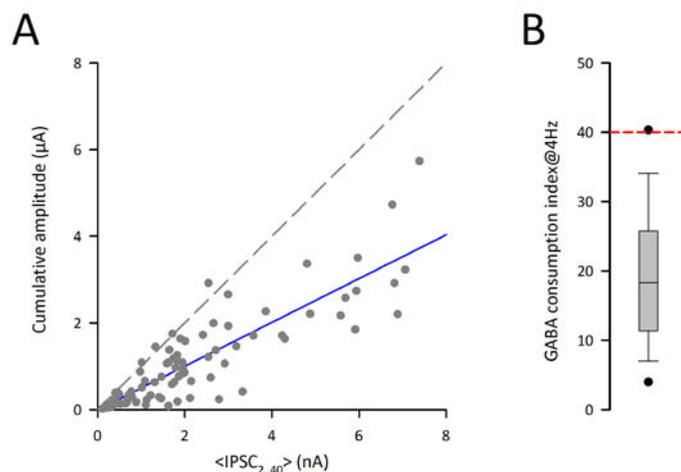


Figure 9. L'activité répétée pendant un train à 4 Hz induit une surconsommation de GABA

A) Représentation linéaire de l'amplitude cumulée des IPSCs en fonction de l'amplitude moyenne au début du train (moyenne entre $IPSC_{2..40}$). La droite de régression (bleue) a une pente de 0,5 ($r^2 = 0,74$, $n = 84$). La ligne en pointillée représente la pente unité.

B) Diagramme en boîte du rapport entre l'amplitude cumulée pendant le premier train de 1000 PAs à 4 Hz et l'amplitude cumulée à 0,1Hz pour la même période de temps (calculée en multipliant 25 fois l'amplitude moyenne des 20 premiers IPSCs à 0,1Hz). La ligne pointillée rouge représente la surconsommation en absence de plasticité, proportionnelle au rapport des fréquences.

III.2. Régulation de la capture de GABA par l'activité

III.2.1. La restauration du GABA cytosolique par GAT1 dépasse le stock initial

Nous commençons notre étude par GAT1, la capture extracellulaire de GABA étant la voie la plus directe pour rétablir le stock cytosolique de GABA dans les neurones déplétés (Wang et al 2013). Pour isoler la contribution de GAT1, les neurones doivent être préalablement épuisés de leur contenu en neurotransmetteurs par des stimulations répétées à 4 Hz. L'état déplété peut être difficile à établir avec des critères précis, mais une évidence de déplétion cytosolique du GABA se traduit généralement par un effondrement de l'amplitude stationnaire à 4 Hz associé à une quasi absence de récupération lorsque la stimulation est arrêtée (Figure 10A), produisant un plateau dans la représentation de l'amplitude cumulée, indiqué par une ligne pointillée (Figure 10B). La déplétion du stock de neurotransmetteurs est confirmée par la restauration de la transmission comme le montre la figure 10 pour une application de GABA (100 μ M), qui est observée seulement après lavage du SR95531 (100 μ M), qui doit être co-appliqué afin d'empêcher une trop forte activation tonique des récepteurs GABA_A (Figures 10A-B). Dans l'expérience de la figure 10, la capture de GABA potentialise l'amplitude des IPSCs en comparaison aux valeurs initiales (+26 % à 0,1Hz (2,54 vs 3,21 nA) ; +30% pour la moyenne des 40 premiers IPSCs à 4Hz ($\langle IPSC_{2..40} \rangle$: 1,41 vs 1,83 nA) ; +146 % pour le courant stationnaire ($\langle IPSC_{800..1000} \rangle$: 241 vs 594 pA) et +245% pour le courant cumulé pendant le premier train (290 vs 1000nA)). Cette potentialisation suggère que la concentration de GABA et sa disponibilité pour le recyclage seraient plus élevées après 4 minutes d'activité de GAT1 que dans les conditions initiales, issues des conditions de culture avec du glutamax, comme précurseur de la glutamine. Au final, l'amplitude cumulée au cours de la déplétion post restauration (2,09 μ A) excède de 37% la déplétion initiale (1,53 μ A). En moyenne, une application de GABA à 100 μ M potentialise l'amplitude cumulée des IPSCs du train suivant directement l'application par rapport au premier train (2128 ± 525 nA vs 1264 ± 279 nA, $n = 5$ paires, $p = 0.034$ paired t-test, Figure 12).

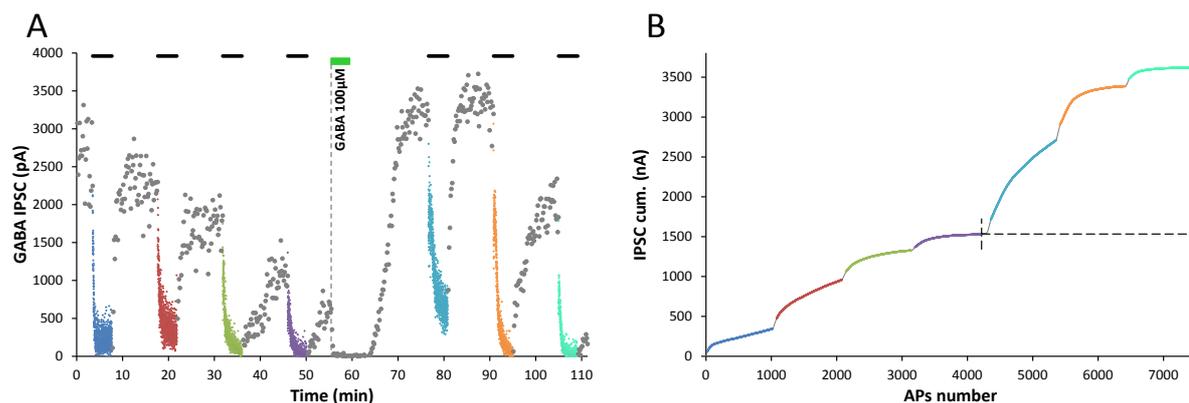


Figure 10. GAT1 restaure le stock cytosolique de GABA et potentialise la transmission

A) Amplitude des IPSCs évoqués à 0,1 Hz (*points gris*) et pendant des trains de stimulation (*barres noires* : 1000 PAs à 4 Hz, *croix de couleur différente* pour chaque train). Le GABA (100 μ M, *barre verte*) est appliqué en présence de SR95531 (100 μ M) pendant 4 minutes (le neurone est stimulé à 0,1 Hz pendant l'application).

B) Amplitude cumulée des IPSCs de l'expérience représentée en A en fonction du nombre de potentiels d'action. La ligne pointillée montre l'amplitude cumulée maximale de la déplétion initiale, avant l'application de GABA.

Une application prolongée de GABA à une concentration saturante pour GAT1 nécessite de bloquer les récepteurs GABA_A avec une concentration sursaturante de SR95531 (100 μ M) impliquant un lavage très lent (4 minutes pour l'expérience de la figure 10), période pendant laquelle l'amplitude des IPSCs ne peut pas être mesurée. Nous avons considérablement réduit cette période aveugle en utilisant une chambre de perfusion avec un faible volume mort (87 μ l, Harvard Apparatus) et en divisant par 10 la concentration de GABA (10 μ M) et par 20 celle du SR95531 (5 μ M) permettant des temps de lavage rapides (Figure 11).

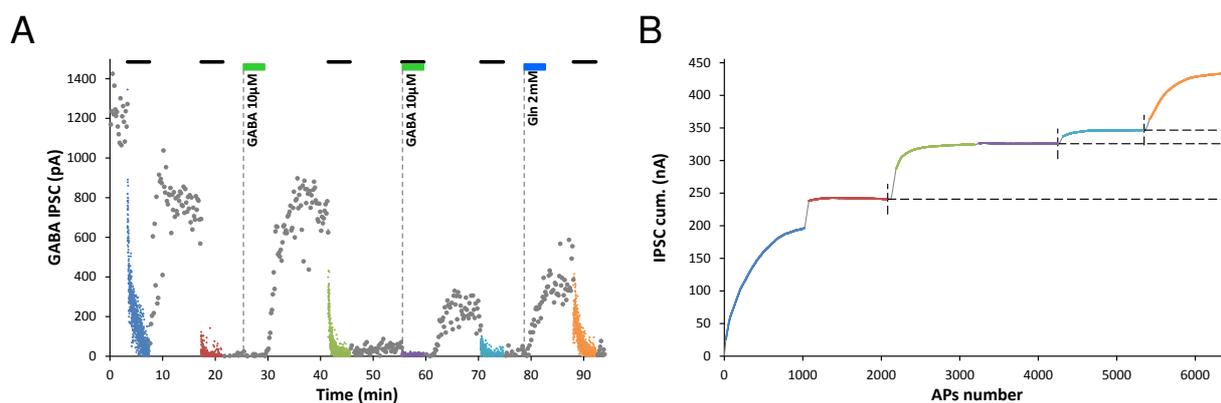


Figure 11. Une application de GABA à 10 μ M restaure partiellement les stocks cytosoliques

A) Amplitude des IPSCs évoqués à 0,1 Hz (*points gris*) et pendant des trains de stimulation (*barres noires* : 1000 PAs à 4 Hz, *croix de couleur différente* pour chaque train). Le GABA (10 μ M, *barre verte*) est appliqué deux fois après déplétion des stocks cytosoliques, pendant 4 minutes (le neurone est stimulé à 0,1 Hz pendant la première application et 4 Hz pendant la deuxième) en présence de SR95531 (5 μ M). Une troisième et dernière restauration est réalisée avec la glutamine (2 mM @ 0,1Hz, *barre bleue*).

B) Amplitude cumulée des IPSCs en fonction du nombre de potentiels d'action pour l'expérience représentée en A (même code couleur pour les trains). Les lignes pointillées montrent l'amplitude cumulée maximale atteinte pour la déplétion initiale et après chaque restauration.

La figure 11 montre qu'une application de GABA à 10 μM dans les conditions contrôles restaure 61,6% (745,7 pA vs 1211,4 pA) de l'amplitude des IPSCs évoqués à 0,1 Hz et 42% de l'amplitude de $\langle \text{IPSC}_{2..40} \rangle$ (285,4 pA vs 676,7 pA). En revanche, le remplissage des vésicules recyclées pendant le train n'est pas restauré ($\langle \text{IPSC}_{800..1000} \rangle$ représente 3,8% de la valeur initiale (1,54 pA vs 40,03 pA) et l'amplitude cumulée 24% du train initial (41 nA vs 172 nA). La deuxième application de GABA est synchronisée avec un train à 4 Hz (même concentration, même durée d'application, Figure 11) ce qui paradoxalement produit une restauration beaucoup plus faible : seulement 18,5% de l'amplitude à 0,1 Hz (224,4 pA vs 1211,4 pA) et 7 % de l'amplitude cumulée (12,2 nA vs 172 nA). Pour contrôler si d'autres facteurs que le GABA limitent la restauration, une application de glutamine (2 mM) est effectuée. Cette application restaure 32% de l'amplitude à 0,1Hz (381,2 pA vs 1211,4 pA) et 42% du cumulé initial (72,1 nA vs 172 nA), validant la moindre restauration lorsque le GABA est capturé pendant un train de stimulation.

En moyenne, une application de GABA à 100 μM augmente (+69%) l'amplitude cumulée des IPSCs du train suivant l'application ($2,13 \pm 0,5 \mu\text{A}$) par rapport au premier train ($1,26 \pm 0,28 \mu\text{A}$, $n = 5$ paires, $p = 0.034$ paired t-test, Figure 12). En revanche, une application de 10 μM GABA pendant 4 minutes permet seulement une restauration partielle (15,2%) de l'amplitude cumulée ($0,35 \pm 0,09 \mu\text{A}$) par rapport au premier train ($2,28 \pm 0,49 \mu\text{A}$, $n = 10$ paires, $p = 0.002$ paired t-test, Figure 12).

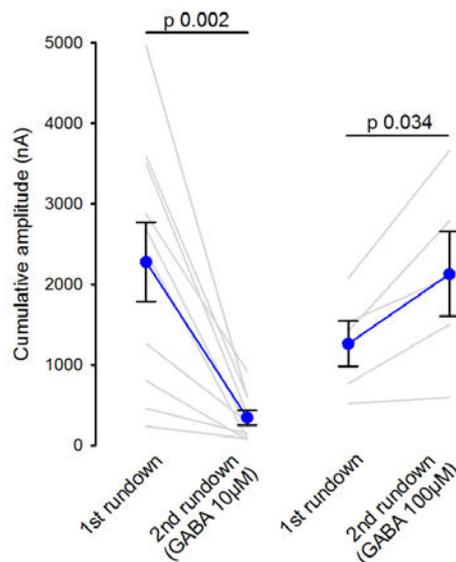


Figure 12. Restauration partielle ou potentialisation de l'amplitude cumulée après capture de GABA
Amplitude cumulée des IPSCs pendant le premier et le deuxième « rundown », après 4 minutes d'application du GABA à 10 μM (gauche, $n = 10$ paires) et 100 μM (droite, $n = 5$ paires). Les moyennes sont en bleues ($\pm\text{SEM}$), paired t-test.

III.2.2. L'activité réduit la capture de GABA à faible concentration

La baisse de l'amplitude cumulée après la deuxième application dans l'expérience précédente (Figure 11) suggère une capture plus faible du GABA lorsque celui-ci est appliqué pendant un train d'activité à 4 Hz. Toutefois la présence de SR95531 (5 μM) pendant l'application empêche de prendre en compte la partie de la restauration qui intervient pendant la stimulation à 4 Hz, ce qui pourrait contribuer au déficit apparent de l'amplitude cumulée. Nous avons donc répété cette expérience avec une concentration plus faible de GABA de 2-3 μM qui ne nécessite pas la présence continue de SR95331, le courant tonique à 2 et 3 μM GABA ayant une amplitude moyenne de 72 ± 24 pA ($n = 3$) et 137 ± 13 pA ($n = 3$). De plus, une concentration extracellulaire de 2-3 μM nous rapproche de la concentration extracellulaire de GABA dans les conditions physiologiques (Bright et al 2011, Bright & Smart 2013, Kuntz et al 2004).

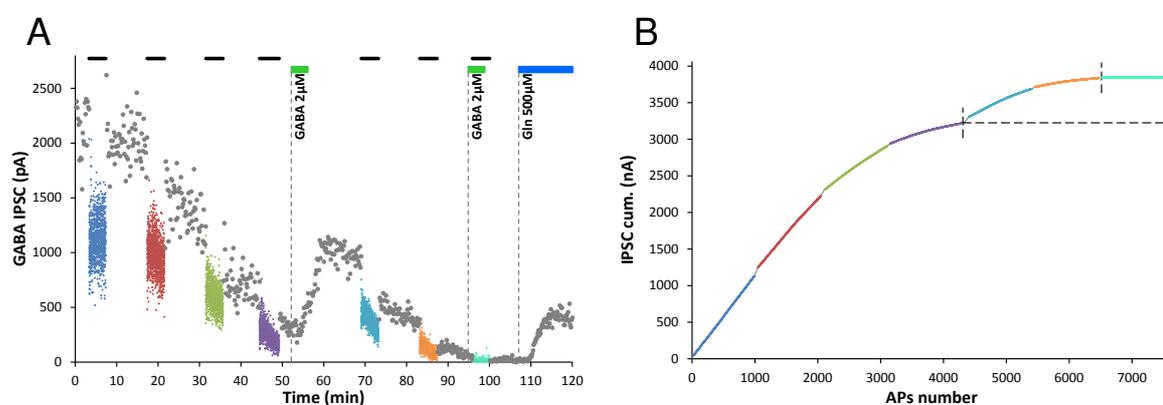


Figure 13. Une application de GABA 2 μM pendant un train à 4 Hz ne restaure pas la transmission

A) Amplitude des IPSCs évoqués à 0,1 Hz (*cercles gris*) et pendant des trains de stimulation (*barres noires* : 1000 PAs à 4 Hz, *croix de couleur différente* pour chaque train). Le GABA (2 μM , *barre verte*) est appliqué deux fois après déplétion du stock cytosolique, pendant 4 minutes (le neurone est stimulé à 0,1 Hz pendant la première application et à 4 Hz pendant la deuxième). Une dernière restauration est réalisée avec la glutamine (500 μM @ 0,1 Hz, *barre bleue*).

B) Amplitude cumulée des IPSCs en fonction du nombre de potentiels d'action pour l'expérience représentée en A (même code couleur pour les trains). La ligne pointillée horizontale marque l'amplitude cumulée maximale atteinte pour la déplétion initiale.

Dans l'expérience de la figure 13, une première application de GABA (2 μM , 4 min à 0,1 Hz) restaure 48,6% de l'amplitude initiale et 19% de l'amplitude cumulée maximale (615 nA vs 3225 nA). Après une seconde déplétion, le GABA est appliqué (même concentration, même durée) pendant un train à 4 Hz. Aucune restauration significative n'est détectée (~1 % de l'amplitude initiale et 1,6% de l'amplitude de la première restauration réalisée à 0,1 Hz (10 nA vs 615 nA) (Figure 14AB). Une application finale de glutamine (500 μM) vérifie que la transmission peut être restaurée (19,2 % de l'amplitude initiale).

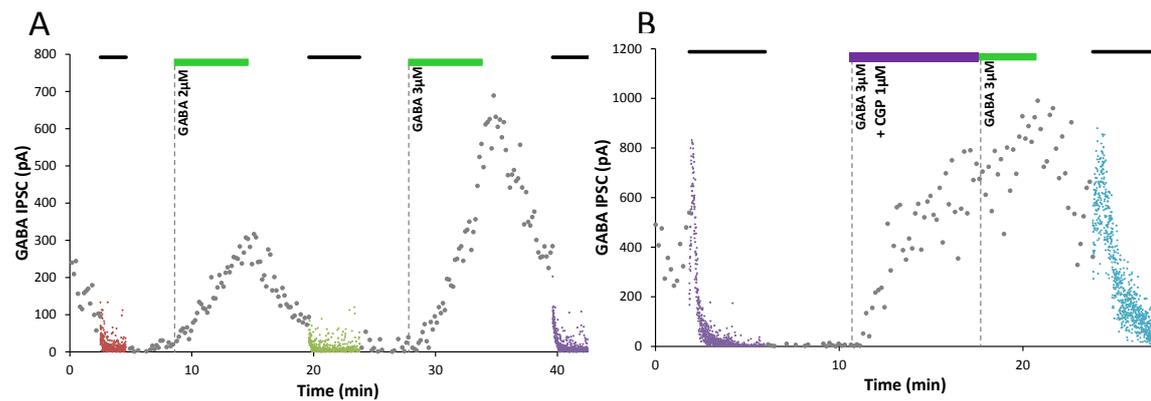


Figure 14. La cinétique de restauration dépend de la concentration et n'est pas sensible à un inhibiteur des récepteurs GABA_B

A) Amplitude des IPSCs évoqués à 0,1 Hz (*points gris*) et à 4 Hz (*croix de couleur*). Le GABA (2 μ M puis 3 μ M, *barres vertes*) est appliqué pendant 6 minutes à 0,1 Hz. Les dix premières minutes et le premier train à 4 Hz ne sont pas montrés pour simplifier.

B) Evolution au cours du temps de l'amplitude absolue des IPSCs évoqués en continu à 0,1 Hz (*points gris*) et à 4 Hz (*croix de couleur*). Le GABA 3 μ M + CGP55845 1 μ M (antagoniste des récepteurs GABA_B) (*barre violette*) sont appliqués à l'extérieur pendant 7 minutes à 0,1 Hz. Le GABA (3 μ M, *barre verte*) est appliqué pendant 3 minutes à 0,1 Hz.

Pour vérifier si la concentration cytosolique de GABA produit par une capture extracellulaire à 2 μ M est le facteur limitant pour le remplissage vésiculaire par VIAAT, nous avons comparé les restaurations après une application de 2 et 3 μ M pendant 6 minutes (à 0.1 Hz). La figure 14A montre une potentialisation de la restauration lorsque de la concentration est augmentée (+114% après 6 minutes, 611 pA à 3 μ M vs 285 pA à 2 μ M), confirmant un couplage entre l'influx de GABA par GAT1 et son accumulation vésiculaire par VIAAT.

Nous avons vérifié qu'une application de CGP55845, un antagoniste des récepteurs GABA_B, n'altère pas la cinétique de restauration à 3 μ M (Figure 14B), en accord avec les résultats obtenus à de plus fortes concentrations de GABA (Wang et al 2013).

III.2.3. L'inhibition de la restauration est dépendante du calcium

Un train de potentiel d'action à haute fréquence peut altérer le transport de GABA en dépolarisant le potentiel de membrane « moyen » ou en augmentant la concentration intracellulaire de Na⁺ puisque GAT1 est un transporteur électrogénique, couplé au Na⁺. Alternativement l'inhibition apparente de GAT1 à 4 Hz peut dépendre du Ca²⁺, simplement à cause de la consommation de GABA pendant le train qui est masquée lorsque SR95531 est présent. Elle pourrait aussi résulter d'une régulation du trafic membranaire de GAT1, de son interaction avec la syntaxine ou d'un autre mécanisme dépendant de la signalisation Ca²⁺ (ex : phosphorylation par la PKC). Nous avons donc comparé les restaurations à 4 Hz après des applications de GABA (10 μ M) réalisées en 2 mM ou 0,5 mM Ca²⁺. La figure 15A montre que l'amplitude cumulée est 3,3 fois plus grande pendant un train en 0,5 mM Ca²⁺ qu'en 2 mM Ca²⁺ (Figure 15B), indiquant que la réduction observée est dépendante du Ca²⁺.

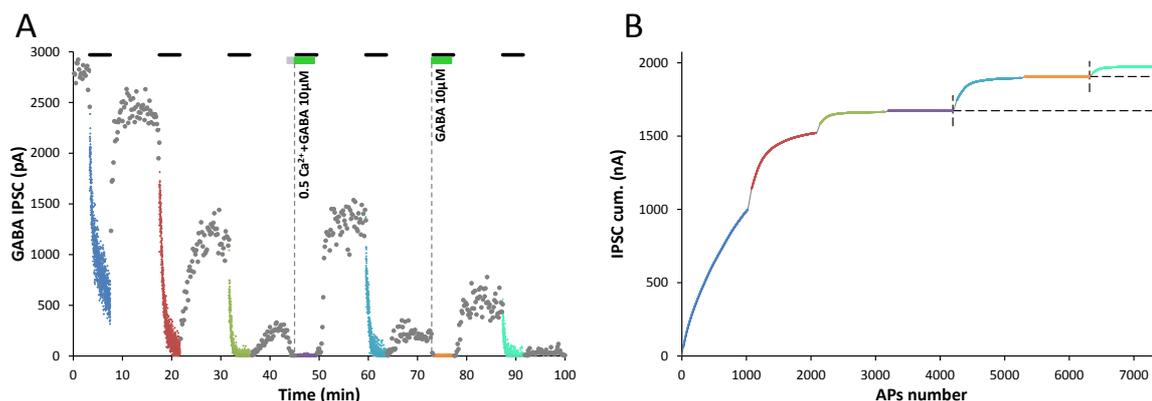


Figure 15. La régulation de la capture de GABA pendant l'activité est dépendante du calcium
A) Amplitude des IPSCs évoqués à 0,1 Hz (*points gris*) et à 4 Hz (*croix de couleur*). Le GABA (10 μ M+ SR95531 5 μ M, *barres vertes*) est appliqué deux fois pendant 4 minutes à 4 Hz. La concentration de calcium est abaissée à 0,5 mM deux minutes avant (*barre grise*) et pendant la première application de GABA ; elle est à la valeur normale (2 mM) lors de la deuxième application.
B) Amplitude cumulée des IPSCs en fonction du nombre de potentiels d'action pour l'expérience représentée en A (même code couleur pour les trains). Les lignes pointillées horizontales marquent les amplitudes cumulées maximales atteintes pour la déplétion initiale et la première restauration.

En moyenne, l'amplitude cumulée des IPSCs à la suite d'une restauration à 4 Hz en 2 mM Ca^{2+} est $0,6 \pm 0,16$ fois celle à 0,1 Hz ($n = 15$ paires, toutes les concentrations de GABA (2, 10, 100 μ M) ont été incluses, paired t-test $p = 0.003$, norm. Wilcoxon signed rank test $p = 0.008$, Figure 16A), suggérant une capture plus faible de GABA pendant l'activité ou que le déficit de cumulé provient de sa consommation pendant le train, masquée par la présence de SR95531. Cet effet est dépendant du calcium car les restaurations ($[GABA]_o = 10 \mu$ M, 4 Hz) réalisées avec $[Ca^{2+}] = 0,5$ mM (uniquement pendant l'application de GABA) sont potentialisées par un facteur $2,6 \pm 0,4$ ($n = 4$ paires, paired t-test $p = 0.148$, norm. Wilcoxon signed rank test, $p = 0.029$, Figure 16B). Dans deux expériences de restauration réalisées en 0,5 mM Ca^{2+} , on observe néanmoins une dépression lorsque le GABA (10 μ M + SR95531 5 μ M) est appliqué pendant un train à 4 Hz (0,76, $n = 2$ paires, Figure 16C).

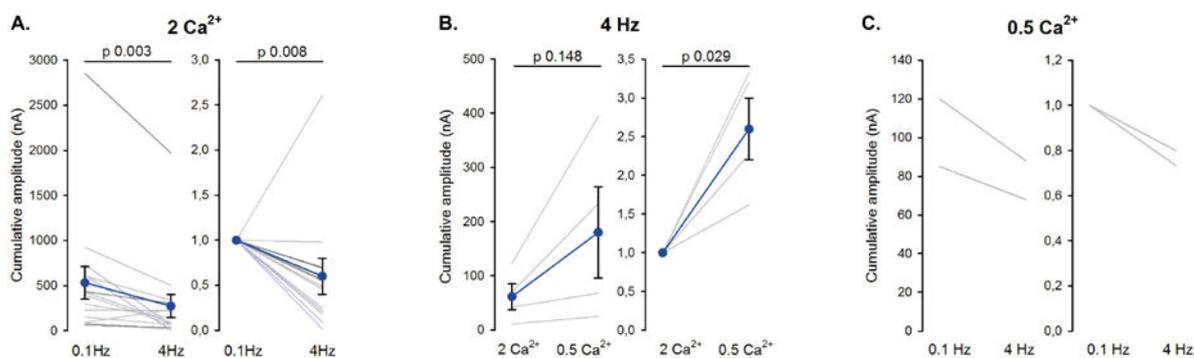


Figure 16. Résumé des effets du Ca^{2+} et de l'activité sur la restauration du GABA cytosolique par GAT1
A) Graphique montrant l'amplitude cumulée des IPSCs pendant la restauration suite à une application de GABA (2, 10 ou 100 μ M) à 0,1 Hz en condition standard de 2 mM Ca^{2+} et l'amplitude cumulée totale obtenue pendant la restauration suite à une même application à 4 Hz ($n = 3, 9, 3$ paires). A droite, normalisation par rapport aux valeurs obtenues à 0,1 Hz.

B) Graphique montrant à gauche l'amplitude cumulée totale des IPSCs pendant la restauration suite à une application de GABA (10 μM) à 4 Hz en condition standard de 2 mM Ca^{2+} et l'amplitude cumulée totale obtenue pendant la restauration suite à une même application en présence de 0,5 mM Ca^{2+} (n= 4 paires). A droite, normalisation par rapport aux valeurs obtenues en 2 mM Ca^{2+} .

C) Graphique montrant à gauche l'amplitude cumulée totale des IPSCs pendant la restauration suite à une application de GABA (10 μM) en présence de 0,5 mM Ca^{2+} à 0,1 Hz et l'amplitude cumulée totale obtenue pendant la restauration suite à une même application à 4 Hz (n= 2 paires). A droite, normalisation par rapport aux valeurs obtenues à 0,1 Hz.

Les moyennes sont en bleues \pm SEM (barres d'erreur).

III.3. Comparaison des restaurations réalisées par une capture de GABA et de glutamine à 4 Hz

Bien que les besoins en neurotransmetteur soient multipliés par 18 pendant un train à 4Hz (Figure 9), le stock issu de la capture de GABA semble paradoxalement diminuer par rapport à la capture réalisée en condition de stimulation basale. Nous avons donc cherché si la capture de glutamine pouvait compenser un déficit de recapture par GAT1. La figure 17 compare deux restaurations produites par une capture de GABA (100 μM) ou de glutamine (2 mM) lors d'une application de deux minutes pendant un train à 4 Hz. Pour permettre une comparaison directe des amplitudes cumulées, le GABA et la glutamine ont été appliqués en présence de SR95531 (100 μM) pour ne pas prendre en compte la restauration pendant l'application. Dans l'expérience décrite figure 17, le GABA restaure 32,9% et la glutamine 46,3% de l'amplitude initiale des IPSCs à 0,1 Hz. L'amplitude cumulée maximale après la capture de GABA correspond à la moitié (49,4%) de la valeur obtenue pour la glutamine (115 nA vs 233 nA, Figure 17B). Ce résultat suggère que les transporteurs de glutamine ont la capacité de restaurer le stock cytosolique en GABA nécessaire au remplissage vésiculaire en GABA pendant les périodes de forte activité.

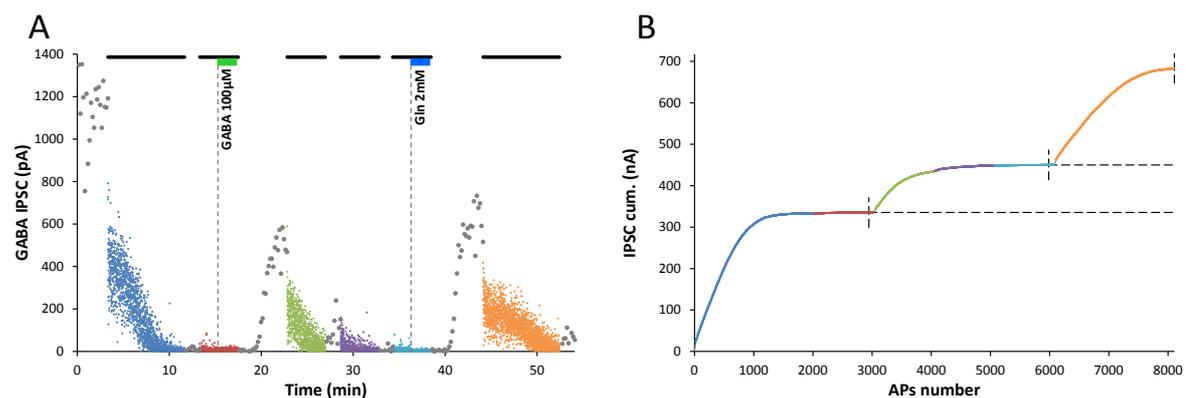


Figure 17. L'activité à 4 Hz potentialise la capture de glutamine

A) Evolution au cours du temps de l'amplitude absolue des IPSCs évoqués en continu à 0,1 Hz (*points gris*) et à 4 Hz (*croix de couleur*). Les applications (2 min) du GABA (100 μM avec SR95531 100 μM , *barre verte*) et de la glutamine (2 mM avec SR95531 100 μM , *barre bleue*) sont synchronisées avec une stimulation à 4 Hz.

B) Amplitude cumulée des IPSCs en fonction du nombre de potentiels d'action pour l'expérience représentée en A (même code couleur pour les trains). Les lignes pointillées horizontales marquent les amplitudes cumulées maximales atteintes pour la déplétion initiale et la restauration avec le GABA.

En moyenne, l'amplitude cumulée maximale après une application de glutamine à 4 Hz est $30 \pm 14\%$ supérieure à celle de GABA ($n = 11$ paires, Wilcoxon signed rank test $p=0.042$, norm. Paired t-test $p=0.036$, Figure 18), suggérant un remplissage plus efficace des vésicules suite à la capture de glutamine lors de l'activité par rapport à celle du GABA.

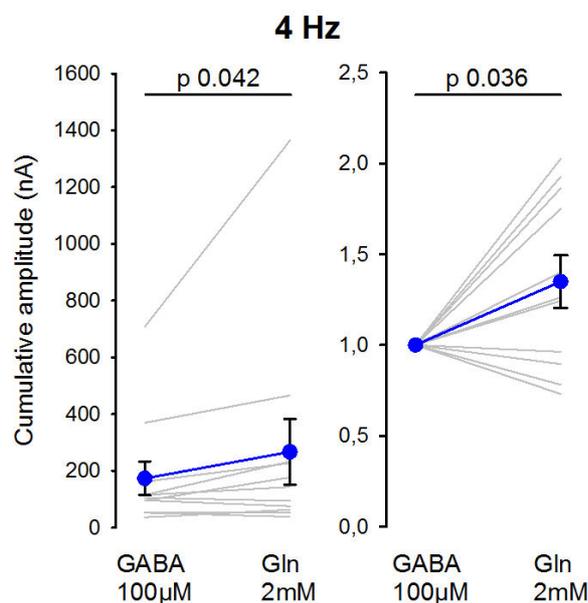


Figure 18. Comparaison des restaurations par capture de GABA ou de glutamine pendant l'activité

Graphique montrant à gauche l'amplitude cumulée totale des IPSCs pendant la restauration suite à une application de GABA ($100 \mu\text{M}$) à 4 Hz et l'amplitude cumulée totale obtenue pendant la restauration suite à une application de glutamine 2 mM à 4 Hz ($n=11$ paires). À droite, normalisation par rapport aux valeurs obtenues pour le GABA. Les moyennes sont en bleues \pm SEM (barres d'erreur).

III.4. Potentialisation de la capture de glutamine par l'activité

De multiples évidences suggèrent que la glutamine est le précurseur du GABA *in vivo*. Bien que nécessitant deux transformations enzymatiques successives pour synthétiser du GABA, nos résultats attestent que la capture extracellulaire de glutamine restaure l'amplitude des IPSCs évoqués à $0,1 \text{ Hz}$ et 4 Hz dans des neurones préalablement épuisés en GABA (Figure 17 et Wang et al 2013). Nous avons cherché si la capture de glutamine était régulée par un changement de régime d'activité. La figure 19 illustre la variation d'amplitude des IPSCs pendant une expérience de restauration du GABA cytosolique avec un neurone préalablement épuisé en GABA par une capture de glutamine appliquée pendant une condition d'activité basale puis pendant un train continu à 4 Hz . L'amplitude cumulée maximale après chaque application (2 mM , dix minutes, sans inhibiteur) peut être considérée comme reflétant la quantité de GABA synthétisée à partir de la capture extracellulaire de glutamine et disponible comme neurotransmetteur. La première application en condition basale d'activité restaure 76% de l'amplitude initiale des IPSCs à $0,1 \text{ Hz}$ (6348 pA vs 8385 pA) et $86,4\%$ de l'amplitude cumulée ($1,9 \mu\text{A}$ vs $2,2 \mu\text{A}$), indiquant une restauration du stock initial qui n'est pas suffisant pour assurer une libération stationnaire de

GABA à 4 Hz, comme l'indique l'absence de plateau dans le premier (bleu) et la première partie du troisième train (vert, Figures 19A-B). Néanmoins, lorsque la glutamine est appliquée pendant le train, on observe bien un plateau de l'amplitude des IPSCs qui se maintient à 27% de $\langle \text{IPSC}_{2..40} \rangle$ (1700 pA vs 6260 pA), jusqu'à la perte de la cellule. L'amplitude cumulée montre une potentialisation par un facteur 4 de la deuxième application de glutamine à 4 Hz (7,8 μA) par rapport à la première application à 0,1 Hz (1,9 μA). Notons que dans l'expérience décrite figure 19, la potentialisation est sous-estimée par l'absence de la seconde phase d'épuisement du GABA, mais que la durée d'application de glutamine est 2,5 à 5 fois plus longue que dans les autres expériences (2 ou 4 minutes) amplifiant les différences. La moyenne des potentialisations est de $2,3 \pm 0,2$ sur 7 paires (paired t-test $p < 0.001$, Figure 23).

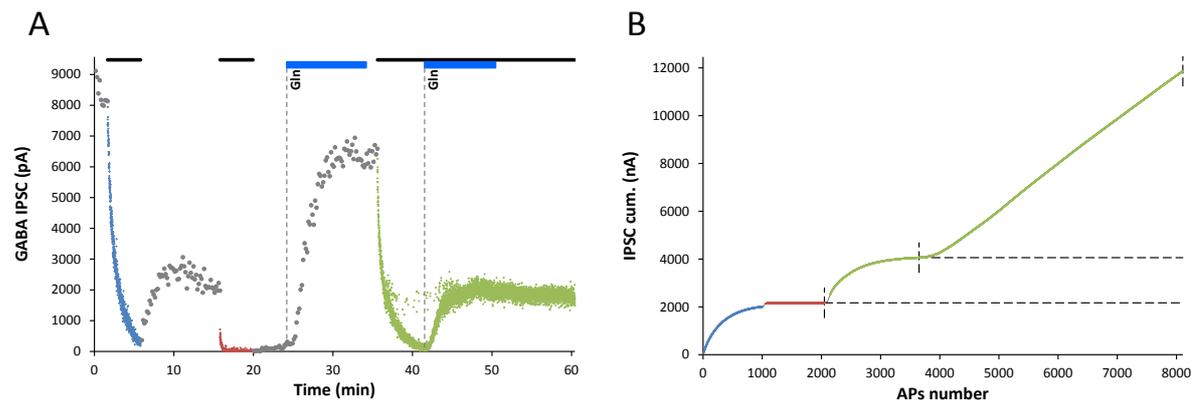


Figure 19. La potentialisation de la capture de glutamine pendant l'activité maintient la libération stationnaire de GABA

A) Amplitude des IPSCs évoqués à 0,1 Hz (*points gris*) et à 4 Hz (*croix de couleur*). La glutamine (2 mM) (*barres bleues*) est appliquée deux fois pendant 10 minutes. La deuxième application est enchainée à la déplétion pendant un train continu à 4 Hz (*barres noires*).

B) L'amplitude cumulée des IPSCs de l'expérience représentée en A avec la première ligne en pointillés (en bas) montrant l'amplitude cumulée depuis le début de la première (0,1 Hz) et la deuxième ligne en pointillés (en haut) depuis le début de la seconde (4 Hz) application de glutamine.

Le maintien de la libération stationnaire de GABA est en accord avec une potentialisation de l'influx de glutamine à 4 Hz et donc une augmentation de la concentration de GABA qui facilite le remplissage des vésicules par VIAAT. En accord, on observe une accélération de la cinétique de restauration (Figure 20A), la constante de temps ($\tau = 94 \pm 13$ s, $n = 4$ paires) étant divisée par 2 à 4 Hz ($\tau = 47 \pm 6$ s, $n = 7$ paires, t-test $p = 0.004$, Figure 20B).

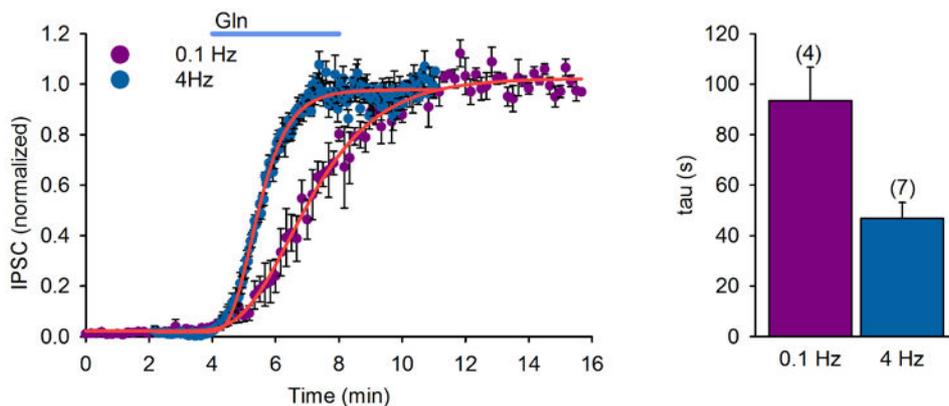


Figure 20. La cinétique de restauration de la transmission par la capture de Gln est plus rapide à 4 Hz
A) Amplitude moyenne des IPSCs évoqués à 0,1 Hz (points violets, n=4) et 4 Hz (points bleus, n=7) pendant une application de glutamine (2mM, barre bleue). Les lignes rouges représentent le fit avec une équation de Gompertz.
B) Histogramme des constantes de temps.

La potentialisation de la capture de glutamine (152 nA à 0,1 Hz vs 480 nA à 4 Hz) pour la production de GABA est spécifique puisque on n'observe pas de différence significative entre les applications à 0,1 Hz et 4 Hz lorsque la glutamine est remplacée par le glutamate (1336 nA à 0,1 Hz vs 1205 nA à 4 Hz) (Figure 21). La concentration extracellulaire de glutamate étant très faible *in vivo*, une modification de sa capture ne pourrait pas couvrir l'augmentation des besoins en GABA à 4 Hz.

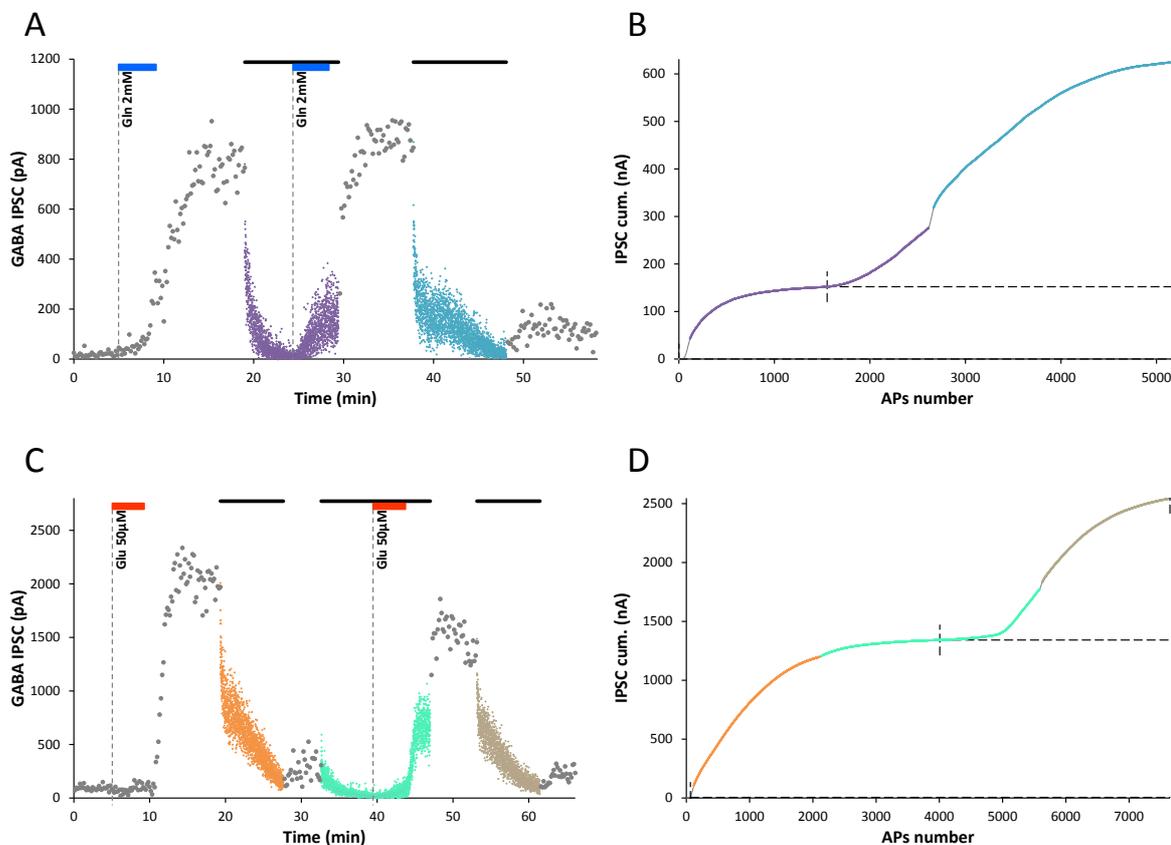


Figure 21. La glutamine, mais pas le glutamate, montre une régulation dépendante de l'activité dans l'approvisionnement en GABA

Les neurones ont été stimulés avec plusieurs trains de 1000 PAs à 4 Hz jusqu'à obtenir une déplétion des stocks cytosoliques. L'origine des temps a été remise à 0 pour simplifier.

A) Amplitude des IPSCs évoqués à 0,1 Hz (*points gris*) et à 4 Hz (*croix de couleur*). La glutamine (2 mM) (*barres bleues*) est appliquée deux fois pendant 4 minutes. La deuxième application est enchaînée à la déplétion pendant un train continu à 4 Hz (*barres noires*).

B) L'amplitude cumulée en fonction du nombre PAs pour l'expérience représentée en A (même code couleur). La ligne pointillée représente l'amplitude maximale de la première restauration (à 0,1 Hz).

C-D) même protocoles qu'en A, mais avec 50 μ M glutamate (*barres rouges*), en présence d'un cocktail d'inhibiteurs des récepteurs du glutamate.

Finalement, il nous a été possible de comparer directement sur une même paire les restaurations produites par le GABA et la glutamine en fonction du régime d'activité (cinq déplétions/quatre restaurations). La figure 22 illustre cette expérience résumant l'essentiel des résultats précédents, puisque l'amplitude cumulée après la première application de GABA à 4 Hz (142 nA) est 50% inférieure à celle réalisée à 0,1 Hz (294 nA). Inversement, l'application de glutamine à 4 Hz produit une amplitude cumulée (521 nA) 3,7 fois supérieure à celle d'application de GABA (142 nA).

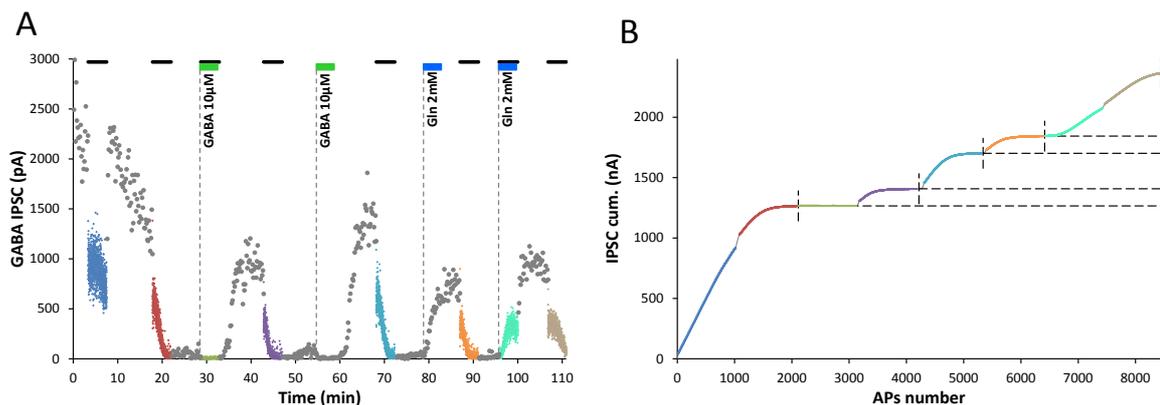


Figure 22. La capture de glutamine permet l'approvisionnement du stock cytosolique de GABA pendant l'activité

A) Amplitude des IPSCs évoqués à 0,1 Hz (*points gris*) et à 4 Hz (*croix de couleur*). Après la déplétion initiale, 4 restaurations sont effectuées par des applications (4 min) de GABA (10 μ M, *barres vertes*, en présence de SR95531 5 μ M) puis avec la glutamine (2mM, *barres bleues*). La première application de GABA et la deuxième application de glutamine sont synchronisées avec un train de 1000 PAs à 4 Hz (*barres noires*).

B) Amplitude cumulée en fonction du nombre de PAs de l'expérience en A (même code couleur). Les quatre lignes pointillées représentent les limites consécutives après chaque déplétion (initiale, GABA @ 0,1Hz, GABA @ 4 Hz, Gln @ 0,1 Hz et Gln @ 4Hz).

La figure 23 récapitule l'ensemble de ces résultats qui suggèrent que l'augmentation de la capture de glutamine est la voie métabolique préférentielle pour répondre à l'augmentation de la demande en GABA pendant l'activité. La recapture par GAT1 est diminuée à faible concentration de GABA, ouvrant la possibilité d'une augmentation de sa fuite hors de la synapse pendant une activité répétée. La capture de glutamate reste inchangée quel que soit le régime d'activité appliqué lors de l'application ($1,12 \pm 0,17$, $n = 4$ paires, paired t-test $p=0.533$). La capture de GABA pendant l'activité apparaît plus faible qu'à 0,1 Hz ($0,6 \pm 0,16$, $n = 15$ paires, Wilcoxon signed rank test $p = 0.008$), contrairement à la glutamine dont l'application pendant l'activité potentialise la capture ($2,3 \pm 0,2$, $n=7$ paires, Paired t-test $p<0.001$).

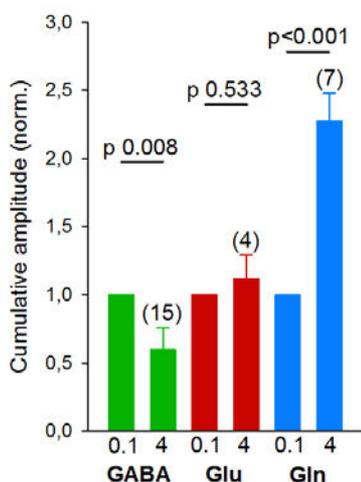


Figure 23. Effet de l'activité neuronale sur la capture de GABA, glutamate et glutamine

Histogramme de l'amplitude cumulée des IPCSs évoqués après une restauration par le GABA (barres vertes $n = 15$ paires), glutamate (barres rouges, $n = 4$ paires) et glutamine (barres bleues, $n = 7$ paires) à 0,1 Hz et 4 Hz. Les données à 4 Hz sont normalisées par rapport aux valeurs obtenues à 0,1 Hz pour chaque paire testée. Sigma Plot Paired t-test (glutamate et glutamine) et Wilcoxon signed rank test (GABA).

Résultats IV

VGAT-pHluorin

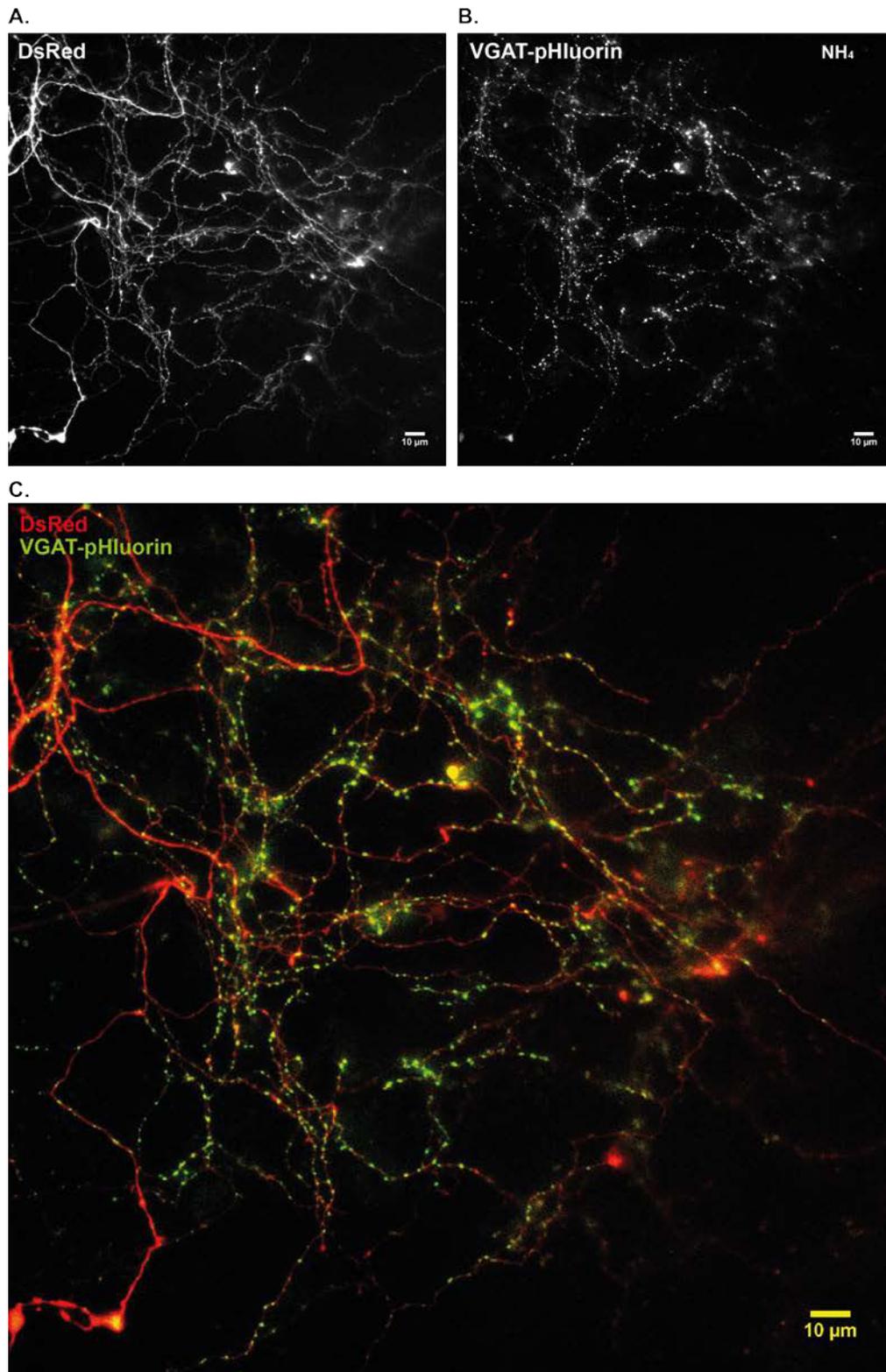


Figure 24. VGAT-pHluorin est accumulée dans les boutons synaptiques

A,B) Images en fluorescence d'un neurone (souris DIV 18X, 60X) cotransfecté avec la DsRed (A) et VGAT-pHluorin (B). La fluorescence de la VGAT-pHluorin est révélée en présence d'ammonium.

C) Superposition des images GFP et DsRed montrant leur colocalisation.

VGAT-pHluorin, un nouvel outil d'investigation de la dynamique des pools vésiculaires dans les interneurones.

IV.1. Expression de VGAT-pHluorin dans les neurones inhibiteurs

Une première série d'expériences d'imagerie avec la sonde FM5-95, décrite en détail dans le papier publié à Neuron (Wang et al, 2013), montre que la déplétion des stocks cytosoliques de neurotransmetteurs diminue considérablement la capture de la sonde FM, comme attendu d'une régulation métabolique de l'exocytose/endocytose pour limiter les cycles futiles lorsque les vésicules sont vides en neurotransmetteur. Cependant, l'utilisation de ces sondes FM se trouve rapidement limitée pour ce projet car elles ne sont pas spécifiques des neurones inhibiteurs et ne sont pas adaptées à un suivi en continu de la dynamique vésiculaire. Nous avons donc saisi l'opportunité d'utiliser une sonde génétiquement encodée, VGAT-pHluorin, développée en 2013 par l'équipe de Susan Voglmaier (UCSF) qui est particulièrement bien adaptée pour notre projet sur les neurones GABAergiques. Je rappellerai brièvement que cette sonde contient une EGFP sensible au pH (pHluorin) fusionnée au domaine luminal de VGAT par un linker TGG, le tout inséré dans un plasmide pCAGGS (environ 8 Kb). Nous avons par ailleurs utilisé la sonde VGlut1-pHluorin (don de Susan Voglmaier, UCSF) pour comparer leurs profils d'expression et de fonctionnement (Sankaranarayanan et al 2000, Santos et al 2013, Voglmaier et al 2006).

Les souris GAD65:eGFP ne pouvant pas être utilisées pour ce projet, nous avons utilisé des cultures mixtes d'hippocampe de souris sauvages (OF1) ou de rat (Wistar), plus robustes après transfection. En effet, la transfection d'un large plasmide s'est révélée délicate et de nombreux essais ont été nécessaires pour augmenter son efficacité, diminuer sa toxicité et préserver les membranes pour les enregistrements en paires.

A cet égard nous avons commencé avec la transfection au phosphate de calcium, qui a été utilisée avec succès au laboratoire pour des enregistrements électrophysiologiques longs. Malgré la recherche de paramètres optimums en faisant varier la densité cellulaire, la quantité d'ADN et le mode de formation des cristaux de phosphate de calcium, cette technique s'est révélée infructueuse pour transférer le plasmide pCAGGS. La transfection par lipofectamine s'est révélée plus performante et après avoir optimisé les différents paramètres de transfection, nous avons pu obtenir en routine une expression de VGAT-pHluorin seule ou combinée avec la protéine DsRed pour aider à l'identification des cellules transfectées. En effet, la fluorescence basale des sondes VGAT-pHluorin et VGlut1-pHluorin est très faible dans les conditions contrôles car ces transporteurs vésiculaires ne sont pas normalement présents à la membrane plasmique, pouvant rendre difficile l'identification des axones transfectés. Dans les faits, lorsque l'expression de la VGAT-pHluorin fut maîtrisée, la fluorescence basale au niveau du corps cellulaire se révéla suffisante pour sélectionner les cellules avec une forte expression sans nécessiter de coexpression avec la DsRed.

IV.1.1. La sonde VGAT-pHluorin est exprimée dans les boutons synaptiques

L'application d'une goutte d'ammonium (50 mM) sur une lamelle perfusée produit un « flash » de fluorescence de la sonde VGAT-pHluorin, révélant son accumulation dans les varicosités axonales et sa colocalisation avec la DsRed (Figure 24). La fluorescence basale de la sonde VGAT-pHluorin est seulement ~31% au-dessus du bruit de fond lui-même très faible avec notre caméra, confirmant que la protéine VGAT-pHluorin n'est pas exprimée à la membrane plasmique dans les conditions contrôles et réside dans un compartiment intracellulaire acide : le pool de vésicules des varicosités axonales.

IV.1.2. VGAT-pHluorin est exprimé majoritairement dans les neurones inhibiteurs.

IV.1.2.1. Evidences immunocytochimiques

Nous n'avons pas employé de stratégie particulière pour exprimer la sonde VGAT-pHluorin dans les neurones GABAergiques. Le vecteur pCAGGS n'ayant pas de promoteur spécifique, tous les neurones transfectés sont donc susceptibles d'exprimer la sonde. Si la proportion de neurones inhibiteurs dans l'hippocampe (environ 10%) est conservée dans les cultures primaires, il n'est pas attendu que les neurones GABAergiques expriment majoritairement la VGAT-pHluorin. Nous avons donc estimé par les techniques d'immunocytochimie, 8 jours après transfection, la proportion de neurones exprimant VGAT-pHluorin qui sont GABAergiques. Pour vérifier le phénotype des neurones transfectés, nous avons réalisé un co-marquage avec un anticorps anti-GFP et un anticorps anti-GABA (Figure 25) ou un anticorps anti-GAD65/67 (Figure 26). La figure 25 montre deux neurones (flèches blanches) exprimant la sonde VGAT-pHluorin, l'un est GABAergique, l'autre non. Une quantification dans les cultures primaires d'hippocampe de rat à DIV15 montre que la proportion des neurones transfectés GABAergiques est de $49,3 \pm 4,9\%$ ($n = 151$ neurones, 5 lamelles), soit une valeur très supérieure à la proportion attendue, rendant possible l'identification de paires avec un neurone présynaptique GABAergique exprimant VGAT-pHluorin.

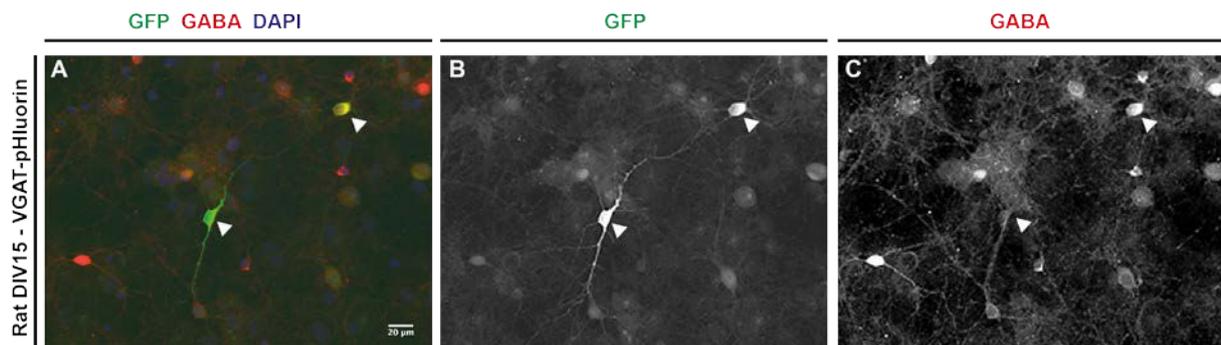


Figure 25. Co-marquage de la GFP et du GABA

Immunofluorescence de neurones (rat, DIV15) transfectés avec VGAT-pHluorin

A) Superposition du marquage GFP, GABA et DAPI .

B) Marquage GFP

C) Marquage GABA. Les flèches blanches montrent deux neurones transfectés par VGAT-pHluorin.

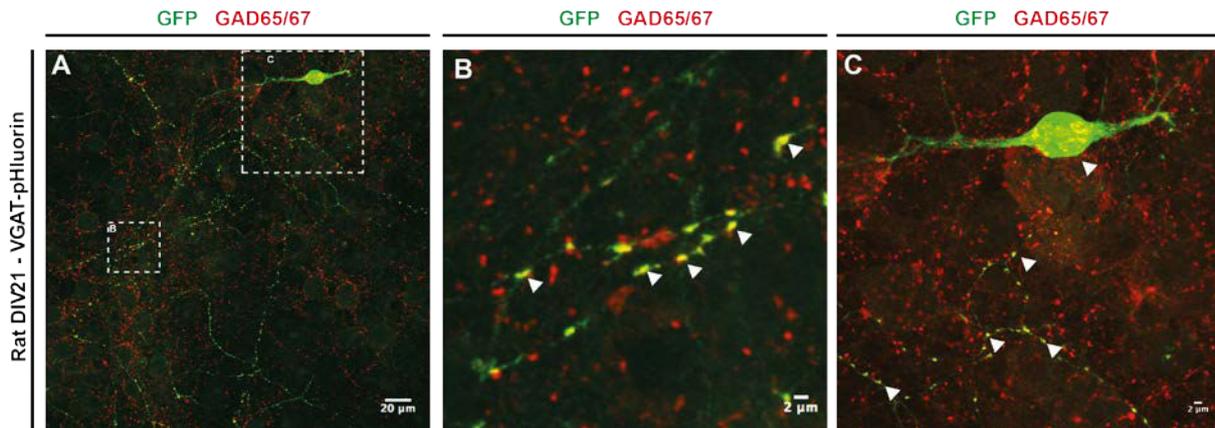


Figure 26. Co-marquage de la GFP et de la GAD65/67

Immunofluorescence de neurones transfectés avec VGAT-pHluorin (rat, DIV21)

A) Image de microscopie confocale au 40X.

B-C) Agrandissements des zones encadrées en pointillé dans le panneau A (zoom numérique 3,17). Les flèches blanches montrent des évidences de colocalisation de la GFP et de GAD65/67.

Nous avons ensuite voulu examiner la localisation des transporteurs neuronaux dans les boutons synaptiques exprimant la VGAT-pHluorin. Un co-marquage avec un anticorps anti-GAT1 montre une colocalisation de GAT1 avec la GFP dans tous les boutons synaptiques (Figure 27B). En revanche, un co-marquage avec un anticorps anti-EAAT3 (Figure 27C) révèle une localisation punctiforme d'EAAT3 (flèches jaunes) qui ne colocalise pas avec la GFP (flèches blanches). Le marquage d'EAAT3 semble apposé aux boutons marqués par la GFP. Nous avons réalisé des expériences similaires pour les transporteurs de glutamine mais l'anticorps anti-SNAT1 choisi s'est révélé non fonctionnel dans nos cultures.

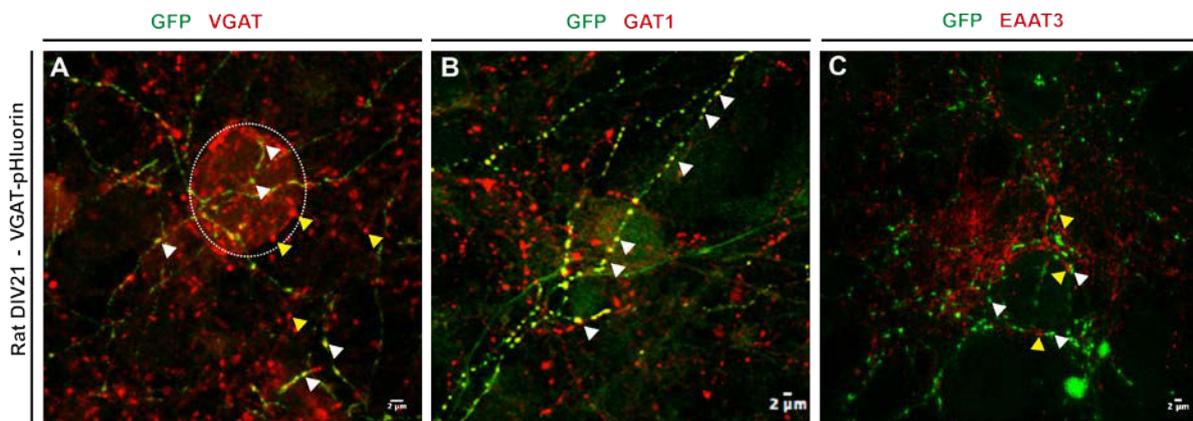


Figure 27. Co-marquage de la GFP et de VGAT, EAAT3 et GAT1

Immunofluorescence en microscopie confocale de neurones transfectés avec VGAT-pHluorin (rat, DIV21)

A) Co-marquage GFP/VGAT (40X + zoom numérique 3,16). Les flèches blanches montrent des évidences de colocalisation GFP et VGAT. Les flèches jaunes montrent un marquage VGAT endogène. La ligne pointillée blanche délimite un corps cellulaire.

B) Co-marquage GFP/GAT1. Image de microscopie confocale au 40X (zoom numérique 1,6). Les flèches blanches montrent des évidences de colocalisation GFP et GAT1.

C) Co-marquage GFP/EAAT3 (63X + zoom numérique 1,5). Les flèches blanches montrent un marquage GFP. Les flèches jaunes montrent un marquage EAAT3.

IV.1.2.2. Evidences électrophysiologiques

Pour tester directement le phénotype des neurones exprimant la VGAT-pHluorin, j'ai appliqué le protocole en paire décrit dans la partie I des résultats avec un neurone présynaptique exprimant VGAT-pHluorin. Sur 53 paires testées (rat et souris) en présence de NBQX et MK801, 34 avaient une connexion inhibitrice. L'inhibition complète des IPSCs par la gabazine (SR95531, 10 μ M) dans 7 paires sur 7 a confirmé que la majorité des paires transfectées (64%) étaient GABAergiques (Figure 28). L'origine de cette surreprésentation du phénotype GABAergique n'a pas été identifiée. Néanmoins, il est probable que la sélection de l'élément présynaptique, qui est basée sur des critères morphologiques et d'expression de la sonde, introduit un biais suffisant pour expliquer ce taux de succès.

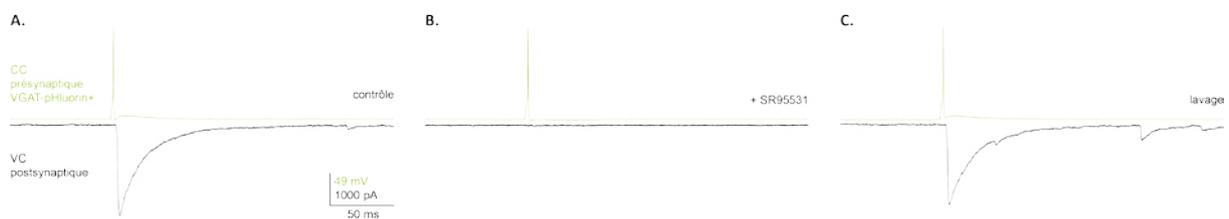


Figure 28. Les neurones VGAT-pHluorin⁺ libèrent du GABA

A-C Traces du potentiel de membrane du neurone présynaptique (*vert*) et du courant postsynaptique (*noir*), en présence de NBQX (2 μ M) et MK-801 (5 μ M). Les courants postsynaptiques enregistrés en présence de NBQX (2 μ M) et MK-801 (5 μ M) sont bloqués par le SR95531, un inhibiteur spécifique des récepteurs GABA_A. (A) contrôle ; (B) SR95531 (10 μ M) ; (C) lavage.

IV.2. Combiner l'imagerie présynaptique et les enregistrements post synaptiques pour étudier le cycle et le contenu vésiculaire

IV.2.1. Les contraintes expérimentales

Pour mesurer précisément la fluorescence dans des boutons synaptiques de petite taille ($\sim 1 \mu$ m), il était nécessaire d'utiliser un objectif 60X et d'isoler les varicosités exprimant VGAT-pHluorin dans le champ de la caméra, hors la présence des pipettes de patch ou de stimulation ainsi que le soma et principaux dendrites des cellules transfectées.

J'ai donc développé une procédure me permettant d'enregistrer la fluorescence présynaptique et les courants postsynaptiques en paire. Une cellule transfectée est tout d'abord sélectionnée à l'objectif 40X lorsqu'elle présente une arborisation axonale et une morphologie caractéristique des neurones inhibiteurs (voir Résultat, partie I, Figure 2). Les varicosités potentiellement intéressantes sont centrées au 60X en prenant soin de ne pas avoir les pipettes et le soma dans le champ. Les deux pipettes de patch ou la pipette de stimulation extracellulaire (environ 20 μ m au-dessus du soma transfecté) sont ensuite positionnées au 40X ou au 20X pour établir la configuration cellule entière, avant de revenir au 60X pour faire la mise au point et commencer l'acquisition.

IV.2.2. Acquisition et Analyse

L'acquisition de la fluorescence est effectuée avec une caméra CMOS Zyla 4.2 (ANDOR) à grand champ (2048 x 2048 pixels) pilotée par le logiciel μ Manager. La fluorescence des varicosités, analysée avec le logiciel ICY (Institut Pasteur), est moyennée dans des régions d'intérêt (ROIs : region of interest) d'une taille maximale de 9 par 9 pixels (107 nm/pixel), ce qui correspond à une surface de $\sim 1,15 \mu\text{m}^2$ au 60X, et qui sont centrés sur le pic d'intensité (Figure 29).

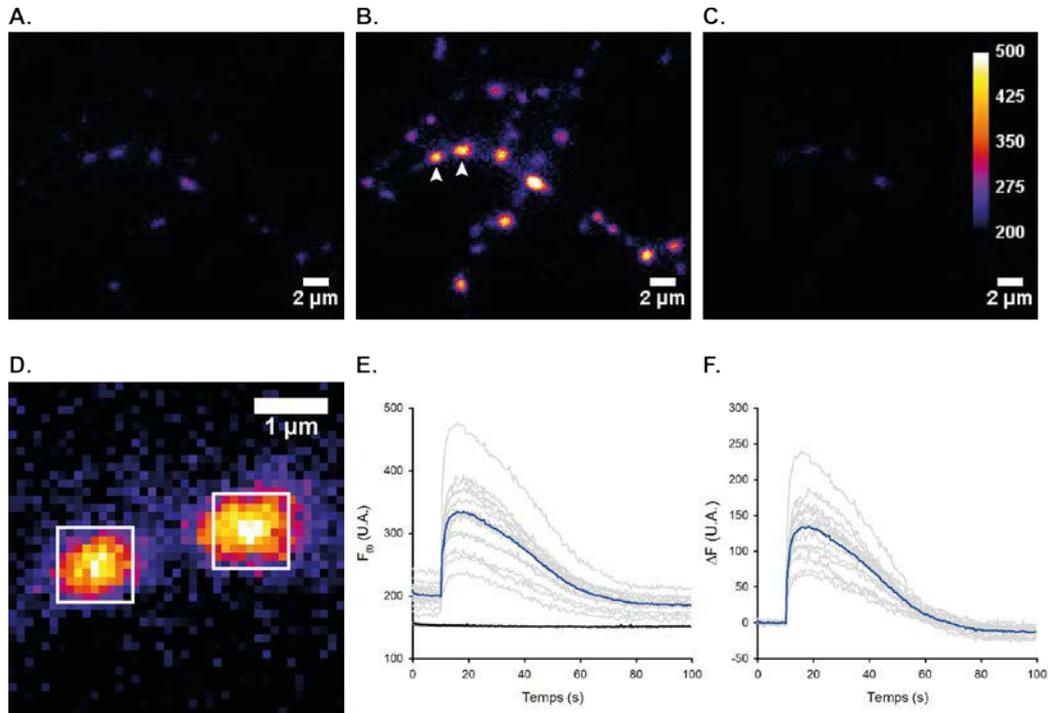


Figure 29. Signal de fluorescence de VGAT-pHluorin dans des boutons synaptiques

A) Condition basale.

B) Au pic de la réponse ammonium.

C) Après lavage

D) Agrandissement des deux boutons indiqués par des flèches en B, avec les ROIs correspondantes (carrés blancs).

E-F) Variation de l'intensité de fluorescence absolue (E) ou en ΔF (F) en fonction du temps pour 19 ROI pendant une application d'ammonium. La moyenne est en bleu. La ligne continue représente le bruit de fond.

IV.2.3. Stimulation extracellulaire

IV.2.3.1. VGlut1-pHluorin

Nous avons débuté les essais fonctionnels avec la sonde VGlut1-pHluorin en utilisant une stimulation de champ entre deux électrodes de platine (Figure 30A). L'intensité et la durée du pulse sont ajustées au minimum nécessaire pour déclencher un signal de fluorescence. La figure 30B montre la variation de fluorescence de 29 boutons synaptiques lors de trains successifs de 300 stimulations à 20 Hz. La durée de ces enregistrements impose de refaire la mise au point et de recalculer le F_0 entre chaque film (représenté par différentes couleurs).

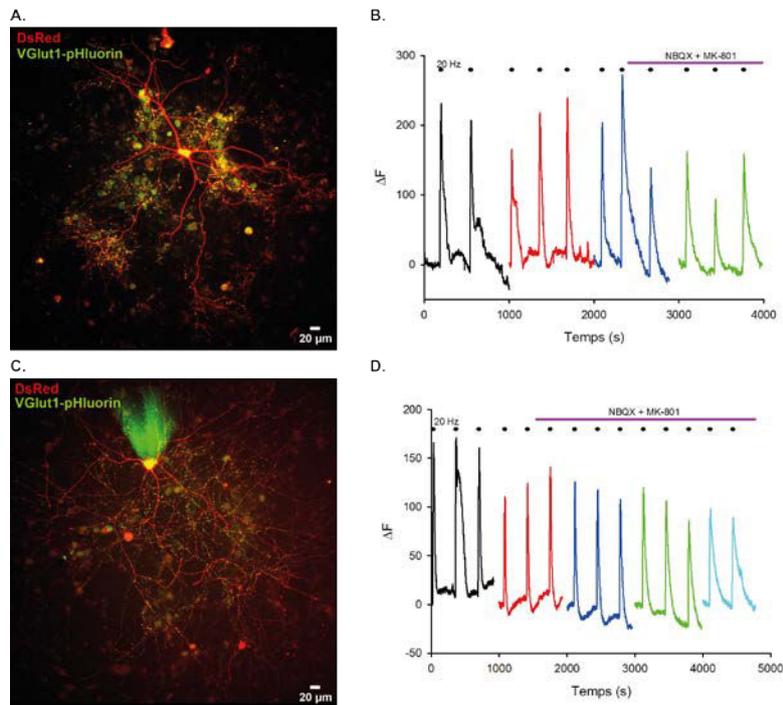


Figure 30. Suivi des cycles d'exo et endocytose par la sonde VGlut1-pHluorin lors de stimulation extracellulaire à 20 Hz

A-B) Colocalisation de la DsRed et de VGlut1-pHluorin dans un neurone de rat (DIV23 (A) et DIV24 (B)) (20X)

C-D) Variation de l'intensité de fluorescence de VGlut1-pHluorin (moyenne de 29 (A) et 40 (B) varicosités) lors de stimulation extracellulaire par (C) champ ou (D) pipette de stimulation extracellulaire. Les barres noires représentent chaque train de stimulation (300 PAs à 20 Hz). L'activité spontanée a été bloquée en présence de NBQX (2 μ M) et MK-801 (5 μ M) (*barre violette*). Deux à trois trains de stimulation sont appliqués pendant chaque enregistrement correspondant à des couleurs différentes (la valeur de F_0 est recalculée pour chaque enregistrement sur la moyenne des 20 images précédant le premier train de stimulation).

La stimulation de champ ne s'est pas révélée satisfaisante pour déclencher des potentiels d'action de manière fiable et efficace, quelques lamelles ne répondant pas. Des stimulations plus reproductibles ont été obtenues à l'aide d'une pipette de stimulation externe dont la pointe est centrée à une vingtaine de microns au-dessus du corps cellulaire du neurone transfecté (Figure 30C). Dans ces deux conditions de stimulation extracellulaire, l'augmentation de la fluorescence est déclenchée par la stimulation et décroît à son arrêt avec une constante de temps $\tau = 47,1 \pm 7s$ ($n = 4$ trains) pour la stimulation de champ et $\tau = 49,1 \pm 11,7s$ ($n = 9$ trains) pour la pipette de stimulation (Figure 30BD).

IV.2.3.2. VGAT-pHluorin

Des résultats similaires ont été obtenus avec des neurones exprimant la sonde VGAT-pHluorin (Figure 31A-C). La figure 31 montre la réponse obtenue lors de protocoles de train de 300 pulses à 20 Hz ou 1000 pulses à 4 Hz. Dans les deux conditions de stimulation, l'augmentation de la fluorescence est déclenchée par la stimulation et décroît à son arrêt avec $\tau = 54,8 \pm 9,1s$ ($n = 7$ trains, 20 Hz) et $\tau = 177 \pm 30 s$ ($n = 3$ trains, 4 Hz). En comparaison de la sonde VGlut1-pHluorin, le signal de la VGAT-pHluorin est significativement plus faible (Figure 31D).

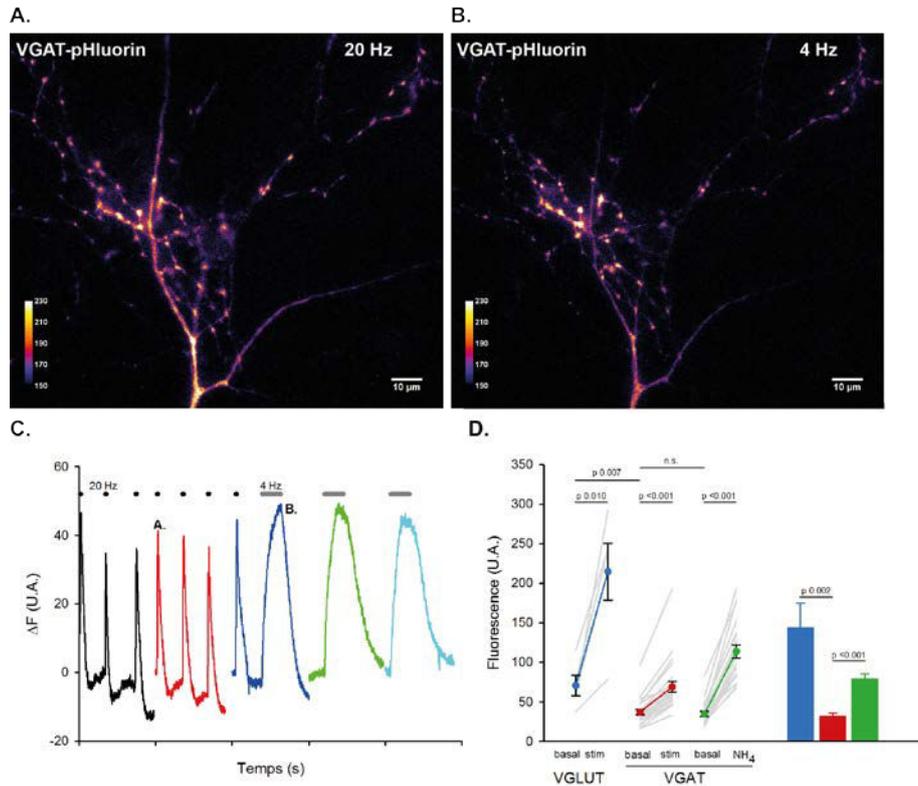


Figure 31. Suivi de cycles successifs d'exo et endocytose par la sonde VGAT-pHluorin évoqués par une stimulation à 20 Hz et 4 Hz avec une pipette externe

A-B) Image au pic d'intensité de fluorescence lors d'une stimulation de 300 PAs à 20 Hz (A) ou 1000 PAs à 4 Hz (B) des boutons synaptiques d'un neurone transfecté de rat (DIV13, 60X) en présence de NBQX (2 μ M) et MK-801 (5 μ M).

C) Variation moyenne de l'intensité de fluorescence au cours du temps pour 10 boutons.

D) Statistiques des intensités basales et des réponses évoquées par une stimulation électrique (stim) ou par une application d'ammonium (NH₄) pour les sondes VGlut1-pHluorin et VGAT-pHluorin. Paired t-test pour les comparaisons entre conditions basales et stimulation (ou NH₄), Mann Whitney pour les autres comparaisons (SigmaPlot). L'histogramme compare les moyennes des réponses (stim-basale ou NH₄-basale, même code couleur).

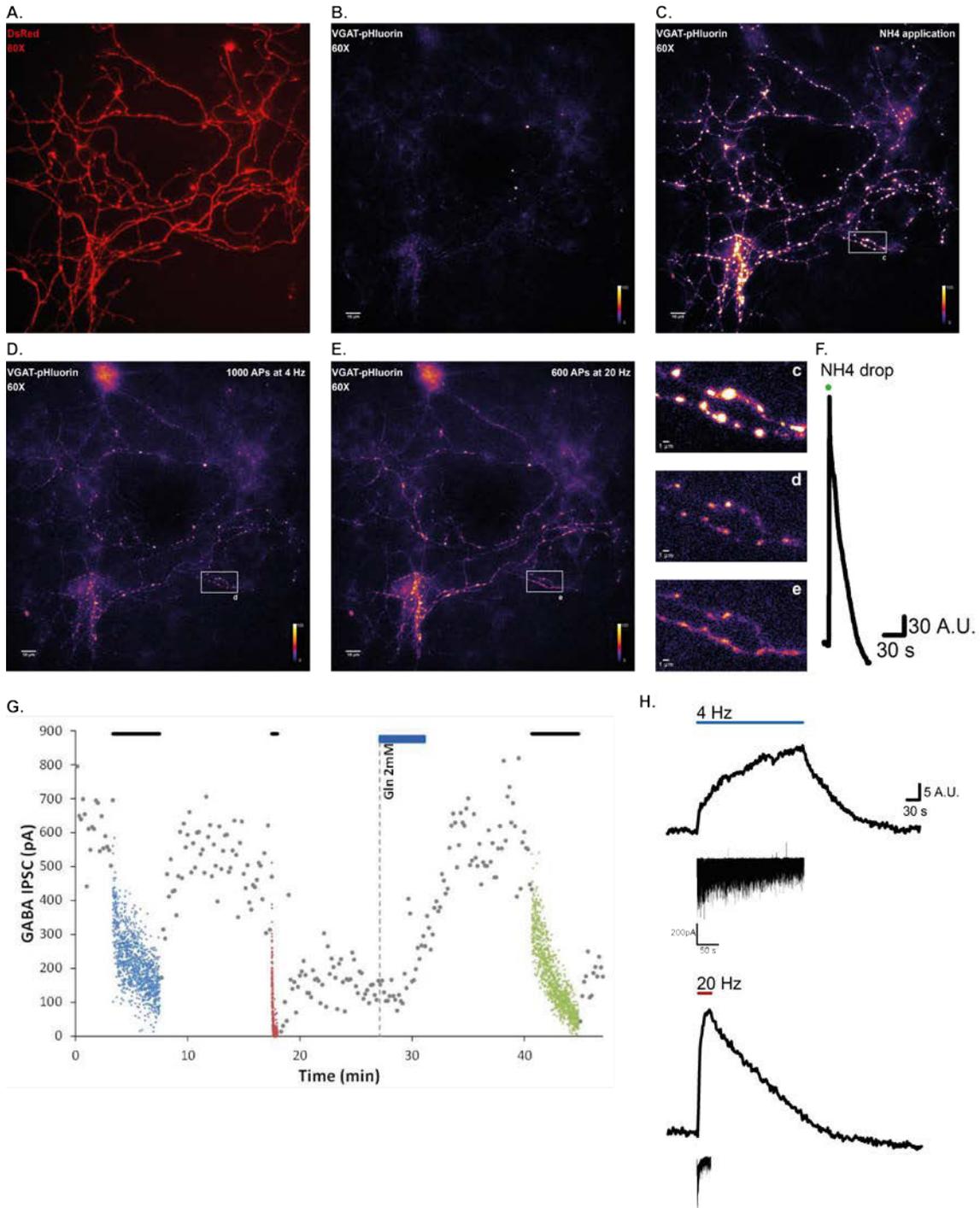


Figure 32. Imagerie présynaptique de VGAT-pHluorin et enregistrement post synaptique en paire

A) Fluorescence de la DsRed pour un neurone (souris, DIV15, 60X) cotransfecté avec VGAT-pHluorin.

B-E) Images de fluorescence en pseudocouleur de la VGAT-pHluorin en (B) condition contrôlée, au pic d'une application NH₄ (C, goutte 50 mM) et d'un train de stimulation à 4Hz (D, 1000 PAs) et 20 Hz (E, 600 PAs). (c, d et e) zoom sur les régions indiquées par un rectangle blanc en C, D et E.

F) Trace de la variation d'intensité de fluorescence pendant l'application de NH₄ (12 ROIs).

G) Amplitude des IPSCs évoqués à 0,1 Hz (*points gris*), 4 Hz (*croix bleues et vertes*) et 20 Hz (*croix rouges*) en fonction du temps.

H) Traces de la variation de l'intensité de fluorescence pendant des trains successifs de 1000 PAs à 4 Hz (haut) et 600 PAs à 20 Hz (bas) (23 ROIs). Les traces des courants postsynaptiques sont alignées en dessous à la même échelle de temps.

IV.2.4. Enregistrements pré- et post-synaptiques : combiner électrophysiologie en paire et imagerie VGAT-pHluorin

IV.2.4.1. Cultures primaires d'hippocampe de souris

La stimulation extracellulaire n'est pas la méthode idéale pour obtenir une déplétion rapide des stocks cytosoliques de neurotransmetteurs. En effet, elle n'apporte pas de contribution à la déplétion du GABA comme le fait la solution intracellulaire de la pipette de patch ; elle ne garantit pas non plus une stimulation spécifique d'un neurone transfecté du fait de la présence des nombreux axones et corps cellulaires qui peuvent être stimulés, ni de déclencher un potentiel d'action à chaque pulse pendant un train (le potentiel d'action n'est pas enregistré). Nous avons donc cherché à combiner l'imagerie avec les enregistrements en paire, en utilisant un neurone présynaptique cotransfecté avec VGAT-pHluorin et la DsRed pour son identification (Figure 32). L'intensité de fluorescence de la sonde VGAT-pHluorin étant marginalement plus élevée que le bruit de fond enregistré par la caméra, l'identification, la mise en place et la mise au point des varicosités sont grandement facilitées par la fluorescence de la Dsred (Figure 32A). Une application d'ammonium révèle la fluorescence punctiforme de VGAT-pHluorin (Figure 32C et 31F ; 268 U.A, n=12) qui est colocalisée avec la DsRed (Figure 32A). La réponse évoquée par un train de 1000 PAs à 4 Hz, le protocole standard que nous avons employé dans les enregistrements en paire, induit un signal de fluorescence bien moindre que l'ammonium (27,5 U.A., n = 23). Le décours est biphasique avec une phase initiale rapide, suivie d'une deuxième phase de montée beaucoup plus lente correspondant à la phase stationnaire des IPSCs (Figure 32H). La fluorescence décroît ensuite vers sa valeur basale à l'arrêt de la stimulation avec une constante de temps de 78,1 s. Une stimulation à 20 Hz induit une réponse plus intense (39,6 UA) avec une cinétique de retour très lente ($\tau = 192,3$ s). Les traces des courants correspondants à ces stimulations sont montrées à la même échelle de temps en figure 32H. On note la plus forte dépression pendant le train à 20 Hz, correspondant à une réduction de l'amplitude cumulée de 9,5 fois (216,7 nA (4Hz) vs 22,7 nA (20Hz), corrigée pour la différence de PAs). Cette différence d'amplitude cumulée suggère que le recyclage ne permet pas de maintenir une libération stationnaire de GABA à 20 Hz. De plus, le pic d'intensité est atteint à la fin du train à 20 Hz suggérant que la contribution de l'exocytose reste dominante alors que l'amplitude moyenne des IPSCs est quasi nulle. L'effondrement de l'amplitude des IPSCs à l'arrêt du train à 20 Hz suggère une déplétion en cours des stocks de GABA, ce qui est confirmé par la restauration de l'amplitude des IPCS après une application de glutamine (2mM). Malheureusement les données d'imagerie n'étaient pas été exploitables après restauration.

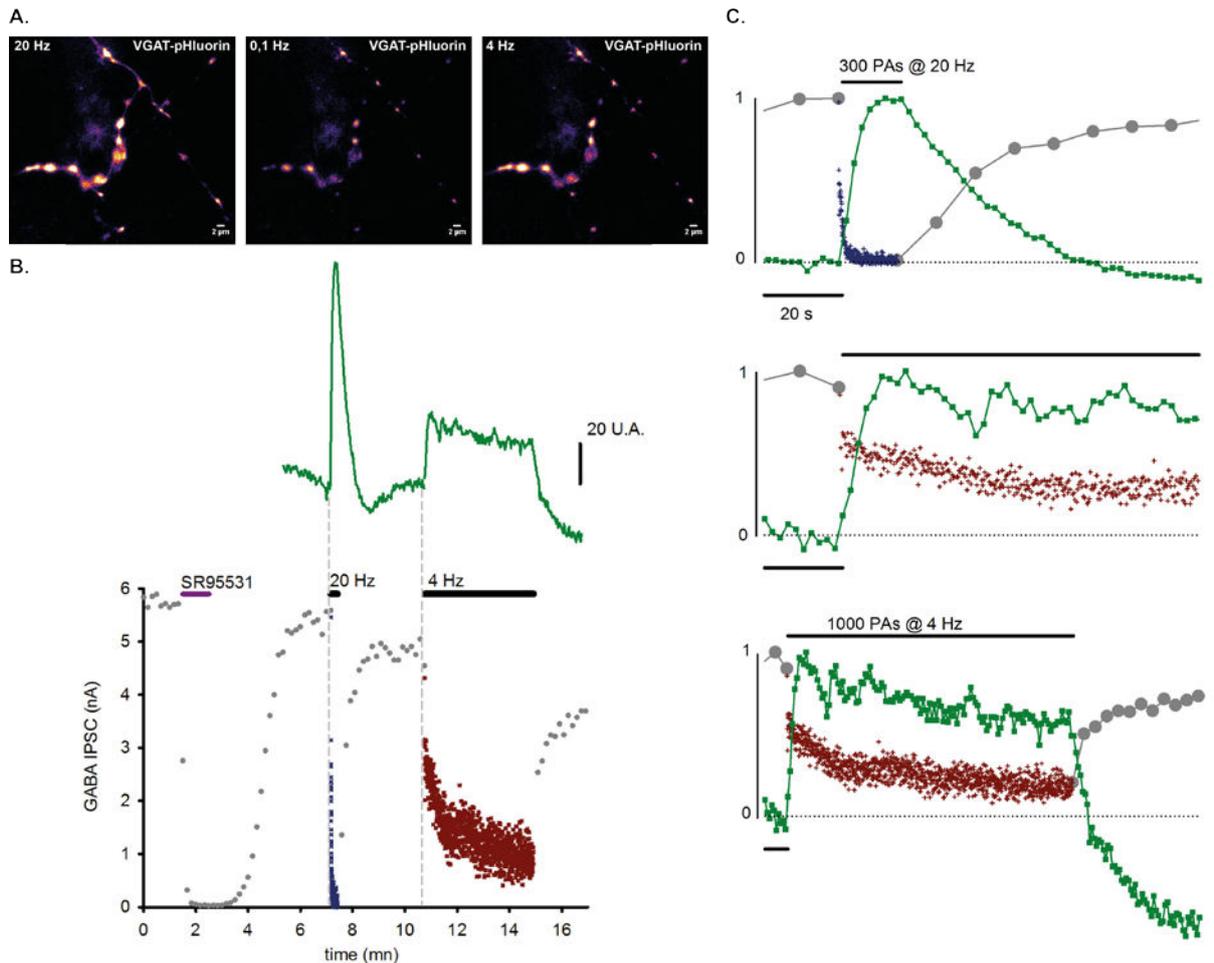


Figure 33. Imagerie de VGAT-pHluorin et enregistrement en paire sur une culture d'hippocampe de rat

Un enregistrement en paire est réalisé avec un neurone présynaptique exprimant la VGAT-pHluorin. Une acquisition de la fluorescence (400 ms), 0,5Hz) est réalisée toutes les 2 secondes, simultanément à l'enregistrement du courant postsynaptique.

A) Images en pseudocouleur de VGAT-pHluorin au pic de la réponse pendant un train de 300 APs à 20Hz (gauche), puis en condition contrôle à 0,1Hz (centre), et au pic de la réponse pendant un train de 1000 PAs à 4 Hz (droite).

B) Graphique composite de la variation de l'intensité de fluorescence (moyenne de 10 ROIs, *ligne verte*) et de l'amplitude des IPSCs évoqués à 0,1 Hz (*points gris*), 20 Hz (*croix bleues*) et 4 Hz (*croix rouges*). Les deux lignes verticales pointillées signalent le début de chaque train de stimulation.

C) Superposition de l'intensité de fluorescence et amplitude des IPSCs (normalisation min-max) en fonction du temps pour les deux trains de stimulation décrits en B (même code couleur). Dans le panneau du milieu, le début du train à 4 Hz est représenté à la même échelle de temps que celui du haut (20 Hz).

IV.2.4.2. Cultures primaires d'hippocampe de rat

Des résultats similaires sont obtenus sur une culture d'hippocampe de rat, avec une paire ayant une connexion GABAergique sensible à la gabazine (Figure 33). Le pic d'intensité de la fluorescence est trois fois plus élevé à 20 Hz (111 U.A.) qu'à 4 Hz (36 U.A.) et les constantes de temps à l'arrêt de la stimulation sont comparables ($\tau = 21,8\text{s}$ (20 Hz) vs $\tau = 31,1\text{ s}$ (4Hz)). Inversement, l'amplitude cumulée à 20 Hz représente seulement 10% de la valeur à 4 Hz (134 vs 1345 nA, corrigée pour la différence de PAs). En effet, l'amplitude moyenne des 150 derniers IPSCs est ~14 fois plus faible à 20 Hz qu'à 4 Hz (66 pA vs 916 pA) suggérant une libération stationnaire minimale de GABA lorsque les fortes fréquences de décharge sont prolongées. La comparaison des cinétiques de fluorescence et de dépression des IPSCs à 20 Hz (Figure 33C) suggère que l'exocytose se poursuit au même rythme sans réponse postsynaptique significative, suggérant une exocytose de vésicules avec un contenu en GABA très dégradé. Cet affaïssissement du signal contraste avec l'amplitude robuste des IPSCs enregistrés pendant le train suivant à 4 Hz, suggérant que cette fréquence modérée permet d'assurer un remplissage vésiculaire efficace (Figure 33C).

Nous avons donc confirmé la faisabilité d'une approche expérimentale permettant de combiner imagerie vésiculaire et enregistrement en paire. Les données présentées dans les figures 32 et 33 suggèrent que l'imagerie et l'électrophysiologie ont différents optimums de protocoles de stimulation. Les trains courts à 20 Hz permettent de suivre la phase d'exocytose avec une très faible contribution de l'endocytose. En revanche, la faible libération de GABA contribue peu à la déplétion des stocks. Les longs trains à 4 Hz sont adaptés au suivi du recyclage vésiculaire ; l'intensité de fluorescence mesurée dans les ROIS est nettement plus faible et présente une forte variabilité individuelle pendant la période stationnaire, pouvant rendre arbitraire leur sélection. Idéalement, il faudrait donc alterner les deux protocoles pour vérifier si la taille du pool recyclant (à 20 Hz) décroît avec la déplétion produite par des trains à 4 Hz.

DISCUSSION

Le but de mon projet de thèse a été d'examiner les mécanismes synaptiques permettant une libération stationnaire de GABA en fonction de l'activité neuronale.

Régulation des transporteurs par l'activité

Les enregistrements électrophysiologiques en paire (interneurones - neurones cibles) que nous avons réalisés dans des cultures d'hippocampe de souris GAD65:eGFP montrent que la consommation vésiculaire de GABA épuise entièrement les stocks cytosoliques après quelques milliers de potentiels d'action, provoquant un effondrement, en apparence irréversible, de l'amplitude des IPSCs. Cet épuisement est dû au fait que les neurones en condition d'enregistrement n'ont pas accès à une source exogène directe de GABA ou de ses précurseurs, ce qui n'est certainement pas le cas *in vivo*. En effet, une application extracellulaire de GABA restaure en quelques minutes le recyclage vésiculaire et l'amplitude des IPSCs, indiquant un rôle critique des transporteurs de recapture GAT1 pour l'approvisionnement des synapses.

GAT1 est fortement exprimé dans les terminaisons axonales où il termine la transmission inhibitrice en recapturant le GABA libéré dans la fente synaptique. Les inhibiteurs de GAT1 comme la tiagabine potentialisent l'inhibition en diminuant la clairance du GABA et sont utilisés en clinique pour le traitement des épilepsies résistantes. La contribution de cette recapture à l'homéostasie présynaptique en GABA est en revanche moins bien évaluée *in vivo* du fait du rôle majeur reconnu de la glutamate decarboxylase (Asada et al 1997, Lau & Murthy 2012) et de la difficulté d'isoler les différentes voies métaboliques d'approvisionnement. L'inactivation génique de GAT1 n'entraîne pas d'altération majeure de la transmission GABAergique (Jensen et al 2003) et je n'ai pas trouvé d'évidence dans la littérature suggérant un effet présynaptique de la tiagabine utilisée chroniquement. En prenant avantage de l'incapacité des neurones en culture à synthétiser du GABA à partir du D-glucose (Yu et al 1983), l'unique source de carbone métabolisable dans nos conditions d'enregistrement, nous avons pu révéler une contribution nette de GAT1 à l'approvisionnement en GABA pour le remplissage vésiculaire. Les restaurations initiales observées pour une concentration non physiologique de GABA (100 μM) ont permis de montrer une restauration des stocks supérieure à ceux formés à partir de la glutamine extraite du milieu de culture (qui ne contient pas de GABA et de glutamate). En revanche une concentration de 10 μM ou de 2 μM permet une restauration partielle du stock de GABA.

Ayant mis en évidence un rôle essentiel des transporteurs du GABA dans l'approvisionnement en GABA des synapses inhibitrices, nous nous sommes intéressés aux modalités de cet approvisionnement en fonction du régime d'activité neuronale, puisque les besoins en GABA sont accrus lors d'une période de forte activité (Figure 9, Résultats III). Pour estimer la quantité de GABA produit par les transporteurs, j'ai utilisé l'amplitude cumulée maximale des IPSCs évoqués pendant des protocoles de déplétion comme estimation du stock cytosolique de GABA. Il est alors possible de comparer la quantité relative de GABA produite après de brèves applications de GABA, glutamate ou glutamine lorsqu'elles sont réalisées pendant des stimulations à faible ou haute fréquence.

Nous avons observé une diminution de la quantité de GABA libérée lorsque le GABA est appliqué pendant une stimulation à 4 Hz par rapport à celle à 0,1 Hz (0,6 \pm 0,16 fois). Le stock de neurotransmetteurs reformé par la capture directe de GABA est donc réduit lorsque le GABA est

DISCUSSION

appliqué dans des conditions de forte activité. Cette différence pourrait simplement s'expliquer par le fait que le GABA capturé lors de son application à 4 Hz soit consommé directement. Cependant une application à 0,1 Hz de 2 μM de GABA permet le maintien de la transmission pendant deux trains (Figure 13, Résultats III). Si la capture de GABA avait été similaire dans les deux conditions de stimulation, la transmission aurait pu être maintenue pendant un train après l'application à 4 Hz. Pour estimer la consommation de GABA pendant le train où a lieu l'application, nous effectuons l'application à 4 Hz pour deux concentrations de Ca^{2+} différentes: 2 mM qui est la condition standard et 0,5 mM qui permet de diminuer drastiquement la probabilité de libération et d'éviter la consommation de GABA pendant l'application. On observe alors que la quantité de GABA libérée en condition 0,5 mM Ca^{2+} est $2,6 \pm 0,4$ fois plus grande que celle en condition 2 mM Ca^{2+} , suggérant une utilisation directe d'une partie du GABA capturé pendant l'activité. Néanmoins modifier la concentration de calcium n'influe pas seulement sur la probabilité de libération, d'autres mécanismes dépendants du calcium peuvent être modulés comme la phosphorylation de GAT1 par la PKC, par conséquent des expériences complémentaires seront nécessaires pour s'assurer d'une réelle différence dans la capture de GABA par les transporteurs entre activités à basse fréquence et à haute fréquence. Le trafic de GAT1 à la membrane peut être régulé par différentes phosphorylations (Law et al 2000, Quick et al 2004, Whitworth & Quick 2001) ou son turnover modifié par des interactions protéine-protéine (Beckman et al 1998, Deken et al 2003, Wang et al 2003). Plusieurs hypothèses pourraient alors expliquer cette différence dans la capture : la première est une diminution du nombre de transporteurs présents à la membrane plasmique, et la seconde une diminution du turnover du transporteur. Pour les transporteurs de GABA, il a été établi que GAT1 peut interagir avec la syntaxin-1A et que cette interaction diminue le turnover du transporteur (Beckman et al 1998, Deken et al 2003, Wang et al 2003). Pour démontrer que la capture de GABA est diminuée pendant une activité soutenue par une interaction avec la syntaxin-1A, une expérience à envisager serait d'ajouter dans la pipette de patch un peptide d'interaction qui reconnaît le domaine de liaison du transporteur GAT1 à la syntaxin-1A.

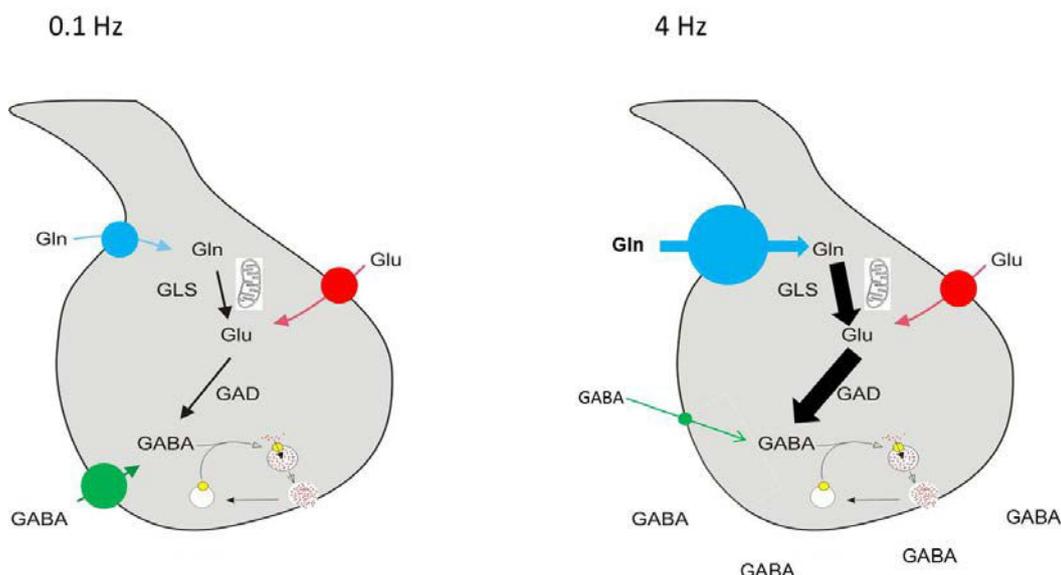
La capture de GABA pendant l'activité ne permettant pas d'approvisionner suffisamment la terminaison pour restaurer la transmission, et ayant déjà mis en évidence que la capture de glutamine ou de glutamate extracellulaire pouvait restaurer le stock cytosolique de GABA, nous avons étudié la capture de ses deux précurseurs pendant l'activité.

Contrairement à la capture de GABA, le stock de neurotransmetteurs résultant de la capture de la glutamine et de sa transformation en GABA est potentialisé lorsque la glutamine est appliquée pendant une période de forte activité (en moyenne par $2,3 \pm 0,2$). De la même manière que pour GAT1, la capture de glutamine peut être due à une augmentation du turnover des transporteurs ou à une augmentation du nombre de transporteurs à la membrane plasmique. Une autre explication plausible à une plus grande quantité de GABA produite pourrait être une augmentation de la synthèse enzymatique, par exemple par l'inductibilité de la GAD65 qui pourrait permettre une plus grande production de GABA (Waagepetersen et al 2001). La GAD est la source prédominante de GABA mais il a été montré que l'activité du neurone n'influe pas sur l'activité enzymatique et/ou le remplissage des vésicules dans les terminaisons des neurones du noyau cochléaire dorsal (Apostolides & Trussell 2013). En effet les auteurs observent une potentialisation similaire des IPSCs après le décaage de glutamate en absence ou en présence d'activité. Cependant, ces expériences ont été menées à faible fréquence de stimulation (1 Hz). A la synapse du calyx de Held, en tranche, il a été montré que la glutamine captée par les transporteurs présynaptiques du système A permettait

d'approvisionner le stock de glutamate présynaptique (Billups et al 2013). L'expression fonctionnelle de ces transporteurs est dynamiquement régulée par l'activité, la stimulation électrique augmente l'insertion des transporteurs à la membrane par une exocytose vésiculaire dépendante du Ca^{2+} . L'augmentation de la capture de glutamine pendant l'activité dans nos interneurons en culture pourrait de la même manière être due à une augmentation de leur expression à la membrane plasmique en période de forte activité. Il faudrait alors bloquer l'endocytose ou l'exocytose de ces transporteurs pour montrer qu'une variation du nombre de transporteurs est à l'origine de la différence de recapture de la glutamine, en bloquant par exemple l'internalisation des récepteurs en utilisant du Pitstop-1.

La potentialisation de la capture de glutamine lors d'une période de forte activité n'est pas observée pour la capture de glutamate. Aucune différence dans l'amplitude cumulée des IPSCs n'existe entre les deux fréquences, suggérant une capture de glutamate identique ($1,12 \pm 0,17$). Ces résultats écartent l'hypothèse d'une activité enzymatique de la GAD augmentée par l'activité puisque si cette hypothèse était valable dans le cas de la glutamine, elle le serait également dans le cas du glutamate et par conséquent la quantité de GABA libérée suite à une application de glutamate à 4 Hz serait plus importante que celle à 0,1 Hz. De plus il a été montré que 1) EAAT3/EEAC1 n'est pas le transporteur de glutamate le plus abondant et qu'il est localisé au niveau du soma et les dendrites (Holmseth et al 2012) ; 2) la concentration extracellulaire de glutamate est très faible in vivo et 3) le glutamate libéré est recapté à 95% par le transporteur glial EAAT2/GLT-1 (Tanaka et al 1997), une régulation de la capture neuronale de glutamate lors d'une période de forte activité ne serait pas aussi efficace qu'une régulation des transporteurs astrocytaires.

Nos résultats indiquent que les transporteurs de glutamine sont responsables de l'approvisionnement des varicosités en GABA lorsqu'une activité répétée entraîne un recyclage stationnaire. Le mécanisme moléculaire sous-tendant cette potentialisation reste à déterminer, l'hypothèse la plus probable étant une augmentation du trafic à la membrane des transporteurs de glutamine SNAT1.

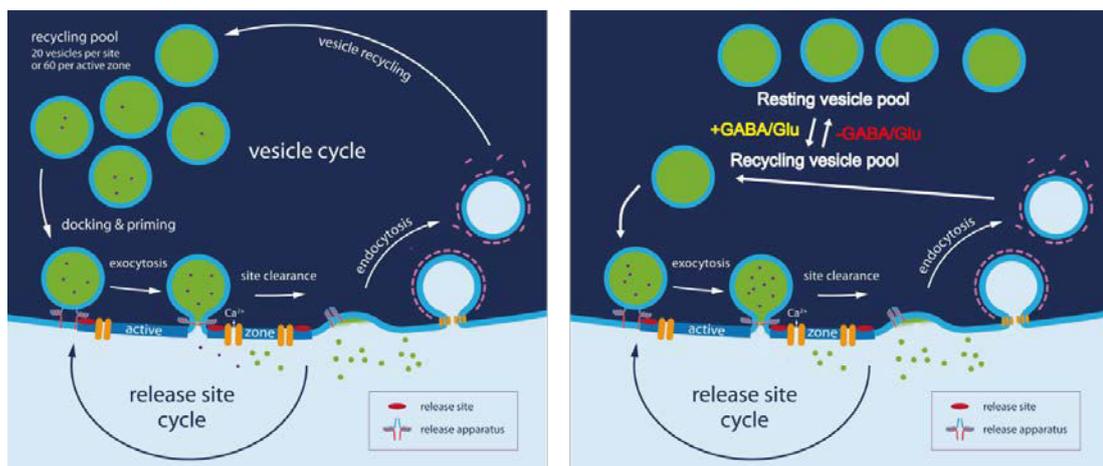


Bilan général de la capture de glutamine, glutamate et GABA en période de faible ou de forte activité

Régulation de la taille du pool de vésicules recyclantes en fonction de la quantité de neurotransmetteurs disponibles

Il est généralement accepté que le cycle de neurotransmetteurs et le cycle vésiculaire ne soient pas directement couplés (Edwards 2007), puisqu'il a été montré que les vésicules vides peuvent subir des cycles futiles d'exocytose et endocytose (Croft et al 2005, Parsons et al 1999, Wojcik et al 2004, Zhou et al 2000). Nos enregistrements en paire lors de protocoles de déplétion/restauration ont révélé une diminution du nombre de vésicules recyclantes lorsque le stock cytosolique de GABA est consommé, suggérant une interaction entre le cycle vésiculaire et celui des neurotransmetteurs (Wang et al 2013).

Une partie de mon travail de thèse a donc porté sur l'étude de la dynamique du pool de vésicules recyclantes. L'hypothèse de travail est que la taille du pool recyclant s'adapte à la quantité de neurotransmetteurs disponibles dans la terminaison. La diminution du nombre de vésicules à remplir lorsque la concentration cytosolique de GABA diminue, permet de préserver un remplissage correct des vésicules qui seront libérées. Une partie des vésicules recyclantes est alors mise en réserve et ces vésicules reviennent dans le pool recyclant lorsque le stock cytosolique de GABA est rétabli par l'application extracellulaire du GABA ou de l'un de ses précurseurs.



Hypothèse d'une adaptation du nombre de vésicules à la quantité de neurotransmetteurs disponibles, adapté de (Neher 2010)

Pour mettre en évidence la régulation métabolique du cycle vésiculaire j'ai comparé la capture de FM5-95, une sonde fluorescente marquant le pool de vésicules recyclantes à la membrane, dans les terminaisons contrôles et dans les terminaisons appauvries en GABA (Figure 8, (Wang et al 2013)). Après stimulation à haute fréquence, j'ai confirmé la diminution de ce pool lorsque la concentration de GABA devient limitante pour le remplissage vésiculaire. Comme dans les expériences d'enregistrements électrophysiologiques en paire, cette inhibition est réversible après restauration des stocks cytosoliques de GABA. Ces résultats ont permis d'établir un nouveau mode de régulation métabolique de la libération vésiculaire de GABA, qui permet d'ajuster le pool de vésicules libérables à la disponibilité en neurotransmetteurs (Wang et al 2013).

Cependant, cette technique d'imagerie ne permet pas de suivre la dynamique des pools de vésicules pendant des trains de stimulation successifs. Pour cela, j'ai utilisé une sonde reportrice VGAT-pHluorin développée dans le groupe de Susan Voglmaier (UCSF) qui permet de suivre les cycles d'exo/endocytose dans les neurones inhibiteurs. Cette sonde est une protéine de fusion entre la pHluorin (une GFP sensible au pH) et la partie C-terminale du transporteur vésiculaire des acides aminés inhibiteurs (VGAT/VIAAT) qui se trouve localisée dans la lumière des vésicules où le pH acide éteint la fluorescence. Ainsi, le signal de fluorescence n'est détecté qu'après exocytose, lorsque la sonde est exposée transitoirement à un pH neutre extracellulaire. Après transfection des neurones d'hippocampe de rat ou de souris, la VGAT-pHluorin acquiert une distribution punctiforme correspondant aux varicosités axonales qui sont révélées par une brève application d'ammonium. A l'inverse, une acidification extracellulaire a peu d'effet sur la fluorescence basale, confirmant la faible expression de cette sonde à la membrane plasmique en absence de stimulation.

Afin de corrélérer la taille du pool de vésicules recyclantes à la disponibilité en neurotransmetteurs, j'ai réussi à combiner les protocoles de déplétion/restauration dans des paires avec l'imagerie vésiculaire, en utilisant l'amplitude des IPSCs induits pendant un train de potentiels d'action comme estimation de la concentration cytosolique de GABA. En enregistrant les courants induits dans des paires entre un neurone présynaptique transfecté et sa cible, j'ai vérifié que les neurones exprimant la VGAT-pHluorin étaient GABAergiques, les courants étant sensibles à la gabazine (SR95531), un antagoniste des récepteurs GABA_A. Dans ces expériences, j'ai pu quantifier les variations de fluorescence de la pHluorin pendant des trains de stimulation à 20 Hz et à 4 Hz qui permettent de définir les phases d'exocytose et de recyclage stationnaire. La faisabilité de cette approche étant maintenant démontrée, le but de ce projet est de préciser comment évolue la dynamique des pools de vésicules recyclantes et de repos pendant les phases de déplétion et restauration. A terme, le but est d'identifier la nature du senseur métabolique de cette régulation et de préciser sa localisation cytosolique ou luminale.

En considérant notre hypothèse valide, un des résultats attendu par l'utilisation de VGAT-pHluorin serait une diminution de l'intensité de fluorescence dans les boutons synaptiques lors d'un train (1000 PAs à 4 Hz) dans le neurone appauvri en GABA par rapport à la fluorescence initiale observée lors du premier train lorsque les réserves de GABA du neurone sont intactes. Cette diminution de l'intensité de fluorescence correspondrait à un nombre plus petit de vésicules subissant l'exocytose, indiquant une diminution de la taille du pool recyclant. Un autre résultat en accord avec notre hypothèse serait un retour de l'intensité de la fluorescence lors d'un train à la valeur initiale dans les boutons synaptiques après l'application extracellulaire de glutamine, de glutamate ou de GABA, correspondant au retour à la taille initiale du pool recyclant.

Néanmoins, il pourrait de pas y avoir de différence visible dans l'intensité de fluorescence des boutons synaptiques pendant le train entre les différents états du neurone (initial, appauvri et restauré) si l'acidification n'a pas lieu dans les vésicules mises en réserve. En effet, si ces vésicules ne sont pas acidifiées, leur fluorescence ne sera pas éteinte et sera ajoutée à la fluorescence liée à l'exocytose de vésicules recyclantes. Cependant la fluorescence basale des boutons pendant la période de stimulation à 0,1 Hz sera augmentée. Une absence de différence dans l'intensité de fluorescence mesurée pendant un train pourrait aussi s'expliquer par un défaut d'endocytose, les sondes restent alors au contact du milieu extracellulaire au pH neutre et

DISCUSSION

donc fluorescentes. Une application de MES permettrait de distinguer ces deux hypothèses puisque n'étant pas perméant, il permet d'éteindre uniquement la fluorescence en surface.

Finalement, une question se pose : quel est le senseur métabolique de cette régulation présynaptique ? Pour répondre à cette question, il faut pouvoir introduire la glutamine et le glutamate dans le cytosol en évitant leur transformation enzymatique en GABA et introduire le GABA sans qu'il ne soit transporté dans les vésicules. Si le senseur métabolique est l'un des deux précurseurs du GABA ou le GABA lui-même, leur présence dans le cytosol pourrait induire un recyclage de vésicules vides. Ceci permettrait de comprendre pourquoi certaines études observent ce phénomène, comme par exemple dans le cas d'une inhibition de l'acidification (Zhou et al 2000), d'un KO pour le transporteur vésiculaire (Croft et al 2005) ou d'une inhibition du transporteur vésiculaire (Parsons et al 1999, Wojcik et al 2004). En effet, dans ces études, le remplissage des vésicules en neurotransmetteurs est bloqué mais le neurotransmetteur est toujours présent dans la terminaison.

Une stratégie envisagée serait d'inhiber la synthèse enzymatique de GABA. Pour le glutamate par exemple, l'acide chélidonique pourrait être ajouté dans la pipette de patch pour inhiber la GAD (Porter & Martin 1985) et empêcher la formation du GABA. Si, suite à l'épuisement du stock de GABA cytosolique, l'application de glutamate extracellulaire restaure la taille du pool, le senseur métabolique est le glutamate cytosolique. Pour la glutamine, une approche similaire utiliserait un inhibiteur de la glutaminase dans la pipette.

Une autre technique possible serait d'introduire des composés cagés dans la pipette de patch du neurone présynaptique afin d'induire des libérations intracellulaires de GABA ou de glutamate par photoactivation. En suivant le signal de fluorescence de la pHluorin dans un neurone préalablement épuisé en GABA, il serait alors possible de détecter si l'un ou l'autre des composés restaure les cycles d'exocytose/endocytose. Ces expériences pourraient être répétées en présence de bafilomycin (inhibiteur de la H⁺ v-ATPase) pour préciser si l'acidification des vésicules et l'accumulation vésiculaire du GABA jouent un rôle dans cette régulation.

Mes travaux de thèse mettent en évidence de nouveaux mécanismes d'adaptation de l'approvisionnement aux besoins imposés par le recyclage vésiculaire selon le régime d'activité des neurones inhibiteurs. En développant et en utilisant des paradigmes expérimentaux nouveaux, nous montrons que la régulation du cycle vésiculaire passe par une adaptation du pool de vésicules recyclantes à la disponibilité en neurotransmetteurs, permettant ainsi de préserver l'équilibre excitation et inhibition dans les réseaux de neurones.

REFERENCES

- Alabi AA, Tsien RW. 2013. Perspectives on Kiss-and-Run: Role in Exocytosis, Endocytosis, and Neurotransmission. *Annual Review of Physiology* 75: 393-422
- Andersen P, Bliss TVP, Lomo T, Olsen LI, Skrede KK. 1969. LAMELLAR ORGANIZATION OF HIPPOCAMPAL EXCITATORY PATHWAYS. *Acta Physiologica Scandinavica* 76: A4-&
- Anderson SA, Eisenstat DD, Shi L, Rubenstein JLR. 1997. Interneuron Migration from Basal Forebrain to Neocortex: Dependence on Dlx Genes. *Science* 278: 474-76
- Angelotti T, Macdonald R. 1993. Assembly of GABAA receptor subunits: alpha 1 beta 1 and alpha 1 beta 1 gamma 2S subunits produce unique ion channels with dissimilar single-channel properties. *The Journal of Neuroscience* 13: 1429-40
- Arata Y, Nishi T, Kawasaki-Nishi S, Shao E, Wilkens S, Forgacs M. 2002. Structure, subunit function and regulation of the coated vesicle and yeast vacuolar (H⁺)-ATPases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1555: 71-74
- Aravanis AM, Pyle JL, Tsien RW. 2003. Single synaptic vesicles fusing transiently and successively without loss of identity. *Nature* 423: 643-47
- Armano S, Coco S, Bacci A, Pravettoni E, Schenk U, et al. 2002. Localization and Functional Relevance of System A Neutral Amino Acid Transporters in Cultured Hippocampal Neurons. *Journal of Biological Chemistry* 277: 10467-73
- Asada H, Kawamura Y, Maruyama K, Kume H, Ding R-g, et al. 1996. Mice Lacking the 65 kDa Isoform of Glutamic Acid Decarboxylase (GAD65) Maintain Normal Levels of GAD67 and GABA in Their Brains but Are Susceptible to Seizures. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 229: 891-95
- Asada H, Kawamura Y, Maruyama K, Kume H, Ding R-G, et al. 1997. Cleft palate and decreased brain γ -aminobutyric acid in mice lacking the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94: 6496-99
- Atluri PP, Ryan TA. 2006. The Kinetics of Synaptic Vesicle Reacidification at Hippocampal Nerve Terminals. *The Journal of Neuroscience* 26: 2313-20
- Aubrey KR. 2016. Presynaptic control of inhibitory neurotransmitter content in VIAAT containing synaptic vesicles. *Neurochemistry International* 98: 94-102
- Aubrey KR, Rossi FM, Ruivo R, Alboni S, Bellenchi GC, et al. 2007. The Transporters GlyT2 and VIAAT Cooperate to Determine the Vesicular Glycinergic Phenotype. *The Journal of Neuroscience* 27: 6273-81
- Augustin I, Rosenmund C, Sudhof TC, Brose N. 1999. Munc13-1 is essential for fusion competence of glutamatergic synaptic vesicles. *Nature* 400: 457-61
- Bak LK, Schousboe A, Waagepetersen HS. 2006. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *Journal of Neurochemistry* 98: 641-53
- Bak LK, Ziemińska E, Waagepetersen HS, Schousboe A, Albrecht J. 2008. Metabolism of [U-¹³C]Glutamine and [U-¹³C]Glutamate in Isolated Rat Brain Mitochondria Suggests Functional Phosphate-Activated Glutaminase Activity in Matrix. *Neurochemical Research* 33: 273-78

- Barbour B, Brew H, Attwell D. 1988. Electrogenic glutamate uptake in glial cells is activated by intracellular potassium. *Nature* 335: 433-35
- Bartos M, Vida I, Jonas P. 2007. Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. *Nature Reviews Neuroscience* 8: 45-56
- Battaglioli G, Liu H, Martin DL. 2003. Kinetic differences between the isoforms of glutamate decarboxylase: implications for the regulation of GABA synthesis. *Journal of Neurochemistry* 86: 879-87
- Baumann SW, Baur R, Sigel E. 2003. Individual Properties of the Two Functional Agonist Sites in GABAA Receptors. *The Journal of Neuroscience* 23: 11158-66
- Beaudoin GMJ, Lee S-H, Singh D, Yuan Y, Ng Y-G, et al. 2012. Culturing pyramidal neurons from the early postnatal mouse hippocampus and cortex. *Nature protocols* 7: 1741-54
- Beckman ML, Bernstein EM, Quick MW. 1998. Protein Kinase C Regulates the Interaction between a GABA Transporter and Syntaxin 1A. *The Journal of Neuroscience* 18: 6103-12
- Ben-Ari Y. 2002a. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* 3: 728-39
- Ben-Ari Y. 2002b. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nature Reviews Neuroscience* 3: 728-39
- Ben-Ari Y, Gaiarsa J-L, Tyzio R, Khazipov R. 2007. GABA: A Pioneer Transmitter That Excites Immature Neurons and Generates Primitive Oscillations. *Physiological Reviews* 87: 1215-84
- Bendor Jacob T, Logan Todd P, Edwards Robert H. 2013. The Function of α -Synuclein. *Neuron* 79: 1044-66
- Bennett M, Calakos N, Scheller R. 1992. Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science* 257: 255-59
- Benson DL, Watkins FH, Steward O, Banker G. 1994a. Characterization of GABAergic neurons in hippocampal cell cultures. *J Neurocytol* 23: 279-95
- Benson DL, Watkins FH, Steward O, Banker G. 1994b. Characterization of GABAergic neurons in hippocampal cell cultures. *Journal of Neurocytology* 23: 279-95
- Bergles DE, Tzingounis AV, Jahr CE. 2002. Comparison of Coupled and Uncoupled Currents during Glutamate Uptake by GLT-1 Transporters. *The Journal of Neuroscience* 22: 10153-62
- Bernstein EM, Quick MW. 1999. Regulation of γ -Aminobutyric Acid (GABA) Transporters by Extracellular GABA. *Journal of Biological Chemistry* 274: 889-95
- Bettler B, Kaupmann K, Mosbacher J, Gassmann M. 2004. Molecular Structure and Physiological Functions of GABAB Receptors. *Physiological Reviews* 84: 835-67
- Billups B, Rossi D, Attwell D. 1996. Anion Conductance Behavior of the Glutamate Uptake Carrier in Salamander Retinal Glial Cells. *The Journal of Neuroscience* 16: 6722-31

- Billups D, Marx M-C, Mela I, Billups B. 2013. Inducible Presynaptic Glutamine Transport Supports Glutamatergic Transmission at the Calyx of Held Synapse. *The Journal of Neuroscience* 33: 17429-34
- Bohlhalter S, Mohler H, Fritschy J-M. 1994. Inhibitory neurotransmission in rat spinal cord: co-localization of glycine- and GABA_A-receptors at GABAergic synaptic contacts demonstrated by triple immunofluorescence staining. *Brain Research* 642: 59-69
- Boulland JL, Osen KK, Levy LM, Danbolt NC, Edwards RH, et al. 2002. Cell-specific expression of the glutamine transporter SN1 suggests differences in dependence on the glutamine cycle. *European Journal of Neuroscience* 15: 1615-31
- Branco T, Marra V, Staras K. 2010. Examining size–strength relationships at hippocampal synapses using an ultrastructural measurement of synaptic release probability. *Journal of Structural Biology* 172: 203-10
- Branco T, Staras K. 2009. The probability of neurotransmitter release: variability and feedback control at single synapses. *Nat Rev Neurosci* 10: 373-83
- Bright DP, Renzi M, Bartram J, McGee TP, MacKenzie G, et al. 2011. Profound desensitization by ambient GABA limits activation of δ -containing GABA(A) receptors during spillover. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31: 753-63
- Bright DP, Smart TG. 2013. Methods for recording and measuring tonic GABA(A) receptor-mediated inhibition. *Frontiers in Neural Circuits* 7: 193
- Brose N, Hofmann K, Hata Y, Südhof TC. 1995. Mammalian Homologues of *Caenorhabditis elegans* unc-13 Gene Define Novel Family of C2-domain Proteins. *Journal of Biological Chemistry* 270: 25273-80
- Burger PM, Hell J, Mehl E, Krasel C, Lottspeich F, Jahn R. 1991. GABA and glycine in synaptic vesicles: storage and transport characteristics. *Neuron* 7: 287-93
- Burré J, Sharma M, Tsetsenis T, Buchman V, Etherton M, Südhof TC. 2010. α -Synuclein Promotes SNARE-Complex Assembly in vivo and in vitro. *Science (New York, N.Y.)* 329: 1663-67
- Buzsáki G. 2002. Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron* 33: 325-40
- Casado M, Bendahan A, Zafra F, Danbolt NC, Aragón C, et al. 1993. Phosphorylation and modulation of brain glutamate transporters by protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry* 268: 27313-17
- Chalifoux JR, Carter AG. 2010. GABA(B) receptors modulate NMDA receptor calcium signals in dendritic spines. *Neuron* 66: 101-13
- Chalifoux JR, Carter AG. 2011. GABA(B) receptor modulation of voltage-sensitive calcium channels in spines and dendrites. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31: 4221-32
- Chandra S, Gallardo G, Fernández-Chacón R, Schlüter OM, Südhof TC. 2005. α -Synuclein Cooperates with CSP α in Preventing Neurodegeneration. *Cell* 123: 383-96

- Chapman ER. 2002. Synaptotagmin: A Ca²⁺ sensor that triggers exocytosis? *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 498-508
- Chaudhry FA, Krizaj D, Larsson P, Reimer RJ, Wreden C, et al. 2001. Coupled and uncoupled proton movement by amino acid transport system N. *The EMBO Journal* 20: 7041-51
- Chaudhry FA, Reimer RJ, Bellocchio EE, Danbolt NC, Osen KK, et al. 1998. The Vesicular GABA Transporter, VGAT, Localizes to Synaptic Vesicles in Sets of Glycinergic as Well as GABAergic Neurons. *The Journal of Neuroscience* 18: 9733-50
- Chaudhry FA, Reimer RJ, Krizaj D, Barber D, Storm-Mathisen J, et al. 1999. Molecular Analysis of System N Suggests Novel Physiological Roles in Nitrogen Metabolism and Synaptic Transmission. *Cell* 99: 769-80
- Chaudhry FA, Schmitz D, Reimer RJ, Larsson P, Gray AT, et al. 2002. Glutamine Uptake by Neurons: Interaction of Protons with System A Transporters. *The Journal of Neuroscience* 22: 62-72
- Chen N-H, Reith MEA, Quick MW. 2004a. Synaptic uptake and beyond: the sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter family SLC6. *Pflügers Archiv* 447: 519-31
- Chen W, Mahadomrongkul V, Berger UV, Bassan M, DeSilva T, et al. 2004b. The Glutamate Transporter GLT1a Is Expressed in Excitatory Axon Terminals of Mature Hippocampal Neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24: 1136-48
- Chen X, Barg S, Almers W. 2008. Release of the Styryl Dyes from Single Synaptic Vesicles in Hippocampal Neurons. *The Journal of Neuroscience* 28: 1894-903
- Cheung G, Cousin MA. 2013. Synaptic Vesicle Generation from Activity-Dependent Bulk Endosomes Requires Calcium and Calcineurin. *Journal of Neuroscience* 33: 3370-79
- Chi P, Greengard P, Ryan TA. 2001. Synapsin dispersion and recluster during synaptic activity. *Nat Neurosci* 4: 1187-93
- Chiu C-S, Jensen K, Sokolova I, Wang D, Li M, et al. 2002. Number, density, and surface/cytoplasmic distribution of GABA transporters at presynaptic structures of knock-in mice carrying GABA transporter subtype 1-green fluorescent protein fusions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22: 10251-66
- Christian EP, Dudek FE. 1988. Electrophysiological evidence from glutamate microapplications for local excitatory circuits in the CA1 area of rat hippocampal slices. *Journal of Neurophysiology* 59: 110-23
- Clayton EL, Evans GJO, Cousin MA. 2008. Bulk Synaptic Vesicle Endocytosis Is Rapidly Triggered during Strong Stimulation. *The Journal of Neuroscience* 28: 6627-32
- Clements JD, Silver RA. 2000. Unveiling synaptic plasticity: a new graphical and analytical approach. *Trends in Neurosciences* 23: 105-13
- Cobb SR, Buhl EH, Halasy K, Paulsen O, Somogyi P. 1995. Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature* 378: 75-78

- Comps-Agrar L, Kniazeff J, Nørskov-Lauritsen L, Maurel D, Gassmann M, et al. 2011. The oligomeric state sets GABA(B) receptor signalling efficacy. *The EMBO Journal* 30: 2336-49
- Conti F, DeBiasi S, Minelli A, Rothstein JD, Melone M. 1998. EAAC1, a high-affinity glutamate transporter, is localized to astrocytes and gabaergic neurons besides pyramidal cells in the rat cerebral cortex. *Cerebral Cortex* 8: 108-16
- Corey JL, Davidson N, Lester HA, Brecha N, Quick MW. 1994. Protein kinase C modulates the activity of a cloned gamma-aminobutyric acid transporter expressed in *Xenopus* oocytes via regulated subcellular redistribution of the transporter. *Journal of Biological Chemistry* 269: 14759-67
- Coulter DA, Eid T. 2012. Astrocytic Regulation of Glutamate Homeostasis in Epilepsy. *Glia* 60: 1215-26
- Cousin MA. 2009. Activity-Dependent Bulk Synaptic Vesicle Endocytosis - a Fast, High Capacity Membrane Retrieval Mechanism. *Molecular neurobiology* 39: 185-89
- Croft BG, Fortin GD, Corera AT, Edwards RH, Beaudet A, et al. 2005. Normal Biogenesis and Cycling of Empty Synaptic Vesicles in Dopamine Neurons of Vesicular Monoamine Transporter 2 Knockout Mice. *Molecular Biology of the Cell* 16: 306-15
- Csicsvari J, Jamieson B, Wise KD, Buzsáki G. 2003. Mechanisms of Gamma Oscillations in the Hippocampus of the Behaving Rat. *Neuron* 37: 311-22
- Danbolt NC. 2001. Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology* 65: 1-105
- Danbolt NC, Furness DN, Zhou Y. 2016. Neuronal vs glial glutamate uptake: Resolving the conundrum. *Neurochemistry international* 98: 29-45
- Danbolt NC, Storm-Mathisen J, Kanner BI. 1992. An [Na⁺ + K⁺]-coupled glutamate transporter purified from rat brain is located in glial cell processes. *Neuroscience* 51: 295-310
- Danglot L, Triller A, Marty S. 2006. The development of hippocampal interneurons in rodents. *Hippocampus* 16: 1032-60
- Darcy KJ, Staras K, Collinson LM, Goda Y. 2006. Constitutive sharing of recycling synaptic vesicles between presynaptic boutons. *Nature Neuroscience* 9: 315-21
- Davies CH, Starkey SJ, Pozza MF, Collingridge GL. 1991. GABAB autoreceptors regulate the induction of LTP. *Nature* 349: 609-11
- Davis KE, Straff DJ, Weinstein EA, Bannerman PG, Correale DM, et al. 1998. Multiple Signaling Pathways Regulate Cell Surface Expression and Activity of the Excitatory Amino Acid Carrier 1 Subtype of Glu Transporter in C6 Glioma. *The Journal of Neuroscience* 18: 2475-85
- Dawidowski D, Cafiso David S. 2013. Allosteric Control of Syntaxin 1a by Munc18-1: Characterization of the Open and Closed Conformations of Syntaxin. *Biophysical Journal* 104: 1585-94
- de Vivo L, Melone M, Rothstein JD, Conti F. 2009. GLT-1 Promoter Activity in Astrocytes and Neurons of Mouse Hippocampus and Somatic Sensory Cortex. *Frontiers in Neuroanatomy* 3: 31

- Deak F, Shin OH, Kavalali ET, Südhof TC. 2006. Structural determinants of synaptobrevin 2 function in synaptic vesicle fusion. *Journal of Neuroscience* 26: 6668-76
- DeFelipe J, López-Cruz PL, Benavides-Piccione R, Bielza C, Larrañaga P, et al. 2013. New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. *Nature reviews. Neuroscience* 14: 202-16
- Deken SL, Beckman ML, Boos L, Quick MW. 2000. Transport rates of GABA transporters: regulation by the N-terminal domain and syntaxin 1A. *Nat Neurosci* 3: 998-1003
- Deken SL, Wang D, Quick MW. 2003. Plasma Membrane GABA Transporters Reside on Distinct Vesicles and Undergo Rapid Regulated Recycling. *The Journal of Neuroscience* 23: 1563-68
- Delvendahl I, Vyleta NP, von Gersdorff H, Hallermann S. 2016. Fast, Temperature-Sensitive and Clathrin-Independent Endocytosis at Central Synapses. *Neuron* 90: 492-98
- Deng L, Kaeser PS, Xu W, Südhof TC. 2011. RIM Proteins Activate Vesicle Priming by Reversing Auto-Inhibitory Homodimerization of Munc13. *Neuron* 69: 317-31
- Deng P-Y, Xiao Z, Yang C, Rojanathammanee L, Grisanti L, et al. 2009. GABA(B) Receptor Activation Inhibits Neuronal Excitability and Spatial Learning in the Entorhinal Cortex by Activating TREK-2 K(+) Channels. *Neuron* 63: 230-43
- Deniz S, Wersinger E, Schwab Y, Mura C, Erdelyi F, et al. 2011. Mammalian retinal horizontal cells are unconventional GABAergic neurons. *Journal of Neurochemistry* 116: 350-62
- Denker A, Bethani I, Kröhnert K, Körber C, Horstmann H, et al. 2011a. A small pool of vesicles maintains synaptic activity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 17177-82
- Denker A, Kröhnert K, Bückers J, Neher E, Rizzoli SO. 2011b. The reserve pool of synaptic vesicles acts as a buffer for proteins involved in synaptic vesicle recycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 17183-88
- Denker A, Rizzoli SO. 2010. Synaptic vesicle pools: an update. *Frontiers in Synaptic Neuroscience* 2
- Dittman J, Ryan TA. 2009. Molecular Circuitry of Endocytosis at Nerve Terminals In *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, pp. 133-60
- Dobrunz LE. 2002. Release probability is regulated by the size of the readily releasable vesicle pool at excitatory synapses in hippocampus. *International Journal of Developmental Neuroscience* 20: 225-36
- Dobrunz LE, Stevens CF. 1997. Heterogeneity of Release Probability, Facilitation, and Depletion at Central Synapses. *Neuron* 18: 995-1008
- Dulubova I, Khvotchev M, Liu S, Huryeva I, Südhof TC, Rizo J. 2007. Munc18-1 binds directly to the neuronal SNARE complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 2697-702
- Dulubova I, Lou X, Lu J, Huryeva I, Alam A, et al. 2005. A Munc13/RIM/Rab3 tripartite complex: from priming to plasticity? *The EMBO Journal* 24: 2839-50

- Dumoulin A, Rostaing P, Bedet C, Levi S, Isambert MF, et al. 1999. Presence of the vesicular inhibitory amino acid transporter in GABAergic and glycinergic synaptic terminal boutons. *Journal of Cell Science* 112: 811-23
- Ebadi M. 1981. Regulation and function of pyridoxal phosphate in CNS. *Neurochemistry International* 3: 181-205
- Edwards RH. 2007. The Neurotransmitter Cycle and Quantal Size. *Neuron* 55: 835-58
- Egashira Y, Takase M, Takamori S. 2015. Monitoring of Vacuolar-Type H⁺ ATPase-Mediated Proton Influx into Synaptic Vesicles. *Journal of Neuroscience* 35: 3701-10
- El Hage M, Masson J, Conjard-Duplany A, Ferrier B, Baverel G, Martin G. 2012. Brain slices from glutaminase-deficient mice metabolize less glutamine: a cellular metabolomic study with carbon 13 NMR. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 32: 816-24
- Eliot AC, Kirsch JF. 2004. Pyridoxal phosphate enzymes: Mechanistic, structural, and evolutionary considerations. *Annual Review of Biochemistry* 73: 383-415
- Engel D, Pahner I, Schulze K, Frahm C, Jarry H, et al. 2001. Plasticity of rat central inhibitory synapses through GABA metabolism. *The Journal of Physiology* 535: 473-82
- Erlander MG, Tillakaratne NJK, Feldblum S, Patel N, Tobin AJ. 1991. Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron* 7: 91-100
- Esclapez M, Tillakaratne N, Kaufman D, Tobin A, Houser C. 1994. Comparative localization of two forms of glutamic acid decarboxylase and their mRNAs in rat brain supports the concept of functional differences between the forms. *The Journal of Neuroscience* 14: 1834-55
- Farrant M, Nusser Z. 2005. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA_A receptors. *Nature Reviews Neuroscience* 6: 215-29
- Farsi Z, Preobraschenski J, van den Bogaart G, Riedel D, Jahn R, Woehler A. 2016. Single-vesicle imaging reveals different transport mechanisms between glutamatergic and GABAergic vesicles. *Science* 351: 981-84
- Fenalti G, Law RHP, Buckle AM, Langendorf C, Tuck K, et al. 2007. GABA production by glutamic acid decarboxylase is regulated by a dynamic catalytic loop. *Nat Struct Mol Biol* 14: 280-86
- Fernandez-Alfonso T, Ryan TA. 2004. The kinetics of synaptic vesicle pool depletion at CNS synaptic terminals. *Neuron* 41: 943-53
- Fernandez-Alfonso T, Ryan TA. 2008. A heterogeneous "resting" pool of synaptic vesicles that is dynamically interchanged across boutons in mammalian CNS synapses. *Brain Cell Biology* 36: 87-100
- Fernández-Busnadiego R, Zuber B, Maurer UE, Cyrklaff M, Baumeister W, Lučić V. 2010. Quantitative analysis of the native presynaptic cytomatrix by cryoelectron tomography. *The Journal of Cell Biology* 188: 145-56
- Fernandez-Chacon R, Konigstorfer A, Gerber SH, Garcia J, Matos MF, et al. 2001. Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature* 410: 41-49

- Fisher JL, Macdonald RL. 1997. Single channel properties of recombinant GABAA receptors containing gamma 2 or delta subtypes expressed with alpha 1 and beta 3 subtypes in mouse L929 cells. *The Journal of Physiology* 505: 283-97
- Forgac M. 2007. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 917-29
- Forro T, Valenti O, Lasztocki B, Klausberger T. 2015. Temporal Organization of GABAergic Interneurons in the Intermediate CA1 Hippocampus During Network Oscillations. *Cerebral Cortex* 25: 1228-40
- Fournier KM, González MI, Robinson MB. 2004. Rapid Trafficking of the Neuronal Glutamate Transporter, EAAC1: EVIDENCE FOR DISTINCT TRAFFICKING PATHWAYS DIFFERENTIALLY REGULATED BY PROTEIN KINASE C AND PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR. *Journal of Biological Chemistry* 279: 34505-13
- Fowler MW, Staras K. 2015. Synaptic vesicle pools: Principles, properties and limitations. *Experimental Cell Research* 335: 150-56
- Fredj NB, Burrone J. 2009. A resting pool of vesicles is responsible for spontaneous vesicle fusion at the synapse. *Nature neuroscience* 12: 751-58
- Freund TF, Buzsáki G. 1996. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6: 347-470
- Fujiwara T, Mishima T, Kofuji T, Chiba T, Tanaka K, et al. 2006. Analysis of Knock-Out Mice to Determine the Role of HPC-1/Syntaxin 1A in Expressing Synaptic Plasticity. *The Journal of Neuroscience* 26: 5767-76
- Furness DN, Dehnes Y, Akhtar AQ, Rossi DJ, Hamann M, et al. 2008. A QUANTITATIVE ASSESSMENT OF GLUTAMATE UPTAKE INTO HIPPOCAMPAL SYNAPTIC TERMINALS AND ASTROCYTES: NEW INSIGHTS INTO A NEURONAL ROLE FOR EXCITATORY AMINO ACID TRANSPORTER 2 (EAAT2). *Neuroscience* 157: 80-94
- Gabriel T, García-Pérez E, Mahfooz K, Goñi J, Martínez-Turrillas R, et al. 2011. A New Kinetic Framework for Synaptic Vesicle Trafficking Tested in Synapsin Knock-Outs. *The Journal of Neuroscience* 31: 11563-77
- Gandhi SP, Stevens CF. 2003. Three modes of synaptic vesicular recycling revealed by single-vesicle imaging. *Nature* 423: 607-13
- Gasnier B. 2004. The SLC32 transporter, a key protein for the synaptic release of inhibitory amino acids. *Pflügers Archiv* 447: 756-59
- Gassmann M, Bettler B. 2012. Regulation of neuronal GABAB receptor functions by subunit composition. *Nat Rev Neurosci* 13: 380-94
- Gassmann M, Shaban H, Vigot R, Sansig G, Haller C, et al. 2004. Redistribution of GABAB(1) Protein and Atypical GABAB Responses in GABAB(2)-Deficient Mice. *The Journal of Neuroscience* 24: 6086-97
- Geppert M, Goda Y, Hammer RE, Li C, Rosahl TW, et al. 1994. Synaptotagmin I: A major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell* 79: 717-27
- Gerachshenko T, Blackmer T, Yoon E-J, Bartleson C, Hamm HE, Alford S. 2005. G[β][γ] acts at the C terminus of SNAP-25 to mediate presynaptic inhibition. *Nat Neurosci* 8: 597-605

- Gerber SH, Rah J-C, Min S-W, Liu X, de Wit H, et al. 2008. Conformational Switch of Syntaxin-1 Controls Synaptic Vesicle Fusion. *Science* 321: 1507-10
- Goda Y, Stevens CF. 1994. Two components of transmitter release at a central synapse. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91: 12942-46
- Goda Y, Stevens CF. 1998. Readily releasable pool size changes associated with long term depression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 1283-88
- Goldberg EM, Coulter DA. 2013. Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural circuit dysfunction. *Nature reviews. Neuroscience* 14: 337-49
- Gonzales AL, Lee W, Spencer SR, Oropeza RA, Chapman JV, et al. 2007. Turnover Rate of the γ -Aminobutyric Acid Transporter GAT1. *The Journal of membrane biology* 220: 33-51
- Gonzalez MI, Bannerman PG, Robinson MB. 2003. Phorbol myristate acetate-dependent interaction of protein kinase C alpha and the neuronal glutamate transporter EAAC1. *Journal of Neuroscience* 23: 5589-93
- González MI, Kazanietz MG, Robinson MB. 2002. Regulation of the Neuronal Glutamate Transporter Excitatory Amino Acid Carrier-1 (EAAC1) by Different Protein Kinase C Subtypes. *Molecular Pharmacology* 62: 901-10
- Granseth B, Odermatt B, Royle Stephen J, Lagnado L. 2006. Clathrin-Mediated Endocytosis Is the Dominant Mechanism of Vesicle Retrieval at Hippocampal Synapses. *Neuron* 51: 773-86
- Grewer C, Watzke N, Wiessner M, Rauen T. 2000. Glutamate translocation of the neuronal glutamate transporter EAAC1 occurs within milliseconds. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 9706-11
- Guastella J, Nelson N, Nelson H, Czyzyk L, Keynan S, et al. 1990. Cloning and expression of a rat brain GABA transporter. *Science* 249: 1303-06
- Guillet BA, Velly LJ, Canolle B, Masméjean FM, Nieoullon AL, Pisano P. 2005. Differential regulation by protein kinases of activity and cell surface expression of glutamate transporters in neuron-enriched cultures. *Neurochemistry International* 46: 337-46
- Gupta A, Wang Y, Markram H. 2000. Organizing Principles for a Diversity of GABAergic Interneurons and Synapses in the Neocortex. *Science* 287: 273-78
- Hafting T, Fyhn M, Molden S, Moser M-B, Moser EI. 2005. Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature* 436: 801-06
- Hanse E, Gustafsson B. 2001a. Factors explaining heterogeneity in short-term synaptic dynamics of hippocampal glutamatergic synapses in the neonatal rat. *The Journal of Physiology* 537: 141-49
- Hanse E, Gustafsson B. 2001b. Vesicle release probability and pre-primed pool at glutamatergic synapses in area CA1 of the rat neonatal hippocampus. *The Journal of Physiology* 531: 481-93
- Harata N, Pyle JL, Aravanis AM, Mozhayeva M, Kavalali ET, Tsien RW. 2001a. Limited numbers of recycling vesicles in small CNS nerve terminals: implications for neural signaling and vesicular cycling. *Trends in Neurosciences* 24: 637-43

- Harata N, Ryan TA, Smith SJ, Buchanan J, Tsien RW. 2001b. Visualizing recycling synaptic vesicles in hippocampal neurons by FM 1-43 photoconversion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 12748-53
- Harata NC, Choi S, Pyle JL, Aravanis AM, Tsien RW. 2006. Frequency-Dependent Kinetics and Prevalence of Kiss-and-Run and Reuse at Hippocampal Synapses Studied with Novel Quenching Methods. *Neuron* 49: 243-56
- Harris KD, Csicsvari J, Hirase H, Dragoi G, Buzsáki G. 2003. Organization of cell assemblies in the hippocampus. *Nature* 424: 552-56
- Harris Km, Sultan P. 1995. Variation in the number, location and size of synaptic vesicles provides an anatomical basis for the nonuniform probability of release at hippocampal CA1 synapses. *Neuropharmacology* 34: 1387-95
- He L, Wu X-S, Mohan R, Wu L-G. 2006. Two modes of fusion pore opening revealed by cell-attached recordings at a synapse. *Nature* 444: 102-05
- He Y, Janssen WGM, Rothstein JD, Morrison JH. 2000. Differential synaptic localization of the glutamate transporter EAAC1 and glutamate receptor subunit gluR2 in the rat hippocampus. *The Journal of Comparative Neurology* 418: 255-69
- Herzog E, Nadrigny F, Silm K, Biesemann C, Helling I, et al. 2011. In Vivo Imaging of Intersynaptic Vesicle Exchange Using VGLUT1(Venus) Knock-In Mice. *Journal of Neuroscience* 31: 15544-59
- Heuser JE, Reese TS. 1973. EVIDENCE FOR RECYCLING OF SYNAPTIC VESICLE MEMBRANE DURING TRANSMITTER RELEASE AT THE FROG NEUROMUSCULAR JUNCTION. *The Journal of Cell Biology* 57: 315-44
- Hibino H, Pironkova R, Onwumere O, Vologodskaja M, Hudspeth AJ, Lesage F. 2002. RIM - binding proteins (RBPs) couple Rab3 - interacting molecules (RIMs) to voltage - gated Ca(2+) channels. *Neuron* 34: 411-23
- Higley MJ. 2014. Localized GABAergic inhibition of dendritic Ca²⁺ signalling. *Nature Reviews Neuroscience* 15: 567-72
- Hogstad S, Svenneby G, Torgner IA, Kvamme E, Hertz L, Schousboe A. 1988. Glutaminase in neurons and astrocytes cultured from mouse brain: kinetic properties and effects of phosphate, glutamate, and ammonia (English). *Neurochemical research* 13: 383-88
- Holmseth S, Dehnes Y, Huang YH, Follin-Arbelet VV, Grutle NJ, et al. 2012. The Density of EAAC1 (EAAT3) Glutamate Transporters Expressed by Neurons in the Mammalian CNS. *The Journal of Neuroscience* 32: 6000-13
- Holmseth S, Scott HA, Real K, Lehre KP, Leergaard TB, et al. 2009. The concentrations and distributions of three C-terminal variants of the GLT1 (EAAT2; slc1a2) glutamate transporter protein in rat brain tissue suggest differential regulation. *Neuroscience* 162: 1055-71
- Hu H, Gan J, Jonas P. 2014. Fast-spiking, parvalbumin+ GABAergic interneurons: From cellular design to microcircuit function. *Science* 345: 1255263

- Husson Z, Rousseau CV, Broll I, Zeilhofer H, Dieudonné S. 2014. Differential GABAergic and Glycinergic Inputs of Inhibitory Interneurons and Purkinje Cells to Principal Cells of the Cerebellar Nuclei. *The Journal of Neuroscience* 34: 9418-31
- Ikeda K, Bekkers JM. 2009. Counting the number of releasable synaptic vesicles in a presynaptic terminal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 2945-50
- Ikeda K, Yanagawa Y, Bekkers JM. 2008. Distinctive Quantal Properties of Neurotransmission at Excitatory and Inhibitory Autapses Revealed Using Variance–Mean Analysis. *The Journal of Neuroscience* 28: 13563-73
- Jahn R, Fasshauer D. 2012. Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature* 490: 201-07
- Jahn R, Lang T, Südhof TC. 2003. Membrane Fusion. *Cell* 112: 519-33
- Jellali A, Stussi-Garaud C, Gasnier B, Rendon A, Sahel J-A, et al. 2002. Cellular localization of the vesicular inhibitory amino acid transporter in the mouse and human retina. *The Journal of Comparative Neurology* 449: 76-87
- Jensen K, Chiu C-S, Sokolova I, Lester HA, Mody I. 2003. GABA Transporter-1 (GAT1)-Deficient Mice: Differential Tonic Activation of GABAA Versus GABAB Receptors in the Hippocampus. *Journal of Neurophysiology* 90: 2690-701
- Jin H, Wu H, Osterhaus G, Wei J, Davis K, et al. 2003. Demonstration of functional coupling between γ -aminobutyric acid (GABA) synthesis and vesicular GABA transport into synaptic vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 4293-98
- Johnston D, Brown T. 1981. Giant synaptic potential hypothesis for epileptiform activity. *Science* 211: 294-97
- Jonas P, Bischofberger J, Sandkühler J. 1998. Corelease of Two Fast Neurotransmitters at a Central Synapse. *Science* 281: 419-24
- Jones MV, Sahara Y, Dzuby JA, Westbrook GL. 1998. Defining Affinity with the GABAA Receptor. *The Journal of Neuroscience* 18: 8590-604
- Juge N, Muroyama A, Hiasa M, Omote H, Moriyama Y. 2009. Vesicular Inhibitory Amino Acid Transporter Is a Cl⁻/ γ -Aminobutyrate Co-transporter. *Journal of Biological Chemistry* 284: 35073-78
- Jung J, Loy K, Schilling E-M, Röther M, Brauner JM, et al. 2014. The Antidepressant Fluoxetine Mobilizes Vesicles to the Recycling Pool of Rat Hippocampal Synapses During High Activity. *Molecular Neurobiology* 49: 916-30
- Jungblut M, Tiveron MC, Barral S, Abrahamsen B, Knobel S, et al. 2012. Isolation and characterization of living primary astroglial cells using the new GLAST-specific monoclonal antibody ACSA-1. *Glia* 60: 894-907
- Kaech S, Banker G. 2007. Culturing hippocampal neurons. *Nature Protocols* 1: 2406-15
- Kaesler PS, Deng L, Wang Y, Dulubova I, Liu X, et al. 2011. RIM proteins tether Ca²⁺-channels to presynaptic active zones via a direct PDZ-domain interaction. *Cell* 144: 282-95

- Kaila K, Price TJ, Payne JA, Puskarjov M, Voipio J. 2014. Cation-chloride cotransporters in neuronal development, plasticity and disease. *Nature reviews. Neuroscience* 15: 637-54
- Kamin D, Lauterbach MA, Westphal V, Keller J, Schönle A, et al. 2010. High- and Low-Mobility Stages in the Synaptic Vesicle Cycle. *Biophysical Journal* 99: 675-84
- Kanner BI. 1978. Active transport of γ -aminobutyric acid by membrane vesicles isolated from rat brain. *Biochemistry* 17: 1207-11
- Kanner BI. 2006. Structure and Function of Sodium-coupled GABA and Glutamate Transporters. *The Journal of Membrane Biology* 213: 89-100
- Kanner BI. 2007. Gate Movements in Glutamate Transporters. *ACS Chemical Biology* 2: 163-66
- Kanner BI, Bendahan A. 1982. Binding order of substrates to the (sodium + potassium ion)-coupled L-glutamic acid transporter from rat brain. *Biochemistry* 21: 6327-30
- Kanner BI, Sharon I. 1978. Active transport of L-glutamate by membrane vesicles isolated from rat brain. *Biochemistry* 17: 3949-53
- Kash SF, Johnson RS, Tecott LH, Noebels JL, Mayfield RD, et al. 1997. Epilepsy in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94: 14060-65
- Kasprovicz J, Kuenen S, Miskiewicz K, Habets RLP, Smits L, Verstreken P. 2008. Inactivation of clathrin heavy chain inhibits synaptic recycling but allows bulk membrane uptake. *The Journal of Cell Biology* 182: 1007-16
- Kaufman DL, Houser CR, Tobin AJ. 1991. Two Forms of the γ -Aminobutyric Acid Synthetic Enzyme Glutamate Decarboxylase Have Distinct Intraneuronal Distributions and Cofactor Interactions. *Journal of Neurochemistry* 56: 720-23
- Kaupmann K, Huggel K, Heid J, Flor PJ, Bischoff S, et al. 1997. Expression cloning of GABAB receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature* 386: 239-46
- Kavalali ET, Jorgensen EM. 2014. Visualizing presynaptic function. *Nature Neuroscience* 17: 10-16
- Kavanaugh MP, Arriza JL, North RA, Amara SG. 1992. Electrogenic uptake of gamma-aminobutyric acid by a cloned transporter expressed in *Xenopus* oocytes. *Journal of Biological Chemistry* 267: 22007-9
- Kepecs A, Fishell G. 2014. Interneuron cell types are fit to function. *Nature* 505: 318-26
- Khvotchev M, Dulubova I, Sun J, Dai H, Rizo J, Südhof TC. 2007. Dual Modes of Munc18-1/SNARE Interactions Are Coupled by Functionally Critical Binding to Syntaxin-1 N Terminus. *The Journal of Neuroscience* 27: 12147-55
- Kim SH, Ryan TA. 2009. Synaptic Vesicle Recycling at CNS Synapses without AP-2. *Journal of Neuroscience* 29: 3865-74
- Kim SH, Ryan TA. 2010. CDK5 Serves as a Major Control Point in Neurotransmitter Release. *Neuron* 67: 797-809

- Klausberger T, Somogyi P. 2008. Neuronal Diversity and Temporal Dynamics: The Unity of Hippocampal Circuit Operations. *Science* 321: 53-57
- Klingauf J, Kavalali ET, Tsien RW. 1998. Kinetics and regulation of fast endocytosis at hippocampal synapses. *Nature* 394: 581-85
- Kniazeff J, Pin JP. 2012. Dimers and oligomers of receptors coupled with G proteins, yes but why? GABA(B) receptor under focus. *M S-Medecine Sciences* 28: 858-63
- Kononenko NL, Puchkov D, Classen GA, Walter AM, Pechstein A, et al. 2014. Clathrin/AP-2 Mediate Synaptic Vesicle Reformation from Endosome-like Vacuoles but Are Not Essential for Membrane Retrieval at Central Synapses. *Neuron* 82: 981-88
- Kraushaar U, Jonas P. 2000a. Efficacy and stability of quantal GABA release at a hippocampal interneuron-principal neuron synapse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20: 5594-607
- Kraushaar U, Jonas P. 2000b. Efficacy and stability of quantal GABA release at a hippocampal interneuron-principal neuron synapse. *J Neurosci* 20: 5594-607
- Kropff E, Carmichael JE, Moser M-B, Moser EI. 2015. Speed cells in the medial entorhinal cortex. *Nature* 523: 419-24
- Krueger SR, Kolar A, Fitzsimonds RM. 2003. The Presynaptic Release Apparatus Is Functional in the Absence of Dendritic Contact and Highly Mobile within Isolated Axons. *Neuron* 40: 945-57
- Kulik Á, Vida I, Fukazawa Y, Guetg N, Kasugai Y, et al. 2006. Compartment-Dependent Colocalization of Kir3.2-Containing K⁺ Channels and GABAB Receptors in Hippocampal Pyramidal Cells. *The Journal of Neuroscience* 26: 4289-97
- Kullmann DM, Ruiz A, Rusakov DM, Scott R, Semyanov A, Walker MC. 2005. Presynaptic, extrasynaptic and axonal GABA(A) receptors in the CNS: where and why? *Progress in biophysics and molecular biology* 87: 33-46
- Kuntz A, Clement H-W, Lehnert W, van Calker D, Hennighausen K, et al. 2004. Effects of secretin on extracellular amino acid concentrations in rat hippocampus. *Journal of Neural Transmission* 111: 931-39
- Kvamme E, Torgner IA, Roberg B. 2001. Kinetics and localization of brain phosphate activated glutaminase. *Journal of Neuroscience Research* 66: 951-58
- Lau CG, Murthy VN. 2012. Activity-Dependent Regulation of Inhibition via GAD67. *The Journal of Neuroscience* 32: 8521-31
- Law RM, Stafford A, Quick MW. 2000. Functional Regulation of γ -Aminobutyric Acid Transporters by Direct Tyrosine Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 275: 23986-91
- Lee S-H, Marchionni I, Bezaire M, Varga C, Danielson N, et al. 2014. Parvalbumin-Positive Basket Cells Differentiate among Hippocampal Pyramidal Cells. *Neuron* 82: 1129-44
- Leung LS, Peloquin P. 2006. GABAB receptors inhibit backpropagating dendritic spikes in hippocampal CA1 pyramidal cells in vivo. *Hippocampus* 16: 388-407

- Levenson J, Weeber E, Selcher JC, Kategaya LS, Sweatt JD, Eskin A. 2002. Long-term potentiation and contextual fear conditioning increase neuronal glutamate uptake. *Nat Neurosci* 5: 155-61
- Li Z, Murthy VN. 2001. Visualizing Postendocytic Traffic of Synaptic Vesicles at Hippocampal Synapses. *Neuron* 31: 593-605
- Li ZY, Burrone J, Tyler WJ, Hartman KN, Albeanu DF, Murthy VN. 2005. Synaptic vesicle recycling studied in transgenic mice expressing synaptopHluorin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 6131-36
- Lisman JE, Jensen O. 2013. The Theta-Gamma Neural Code. *Neuron* 77
- Loo DDF, Eskandari S, Boorer KJ, Sarkar HK, Wright EM. 2000. Role of Cl⁻ in Electrogenic Na⁺-coupled Cotransporters GAT1 and SGLT1. *Journal of Biological Chemistry* 275: 37414-22
- López-Bendito G, Sturgess K, Erdélyi F, Szabó G, Molnár Z, Paulsen O. 2004. Preferential Origin and Layer Destination of GAD65-GFP Cortical Interneurons. *Cerebral Cortex* 14: 1122-33
- Lu C-C, Hilgemann DW. 1999. Gat1 (Gaba:Na⁺:Cl⁻) Cotransport Function: Steady State Studies in Giant Xenopus Oocyte Membrane Patches. *The Journal of General Physiology* 114: 429-44
- Lüscher B, Keller CA. 2004. Regulation of GABAA receptor trafficking, channel activity, and functional plasticity of inhibitory synapses. *Pharmacology & Therapeutics* 102: 195-221
- Ma C, Li W, Xu Y, Rizo J. 2011. Munc13 Mediates the Transition from the Closed Syntaxin–Munc18 complex to the SNARE complex. *Nature structural & molecular biology* 18: 542-49
- Mackenzie B, Erickson J. 2004. Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 447: 784-95
- Mackenzie B, Schäfer MK-H, Erickson JD, Hediger MA, Weihe E, Varoqui H. 2003. Functional Properties and Cellular Distribution of the System A Glutamine Transporter SNAT1 Support Specialized Roles in Central Neurons. *Journal of Biological Chemistry* 278: 23720-30
- MacVicar BA, Dudek FE. 1980. Local synaptic circuits in rat hippocampus: interactions between pyramidal cells. *Brain Research* 184: 220-23
- Mager S, Naeve J, Quick M, Labarca C, Davidson N, Lester HA. 1993. Steady states, charge movements, and rates for a cloned GABA transporter expressed in Xenopus oocytes. *Neuron* 10: 177-88
- Marcaggi Pk, Coles JA. 2001. Ammonium in nervous tissue: transport across cell membranes, fluxes from neurons to glial cells, and role in signalling. *Progress in Neurobiology* 64: 157-83
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C. 2004. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nature Reviews Neuroscience* 5: 793-807

- Marra V, Burden JJ, Thorpe JR, Smith IT, Smith SL, et al. 2012. A Preferentially Segregated Recycling Vesicle Pool of Limited Size Supports Neurotransmission in Native Central Synapses. *Neuron* 76: 579-89
- Martens H, Weston MC, Boulland J-L, Grønborg M, Grosche J, et al. 2008. Unique Luminal Localization of VGAT-C Terminus Allows for Selective Labeling of Active Cortical GABAergic Synapses. *The Journal of Neuroscience* 28: 13125-31
- Martin SB, Martin DL. 1979. STIMULATION BY PHOSPHATE OF THE ACTIVATION OF GLUTAMATE APODECARBOXYLASE BY PYRIDOXYL-5'-PHOSPHATE AND ITS IMPLICATIONS FOR THE CONTROL OF GABA SYNTHESIS. *Journal of Neurochemistry* 33: 1275-83
- Mathews GC, Diamond JS. 2003. Neuronal Glutamate Uptake Contributes to GABA Synthesis and Inhibitory Synaptic Strength. *The Journal of Neuroscience* 23: 2040-48
- Matz J, Gilyan A, Kolar A, McCarvill T, Krueger SR. 2010. Rapid structural alterations of the active zone lead to sustained changes in neurotransmitter release. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 8836-41
- Maurel D, Comps-Agrar L, Brock C, Rives M-L, Bourrier E, et al. 2008. Cell-surface protein-protein interaction analysis with time-resolved FRET and snap-tag technologies: application to GPCR oligomerization. *Nature Methods* 5: 561-67
- Maximov A, Tang J, Yang X, Pang ZP, Südhof TC. 2009. Complexin Controls the Force Transfer from SNARE Complexes to Membranes in Fusion. *Science (New York, N.Y.)* 323: 516-21
- McBain CJ, Fisahn A. 2001. Interneurons unbound. *Nature Reviews Neuroscience* 2: 11-23
- McIntire SL, Reimer RJ, Schuske K, Edwards RH, Jorgensen EM. 1997. Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature* 389: 870-76
- McMahon HT, Boucrot E. 2011. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 517-33
- McMahon HT, Ushkaryov YA, Edelman L, Link E, Binz T, et al. 1993. Cellubrevin is a ubiquitous tetanus-toxin substrate homologous to a putative synaptic vesicle fusion protein. *Nature* 364: 346-49
- Melone M, Barbaresi P, Fattorini G, Conti F. 2005. Neuronal localization of the GABA transporter GAT-3 in human cerebral cortex: A procedural artifact? *Journal of Chemical Neuroanatomy* 30: 45-54
- Melone M, Bellesi M, Conti F. 2009. Synaptic Localization of GLT-1a in the Rat Somatic Sensory Cortex. *Glia* 57: 108-17
- Melone M, Bellesi M, Ducati A, Iacoangeli M, Conti F. 2010. Cellular and Synaptic Localization of EAAT2a in Human Cerebral Cortex. *Frontiers in Neuroanatomy* 4: 151
- Melone M, Quagliano F, Barbaresi P, Varoqui H, Erickson JD, Conti F. 2004. Localization of the Glutamine Transporter SNAT1 in Rat Cerebral Cortex and Neighboring Structures, With a Note on its Localization in Human Cortex. *Cerebral Cortex* 14: 562-74
- Melone M, Varoqui H, Erickson JD, Conti F. 2006. Localization of the Na⁺-coupled neutral amino acid transporter 2 in the cerebral cortex. *Neuroscience* 140: 281-92

- Miesenbock G, De Angelis DA, Rothman JE. 1998. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* 394: 192-95
- Miles R, Wong RK. 1986. Excitatory synaptic interactions between CA3 neurones in the guinea-pig hippocampus. *The Journal of Physiology* 373: 397-418
- Miller PS, Aricescu AR. 2014. Crystal structure of a human GABAA receptor. *Nature* 512: 270-75
- Miller TM, Heuser JE. 1984. Endocytosis of synaptic vesicle membrane at the frog neuromuscular junction. *The Journal of Cell Biology* 98: 685-98
- Minelli A, Brecha N, Karschin C, DeBiasi S, Conti F. 1995. GAT-1, a high-affinity GABA plasma membrane transporter, is localized to neurons and astroglia in the cerebral cortex. *The Journal of Neuroscience* 15: 7734-46
- Minelli A, DeBiasi S, Brecha NC, Vitellaro Zuccarello L, Conti F. 1996. GAT-3, a High-Affinity GABA Plasma Membrane Transporter, Is Localized to Astrocytic Processes, and It Is Not Confined to the Vicinity of GABAergic Synapses in the Cerebral Cortex. *The Journal of Neuroscience* 16: 6255-64
- Mishima T, Fujiwara T, Sanada M, Kofuji T, Kanai-Azuma M, Akagawa K. 2014. Syntaxin 1B, but Not Syntaxin 1A, Is Necessary for the Regulation of Synaptic Vesicle Exocytosis and of the Readily Releasable Pool at Central Synapses. *PLoS ONE* 9: e90004
- Mitchell SJ, Ryan TA. 2004. Syntaxin-1A is excluded from recycling synaptic vesicles at nerve terminals. *Journal of Neuroscience* 24: 4884-88
- Miyoshi G, Hjerling-Leffler J, Karayannis T, Sousa VH, Butt SJB, et al. 2010. Genetic fate mapping reveals that the caudal ganglionic eminence produces a large and diverse population of superficial cortical interneurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30: 1582-94
- Mody I, Pearce RA. 2004. Diversity of inhibitory neurotransmission through GABAA receptors. *Trends in Neurosciences* 27: 569-75
- Mohrmann R, de Wit H, Verhage M, Neher E, Sørensen JB. 2010. Fast Vesicle Fusion in Living Cells Requires at Least Three SNARE Complexes. *Science* 330: 502-05
- Molteni R, Ying Z, Gomez-Pinilla F. 2002. Differential effects of acute and chronic exercise on plasticity-related genes in the rat hippocampus revealed by microarray. *European Journal of Neuroscience* 16: 1107-16
- Moser EI, Moser M-B. 2013. Grid Cells and Neural Coding in High-End Cortices. *Neuron* 80: 765-74
- Müllner FE, Wierenga CJ, Bonhoeffer T. 2015. Precision of Inhibition: Dendritic Inhibition by Individual GABAergic Synapses on Hippocampal Pyramidal Cells Is Confined in Space and Time. *Neuron* 87: 576-89
- Murthy VN, Schikorski T, Stevens CF, Zhu Y. 2001. Inactivity Produces Increases in Neurotransmitter Release and Synapse Size. *Neuron* 32: 673-82
- Murthy VN, Sejnowski TJ, Stevens CF. 1997. Heterogeneous Release Properties of Visualized Individual Hippocampal Synapses. *Neuron* 18: 599-612

- Murthy VN, Stevens CF. 1998. Synaptic vesicles retain their identity through the endocytic cycle. *Nature* 392: 497-501
- Murthy VN, Stevens CF. 1999. Reversal of synaptic vesicle docking at central synapses. *Nat Neurosci* 2: 503-07
- Neher E. 2010. What is Rate-Limiting During Sustained Synaptic Activity: Vesicle Supply or the Availability of Release Sites. *Frontiers in Synaptic Neuroscience* 2
- Neves G, Cooke SF, Bliss TVP. 2008. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nature reviews. Neuroscience* 9: 65-75
- Nicholson-Fish Jessica C, Kokotos Alexandros C, Gillingwater Thomas H, Smillie Karen J, Cousin Michael A. 2015. VAMP4 Is an Essential Cargo Molecule for Activity-Dependent Bulk Endocytosis. *Neuron* 88: 973-84
- Nicholson-Fish JC, Smillie KJ, Cousin MA. 2016. Monitoring activity-dependent bulk endocytosis with the genetically-encoded reporter VAMP4-pHluorin. *Journal of Neuroscience Methods* 266: 1-10
- Nieouillon A, Canolle B, Masméjean F, Guillet B, Pisano P, Lortet S. 2006. The neuronal excitatory amino acid transporter EAAC1/EAAT3: does it represent a major actor at the brain excitatory synapse? *Journal of Neurochemistry* 98: 1007-18
- Norenberg MD, Martinez-Hernandez A. 1979. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Research* 161: 303-10
- Nusser Z, Sieghart W, Somogyi P. 1998. Segregation of Different GABA_A Receptors to Synaptic and Extrasynaptic Membranes of Cerebellar Granule Cells. *The Journal of Neuroscience* 18: 1693-703
- O'Keefe J. 1979. A review of the hippocampal place cells. *Prog Neurobiol* 13
- O'Keefe J, Dostrovsky J. 1971. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res* 34
- Opazo F, Punge A, Bückers J, Hoopmann P, Kastrup L, et al. 2010. Limited Intermixing of Synaptic Vesicle Components upon Vesicle Recycling. *Traffic* 11: 800-12
- Orenbuch A, Shalev L, Marra V, Sinai I, Lavy Y, et al. 2012. Synapsin Selectively Controls the Mobility of Resting Pool Vesicles at Hippocampal Terminals. *Journal of Neuroscience* 32: 3969-80
- Otis TS, Jahr CE. 1998. Anion Currents and Predicted Glutamate Flux through a Neuronal Glutamate Transporter. *The Journal of Neuroscience* 18: 7099-110
- Pan ZZ. 2014. Transcriptional control of Gad2. *Transcription* 3: 68-72
- Pang ZP, Shin O-H, Meyer AC, Rosenmund C, Südhof TC. 2006. A Gain-of-Function Mutation in Synaptotagmin-1 Reveals a Critical Role of Ca²⁺-Dependent Soluble N-Ethylmaleimide-Sensitive Factor Attachment Protein Receptor Complex Binding in Synaptic Exocytosis. *The Journal of Neuroscience* 26: 12556-65
- Park H, Li Y, Tsien RW. 2012. Influence of Synaptic Vesicle Position on Release Probability and Exocytotic Fusion Mode. *Science* 335: 1362-66

- Parra P, Gulyás AI, Miles R. 1998. How Many Subtypes of Inhibitory Cells in the Hippocampus? *Neuron* 20: 983-93
- Parsons RL, Calupca MA, Merriam LA, Prior C. 1999. Empty Synaptic Vesicles Recycle and Undergo Exocytosis at Vesamicol-Treated Motor Nerve Terminals. *Journal of Neurophysiology* 81: 2696-700
- Patel AB, de Graaf RA, Martin DL, Battaglioli G, Behar KL. 2006. Evidence that GAD(65) mediates increased GABA synthesis during intense neuronal activity in vivo. *Journal of Neurochemistry* 97: 385-96
- Petilla G, Ascoli GA, Alonso-Nanclares L, Anderson SA, Barrionuevo G, et al. 2008. Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nature reviews. Neuroscience* 9: 557-68
- Petr GT, Sun Y, Frederick NM, Zhou Y, Dhamne SC, et al. 2015. Conditional Deletion of the Glutamate Transporter GLT-1 Reveals That Astrocytic GLT-1 Protects against Fatal Epilepsy While Neuronal GLT-1 Contributes Significantly to Glutamate Uptake into Synaptosomes. *The Journal of Neuroscience* 35: 5187-201
- Poisbeau P, Cheney MC, Browning MD, Mody I. 1999. Modulation of Synaptic GABA_A Receptor Function by PKA and PKC in Adult Hippocampal Neurons. *The Journal of Neuroscience* 19: 674-83
- Poncer J-C, McKinney RA, Gähwiler BH, Thompson SM. 1997. Either N- or P-type Calcium Channels Mediate GABA Release at Distinct Hippocampal Inhibitory Synapses. *Neuron* 18: 463-72
- Pouille F, Scanziani M. 2001. Enforcement of Temporal Fidelity in Pyramidal Cells by Somatic Feed-Forward Inhibition. *Science* 293: 1159-63
- Pow DV, Sullivan RKP, Williams SM, Scott HL, Dodd PR, Finkelstein D. 2005. Differential expression of the GABA transporters GAT-1 and GAT-3 in brains of rats, cats, monkeys and humans. *Cell and Tissue Research* 320: 379-92
- Quick MW. 2002. Substrates regulate γ -aminobutyric acid transporters in a syntaxin 1A-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 5686-91
- Quick MW, Hu J, Wang D, Zhang H-Y. 2004. Regulation of a γ -Aminobutyric Acid Transporter by Reciprocal Tyrosine and Serine Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 279: 15961-67
- Radian R, Kanner BI. 1983. Stoichiometry of sodium- and chloride-coupled γ -aminobutyric acid transport by synaptic plasma membrane vesicles isolated from rat brain. *Biochemistry* 22: 1236-41
- Rathore SS, Bend EG, Yu H, Hammarlund M, Jorgensen EM, Shen J. 2010. Syntaxin N-terminal peptide motif is an initiation factor for the assembly of the SNARE–Sec1/Munc18 membrane fusion complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 22399-406
- Ratnayaka A, Marra V, Branco T, Staras K. 2011. Extrasynaptic vesicle recycling in mature hippocampal neurons. *Nature Communications* 2

- Ratnayaka A, Marra V, Bush D, Burden JJ, Branco T, Staras K. 2012. Recruitment of resting vesicles into recycling pools supports NMDA receptor-dependent synaptic potentiation in cultured hippocampal neurons. *The Journal of Physiology* 590: 1585-97
- Reim K, Mansour M, Varoqueaux F, McMahon HT, Südhof TC, et al. 2001. Complexins Regulate a Late Step in Ca²⁺-Dependent Neurotransmitter Release. *Cell* 104: 71-81
- Reyes N, Ginter C, Boudker O. 2009. Transport mechanism of a bacterial homologue of glutamate transporters. *Nature* 462: 880-85
- Ribak CE, Tong WMY, Brecha NC. 1996. GABA plasma membrane transporters, GAT - 1 and GAT - 3, display different distributions in the rat hippocampus. *Journal of Comparative Neurology* 367: 595-606
- Richards DA, Guatimosim C, Betz WJ. 2000. Two Endocytic Recycling Routes Selectively Fill Two Vesicle Pools in Frog Motor Nerve Terminals. *Neuron* 27: 551-59
- Richards DA, Guatimosim C, Rizzoli SO, Betz WJ. 2003. Synaptic Vesicle Pools at the Frog Neuromuscular Junction. *Neuron* 39: 529-41
- Rizo J, Rosenmund C. 2008. Synaptic vesicle fusion. *Nature structural & molecular biology* 15: 665-74
- Rizo J, Südhof TC. 2012. The Membrane Fusion Enigma: SNAREs, Sec1/Munc18 Proteins, and Their Accomplices-Guilty as Charged? In *Annual Review of Cell and Developmental Biology, Vol 28*, ed. R Schekman, pp. 279-308. Palo Alto: Annual Reviews
- Rizzoli SO. 2014. Synaptic vesicle recycling: steps and principles. *The EMBO Journal* 33: 788-822
- Rizzoli SO, Betz WJ. 2005. Synaptic vesicle pools. *Nat Rev Neurosci* 6: 57-69
- Roos A, Boron WF. 1981. Intracellular pH. *Physiological Reviews* 61: 296-434
- Rose T, Schoenenberger P, Jezek K, Oertner Thomas G. 2013. Developmental Refinement of Vesicle Cycling at Schaffer Collateral Synapses. *Neuron* 77: 1109-21
- Rosenmund C, Stevens CF. 1996. Definition of the Readily Releasable Pool of Vesicles at Hippocampal Synapses. *Neuron* 16: 1197-207
- Rost BR, Nicholson P, Ahnert-Hilger G, Rummel A, Rosenmund C, et al. 2011. Activation of metabotropic GABA receptors increases the energy barrier for vesicle fusion. *Journal of Cell Science* 124: 3066-73
- Rost BR, Schneider F, Grauel MK, Wozny C, G Bentz C, et al. 2015. Optogenetic acidification of synaptic vesicles and lysosomes. *Nat Neurosci* 18: 1845-52
- Rothstein JD, Martin L, Levey AI, Dykes-Hoberg M, Jin L, et al. 1994. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 13: 713-25
- Rowland DC, Roudi Y, Moser M-B, Moser EI. 2015. Ten Years of Grid Cells. *Annual Review of Neuroscience* 39: 1-22
- Rudolph S, Tsai M-C, von Gersdorff H, Wadiche JI. 2015. The ubiquitous nature of multivesicular release. *Trends in neurosciences* 38: 428-38

- Rudy B, Fishell G, Lee S, Hjerling - Leffler J. 2011. Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Developmental Neurobiology* 71: 45-61
- Ryan TA, Reuter H, Wendland B, Schweizer FE, Tsien RW, Smith SJ. 1993. THE KINETICS OF SYNAPTIC VESICLE RECYCLING MEASURED AT SINGLE PRESYNAPTIC BOUTONS. *Neuron* 11: 713-24
- Sagné C, El Mestikawy S, Isambert M-F, Hamon M, Henry J-P, et al. 1997. Cloning of a functional vesicular GABA and glycine transporter by screening of genome databases 1. *FEBS Letters* 417: 177-83
- Saheki Y, De Camilli P. 2012. Synaptic Vesicle Endocytosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4
- Sakaba T, Neher E. 2003. Direct modulation of synaptic vesicle priming by GABAB receptor activation at a glutamatergic synapse. *Nature* 424: 775-78
- Sankaranarayanan S, Ryan TA. 2000. Real-time measurements of vesicle-SNARE recycling in synapses of the central nervous system. *Nat Cell Biol* 2: 197-204
- Santos MS, Park CK, Foss SM, Li H, Voglmaier SM. 2013. Sorting of the Vesicular GABA Transporter to Functional Vesicle Pools by an Atypical Dileucine-like Motif. *Journal of Neuroscience* 33: 10634-46
- Sato K, Ernstrom GG, Watanabe S, Weimer RM, Chen C-H, et al. 2009. Differential requirements for clathrin in receptor-mediated endocytosis and maintenance of synaptic vesicle pools. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 1139-44
- Scanziani M. 2000. GABA Spillover Activates Postsynaptic GABAB Receptors to Control Rhythmic Hippocampal Activity. *Neuron* 25: 673-81
- Schikorski T. 2014. Readily releasable vesicles recycle at the active zone of hippocampal synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111: 5415-20
- Schikorski T, Stevens CF. 1997. Quantitative Ultrastructural Analysis of Hippocampal Excitatory Synapses. *The Journal of Neuroscience* 17: 5858-67
- Schikorski T, Stevens CF. 2001. Morphological correlates of functionally defined synaptic vesicle populations. *Nat Neurosci* 4: 391-95
- Schmitt A, Asan E, Püschel B, Jöns T, Kugler P. 1996. Expression of the glutamate transporter GLT1 in neural cells of the rat central nervous system: Non-radioactive in situ hybridization and comparative immunocytochemistry. *Neuroscience* 71: 989-1004
- Schneggenburger R, Meyer AC, Neher E. 1999. Released Fraction and Total Size of a Pool of Immediately Available Transmitter Quanta at a Calyx Synapse. *Neuron* 23: 399-409
- Schoch S, Deák F, Königstorfer A, Mozhayeva M, Sara Y, et al. 2001. SNARE Function Analyzed in Synaptobrevin/VAMP Knockout Mice. *Science* 294: 1117-22
- Schuler V, Lüscher C, Blanchet C, Klix N, Sansig G, et al. 2001. Epilepsy, Hyperalgesia, Impaired Memory, and Loss of Pre- and Postsynaptic GABAB Responses in Mice Lacking GABAB(1). *Neuron* 31: 47-58

- Scimemi A. 2014. Plasticity of GABA transporters: an unconventional route to shape inhibitory synaptic transmission. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8
- Scimemi A, Tian H, Diamond JS. 2009. Neuronal transporters regulate glutamate clearance, NMDA receptor activation and synaptic plasticity in the hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29: 14581-95
- Scott D, Roy S. 2012. α -Synuclein Inhibits Intersynaptic Vesicle Mobility and Maintains Recycling-Pool Homeostasis. *The Journal of Neuroscience* 32: 10129-35
- Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM, Silver RA. 2004. Tonicly active GABA_A receptors: modulating gain and maintaining the tone. *Trends in Neurosciences* 27: 262-69
- Sepkuty JP, Cohen AS, Eccles C, Rafiq A, Behar K, et al. 2002. A Neuronal Glutamate Transporter Contributes to Neurotransmitter GABA Synthesis and Epilepsy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22: 6372-79
- Shank RP, Bennett GS, Freytag SO, Campbell GL. 1985. Pyruvate carboxylase: an astrocyte-specific enzyme implicated in the replenishment of amino acid neurotransmitter pools. *Brain Research* 329: 364-67
- Sharma M, Burré J, Bronk P, Zhang Y, Xu W, Südhof TC. 2012. CSP α knockout causes neurodegeneration by impairing SNAP-25 function. *The EMBO Journal* 31: 829-41
- Sharma M, Burre J, Südhof TC. 2011. CSP[alpha] promotes SNARE-complex assembly by chaperoning SNAP-25 during synaptic activity. *Nat Cell Biol* 13: 30-39
- Shashidharan P, Huntley GW, Murray JM, Buku A, Moran T, et al. 1997. Immunohistochemical localization of the neuron-specific glutamate transporter EAAC1 (EAAT3) in rat brain and spinal cord revealed by a novel monoclonal antibody. *Brain Research* 773: 139-48
- Sieghart W, Fuchs K, Tretter V, Ebert V, Jechlinger M, et al. 1999. Structure and subunit composition of GABA_A receptors. *Neurochemistry International* 34: 379-85
- Sieghart W, Sperk G. 2002. Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. *Current Topics In Medicinal Chemistry* 2: 795-816
- Sigel E, Steinmann ME. 2012. Structure, Function, and Modulation of GABA_A Receptors. *Journal of Biological Chemistry* 287: 40224-31
- Sik A, Penttonen M, Ylinen A, Buzsáki G. 1995. Hippocampal CA1 interneurons: an in vivo intracellular labeling study. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15: 6651-65
- Sinha R, Ahmed S, Jahn R, Klingauf J. 2011. Two synaptobrevin molecules are sufficient for vesicle fusion in central nervous system synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 14318-23
- Skak K, Michelsen BK. 1999. The TATA-less rat GAD65 promoter can be activated by Sp1 through non-consensus elements. *Gene* 236: 231-41
- Smith SM, Renden R, von Gersdorff H. 2008. Synaptic vesicle endocytosis: fast and slow modes of membrane retrieval. *Trends in Neurosciences* 31: 559-68

- Soghomonian J-J, Martin DL. 1998. Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? *Trends in Pharmacological Sciences* 19: 500-05
- Solbu Tom T, Bjørkmo M, Berghuis P, Harkany T, Chaudhry Farrukh A. 2010. SAT1, a glutamine transporter, is preferentially expressed in GABAergic neurons. *Frontiers in Neuroanatomy* 4
- Söllner T, Bennett MK, Whiteheart SW, Scheller RH, Rothman JE. 1993. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* 75: 409-18
- Solstad T, Boccara CN, Kropff E, Moser M-BB, Moser EI. 2008. Representation of geometric borders in the entorhinal cortex. *Science (New York, N.Y.)* 322: 1865-68
- Somogyi P, Klausberger T. 2005. Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *The Journal of Physiology* 562: 9-26
- Stafford MM, Brown MN, Mishra P, Stanwood GD, Mathews GC. 2010. Glutamate spillover augments GABA synthesis and release from axodendritic synapses in rat hippocampus. *Hippocampus* 20: 134-44
- Staras K, Branco T. 2010. Sharing vesicles between central presynaptic terminals: implications for synaptic function. *Frontiers in Synaptic Neuroscience* 2
- Staras K, Branco T, Burden JJ, Pozo K, Darcy K, et al. 2010. A Vesicle Superpool Spans Multiple Presynaptic Terminals in Hippocampal Neurons. *Neuron* 66: 37-44
- Stein A, Weber G, Wahl MC, Jahn R. 2009. Helical extension of the neuronal SNARE complex into the membrane. *Nature* 460: 525-28
- Stell BM, Mody I. 2002. Receptors with different affinities mediate phasic and tonic GABA(A) conductances in hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience* 22
- Stevens CF, Sullivan JM. 1998. Regulation of the Readily Releasable Vesicle Pool by Protein Kinase C. *Neuron* 21: 885-93
- Stevens CF, Tsujimoto T. 1995. Estimates for the pool size of releasable quanta at a single central synapse and for the time required to refill the pool. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 846-49
- Stevens CF, Williams JH. 2007. Discharge of the Readily Releasable Pool With Action Potentials at Hippocampal Synapses. *Journal of neurophysiology* 98: 3221-29
- Sudhof TC. 2004. The synaptic vesicle cycle. *Annual Review of Neuroscience* 27: 509-47
- Südhof TC. 2012. The Presynaptic Active Zone. *Neuron* 75: 11-25
- Sun J-Y, Wu X-S, Wu L-G. 2002. Single and multiple vesicle fusion induce different rates of endocytosis at a central synapse. *Nature* 417: 555-59
- Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, Brunger AT. 1998. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4[thinsp]Å resolution. *Nature* 395: 347-53
- Szatkowski M, Barbour B, Attwell D. 1991. The potassium-dependence of excitatory amino acid transport: resolution of a paradox. *Brain Research* 555: 343-45

- Takamori S, Holt M, Stenius K, Lemke EA, Grønborg M, et al. 2006. Molecular Anatomy of a Trafficking Organelle. *Cell* 127: 831-46
- Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, et al. 1997. Epilepsy and Exacerbation of Brain Injury in Mice Lacking the Glutamate Transporter GLT-1. *Science* 276: 1699-702
- Tang J, Maximov A, Shin O-H, Dai H, Rizo J, Südhof TC. 2006. A Complexin/Synaptotagmin 1 Switch Controls Fast Synaptic Vesicle Exocytosis. *Cell* 126: 1175-87
- Tani H, Dulla Chris G, Farzampour Z, Taylor-Weiner A, Huguenard John R, Reimer Richard J. 2014. A Local Glutamate-Glutamine Cycle Sustains Synaptic Excitatory Transmitter Release. *Neuron* 81: 888-900
- Taschenberger H, Woehler A, Neher E. 2016. Superpriming of synaptic vesicles as a common basis for intersynapse variability and modulation of synaptic strength. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113: E4548-E57
- Thomas P, Mortensen M, Hosie AM, Smart TG. 2005. Dynamic mobility of functional GABAA receptors at inhibitory synapses. *Nat Neurosci* 8: 889-97
- Tobaben S, Thakur P, Fernández-Chacón R, Südhof TC, Rettig J, Stahl B. 2001. A Trimeric Protein Complex Functions as a Synaptic Chaperone Machine. *Neuron* 31: 987-99
- Tremblay R, Lee S, Rudy B. 2016. GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits. *Neuron* 91: 260-92
- Tricoire L, Pelkey KA, Daw MI, Sousa VH, Miyoshi G, et al. 2010. Common Origins of Hippocampal Ivy and Nitric Oxide Synthase Expressing Neurogliaform Cells. *The Journal of Neuroscience* 30: 2165-76
- Tricoire L, Pelkey KA, Erkkila BE, Jeffries BW, Yuan X, McBain CJ. 2011. A Blueprint for the Spatiotemporal Origins of Mouse Hippocampal Interneuron Diversity. *The Journal of Neuroscience* 31: 10948-70
- Trigo FF, Marty A, Stell BM. 2008. Axonal GABAA receptors. *European Journal of Neuroscience* 28: 841-48
- Triller A, Cluzaud F, Korn H. 1987. gamma-Aminobutyric acid-containing terminals can be apposed to glycine receptors at central synapses. *The Journal of Cell Biology* 104: 947-56
- Trimble W, Gray T, Elferink L, Wilson M, Scheller R. 1990. Distinct patterns of expression of two VAMP genes within the rat brain. *The Journal of Neuroscience* 10: 1380-87
- Trimbuch T, Rosenmund C. 2016. Should I stop or should I go? The role of complexin in neurotransmitter release. *Nat Rev Neurosci* 17: 118-25
- Trimbuch T, Xu J, Flaherty D, Tomchick DR, Rizo J, Rosenmund C. 2014. Re-examining how complexin inhibits neurotransmitter release. *eLife* 3: e02391
- Tritsch NX, Ding JB, Sabatini BL. 2012. Dopaminergic neurons inhibit striatal output through non-canonical release of GABA. *Nature* 490: 262-66
- Tritsch NX, Oh W-J, Gu C, Sabatini BL. 2014. Midbrain dopamine neurons sustain inhibitory transmission using plasma membrane uptake of GABA, not synthesis. *eLife* 3: e01936

- Tyler WJ, Zhang X-I, Hartman K, Winterer J, Muller W, et al. 2006. BDNF increases release probability and the size of a rapidly recycling vesicle pool within rat hippocampal excitatory synapses. *The Journal of Physiology* 574: 787-803
- van den Bogaart G, Holt MG, Bunt G, Riedel D, Wouters FS, Jahn R. 2010. One SNARE complex is sufficient for membrane fusion. *Nature structural & molecular biology* 17: 358-64
- Vardar G, Chang S, Arancillo M, Wu Y-J, Trimbuch T, Rosenmund C. 2016. Distinct Functions of Syntaxin-1 in Neuronal Maintenance, Synaptic Vesicle Docking, and Fusion in Mouse Neurons. *The Journal of Neuroscience* 36: 7911-24
- Varoqueaux F, Sigler A, Rhee J-S, Brose N, Enk C, et al. 2002. Total arrest of spontaneous and evoked synaptic transmission but normal synaptogenesis in the absence of Munc13-mediated vesicle priming. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 9037-42
- Varoqui H, Zhu H, Yao D, Ming H, Erickson JD. 2000. Cloning and Functional Identification of a Neuronal Glutamine Transporter. *Journal of Biological Chemistry* 275: 4049-54
- Verdoorn TA, Draguhn A, Ymer S, Seeburg PH, Sakmann B. 1990. Functional properties of recombinant rat GABAA receptors depend upon subunit composition. *Neuron* 4: 919-28
- Verhage M, Maia AS, Plomp JJ, Brussaard AB, Heeroma JH, et al. 2000. Synaptic Assembly of the Brain in the Absence of Neurotransmitter Secretion. *Science* 287: 864-69
- Vida I, Bartos M, Jonas P. 2006. Shunting inhibition improves robustness of gamma oscillations in hippocampal interneuron networks by homogenizing firing rates. *Neuron* 49: 107-17
- Waagepetersen HS, Sonnewald U, Gegelashvili G, Larsson OM, Schousboe A. 2001. Metabolic distinction between vesicular and cytosolic GABA in cultured GABAergic neurons using C-13 magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Neuroscience Research* 63: 347-55
- Wadiche JI, Arriza JL, Amara SG, Kavanaugh MP. 1995. Kinetics of a human glutamate transporter. *Neuron* 14: 1019-27
- Wadiche JI, Kavanaugh MP. 1998. Macroscopic and Microscopic Properties of a Cloned Glutamate Transporter/Chloride Channel. *The Journal of Neuroscience* 18: 7650-61
- Wang D, Deken SL, Whitworth TL, Quick MW. 2003. Syntaxin 1A inhibits GABA flux, efflux, and exchange mediated by the rat brain GABA transporter GAT1. *Molecular Pharmacology* 64: 905-13
- Wang D, Quick MW. 2005. Trafficking of the plasma membrane gamma-aminobutyric acid transporter GAT1 - Size and rates of an acutely recycling pool. *Journal of Biological Chemistry* 280: 18703-09
- Washbourne P, Thompson PM, Carta M, Costa ET, Mathews JR, et al. 2002. Genetic ablation of the t-SNARE SNAP-25 distinguishes mechanisms of neuroexocytosis. *Nat Neurosci* 5: 19-26

- Watanabe S, Liu Q, Davis MW, Hollopeter G, Thomas N, et al. 2013a. Ultrafast endocytosis at *Caenorhabditis elegans* neuromuscular junctions. *eLife* 2: e00723
- Watanabe S, Rost BR, Camacho-Perez M, Davis MW, Sohl-Kielczynski B, et al. 2013b. Ultrafast endocytosis at mouse hippocampal synapses. *Nature* 504: 242-47
- Watanabe S, Trimbuch T, Camacho-Pérez M, Rost BR, Brokowski B, et al. 2014. Clathrin regenerates synaptic vesicles from endosomes. *Nature* 515: 228-33
- Waters J, Smith SJ. 2000. Phorbol Esters Potentiate Evoked and Spontaneous Release by Different Presynaptic Mechanisms. *The Journal of Neuroscience* 20: 7863-70
- Waters J, Smith SJ. 2002. Vesicle pool partitioning influences presynaptic diversity and weighting in rat hippocampal synapses. *The Journal of Physiology* 541: 811-23
- Westphal V, Rizzoli SO, Lauterbach MA, Kamin D, Jahn R, Hell SW. 2008. Video-Rate Far-Field Optical Nanoscopy Dissects Synaptic Vesicle Movement. *Science* 320: 246-49
- Whitworth TL, Quick MW. 2001. Substrate-induced regulation of gamma-aminobutyric acid transporter trafficking requires tyrosine phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 276: 42932-37
- Wierenga CJ, Müllner FE, Rinke I, Keck T, Stein V, Bonhoeffer T. 2011. Molecular and Electrophysiological Characterization of GFP-Expressing CA1 Interneurons in GAD65-GFP Mice. *PLoS ONE* 5: e15915
- Wilhelm BG, Mandad S, Truckenbrodt S, Kröhnert K, Schäfer C, et al. 2014. Composition of isolated synaptic boutons reveals the amounts of vesicle trafficking proteins. *Science* 344: 1023-28
- Willeumier K, Pulst SM, Schweizer FE. 2006. Proteasome Inhibition Triggers Activity-Dependent Increase in the Size of the Recycling Vesicle Pool in Cultured Hippocampal Neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26: 11333-41
- Willford SL, Anderson CM, Spencer SR, Eskandari S. 2015. Evidence for a Revised Ion/Substrate Coupling Stoichiometry of GABA Transporters. *The Journal of Membrane Biology* 248: 795-810
- Willig KI, Rizzoli SO, Westphal V, Jahn R, Hell SW. 2006. STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis. *Nature* 440: 935-39
- Wojcik SM, Katsurabayashi S, Guillemin I, Friauf E, Rosenmund C, et al. 2006. A Shared Vesicular Carrier Allows Synaptic Corelease of GABA and Glycine. *Neuron* 50: 575-87
- Wojcik SM, Rhee JS, Herzog E, Sigler A, Jahn R, et al. 2004. An essential role for vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) in postnatal development and control of quantal size. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 7158-63
- Wölfel M, Schneggenburger R. 2003. Presynaptic Capacitance Measurements and Ca²⁺ Uncaging Reveal Submillisecond Exocytosis Kinetics and Characterize the Ca²⁺ Sensitivity of Vesicle Pool Depletion at a Fast CNS Synapse. *The Journal of Neuroscience* 23: 7059-68

- Wu H, Jin Y, Buddhala C, Osterhaus G, Cohen E, et al. 2007. Role of glutamate decarboxylase (GAD) isoform, GAD65, in GABA synthesis and transport into synaptic vesicles— Evidence from GAD65-knockout mice studies. *Brain Research* 1154: 80-83
- Wu W, Wu L-G. 2007. Rapid bulk endocytosis and its kinetics of fission pore closure at a central synapse. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 10234-39
- Wu W, Xu J, Wu X-S, Wu L-G. 2005. Activity-dependent acceleration of endocytosis at a central synapse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25: 11676-83
- Wu X-S, Wu L-G. 2009. Rapid Endocytosis Does Not Recycle Vesicles within the Readily Releasable Pool. *The Journal of Neuroscience* 29: 11038-42
- Xu CJ, Zhang WH, Rondard P, Pin JP, Liu JF. 2014. Complex GABA(B) receptor complexes: how to generate multiple functionally distinct units from a single receptor. *Frontiers in Pharmacology* 5
- Yamashita T, Hige T, Takahashi T. 2005. Vesicle Endocytosis Requires Dynamin-Dependent GTP Hydrolysis at a Fast CNS Synapse. *Science* 307: 124-27
- Yan X-X, Cariaga WA, Ribak CE. 1997. Immunoreactivity for GABA plasma membrane transporter, GAT-1, in the developing rat cerebral cortex: transient presence in the somata of neocortical and hippocampal neurons. *Developmental Brain Research* 99: 1-19
- Yu ACH, Drejer J, Hertz L, Schousboe A. 1983. Pyruvate Carboxylase Activity in Primary Cultures of Astrocytes and Neurons. *Journal of Neurochemistry* 41: 1484-87
- Yu Y-X, Shen L, Xia P, Tang Y-W, Bao L, Pei G. 2006. Syntaxin 1A promotes the endocytic sorting of EAAC1 leading to inhibition of glutamate transport. *Journal of Cell Science* 119: 3776-87
- Zeilhofer H, Studler B, Arabadzisz D, Schweizer C, Ahmadi S, et al. 2005. Glycinergic neurons expressing enhanced green fluorescent protein in bacterial artificial chromosome transgenic mice. *Journal of Comparative Neurology* 482: 123-41
- Zerangue N, Kavanaugh MP. 1996. Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature* 383: 634-37
- Zhang Q, Cao Y-Q, Tsien RW. 2007. Quantum dots provide an optical signal specific to full collapse fusion of synaptic vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 17843-48
- Zhang Q, Li Y, Tsien RW. 2009. The Dynamic Control of Kiss-And-Run and Vesicular Reuse Probed with Single Nanoparticles. *Science* 323: 1448-53
- Zhou Q, Petersen CCH, Nicoll RA. 2000. Effects of reduced vesicular filling on synaptic transmission in rat hippocampal neurones. *The Journal of Physiology* 525: 195-206
- Zhou Y, Danbolt NC. 2013. GABA and Glutamate Transporters in Brain. *Frontiers in Endocrinology* 4: 165
- Zhu Y, Fei J, Schwarz W. 2005. Expression and transport function of the glutamate transporter EAAC1 in *Xenopus* oocytes is regulated by syntaxin 1A. *Journal of Neuroscience Research* 79: 503-08

- Zhu Y, Xu J, Heinemann SF. 2009. Two Pathways of Synaptic Vesicle Retrieval Revealed by Single-Vesicle Imaging. *Neuron* 61: 397-411
- Zucker RS, Regehr WG. 2002. Short-Term Synaptic Plasticity. *Annual Review of Physiology* 64: 355-405

Résumé

Les interneurons GABAergiques dans l'hippocampe forment de petites populations diverses de neurones inhibiteurs contrôlant le transfert d'informations dans de larges ensembles de cellules principales. Ils compensent leur infériorité numérique par de vastes arborisations axonales capables de maintenir une libération vésiculaire de GABA à haute fréquence, et d'ajuster précisément la balance entre excitation et inhibition pour différents régimes d'activité du réseau. Les petites synapses centrales contiennent un nombre limité de vésicules synaptiques dont le recyclage par endocytose est essentiel au maintien de la transmission pendant une activité répétée. Le remplissage en GABA de ces vésicules recyclées est dépendant d'un approvisionnement des terminaisons en GABA suffisant pour faire face à la demande de recyclage créée par l'activité. Nos résultats mettent en évidence de nouveaux mécanismes d'adaptation de l'approvisionnement aux besoins imposés par le recyclage vésiculaire selon le régime d'activité, ainsi qu'un couplage direct entre le cycle de neurotransmetteurs et le cycle vésiculaire. Nous montrons que les transporteurs de glutamine sont responsables d'une potentialisation de l'approvisionnement des varicosités en GABA lors d'une activité répétée, probablement par une augmentation du nombre de ces transporteurs à la membrane. En développant et en utilisant des paradigmes expérimentaux nouveaux, nous montrons que la régulation métabolique du cycle vésiculaire passe par une adaptation du pool de vésicules recyclantes à la disponibilité en neurotransmetteurs. La nature du senseur de cette régulation et sa localisation cytosolique ou luminale restent à déterminer.

Mots Clés

Synapse, GABA, transporteur, recyclage vésiculaire, électrophysiologie, imagerie

Abstract

In the hippocampus, GABAergic interneurons represent only 10% of the neuronal population but are able to synchronize the activity of large neuronal networks. They compensate their numerical inferiority by a large axonal arborization to sustain synaptic activity at high frequency and adjust the balance between excitation and inhibition for different regime of activity. Since small central synapses contain a limited pool of vesicles, their recycling by endocytosis is essential to maintain transmission during repeated activity. The filling of recycling vesicles with GABA is dependent on its supply in terminals which should be adjusted to the demand imposed by vesicular recycling. Our results reveal new transporter mechanisms that adapt GABA supply to neuron activity, suggesting a direct coupling between the neurotransmitter and the vesicle cycles. We show that high recycling activity increases GABA supply, probably by increasing the number of glutamine transporters at the membrane. By developing and using FM5-95 and VGAT-pHluorin with a new experimental paradigm, we provide evidence for a metabolic regulation of the vesicle cycle that involves a dynamic adaptation of the recycling pool to the neurotransmitter availability. The nature of the sensor of this regulation and its cytosolic or luminal location remain to be determined.

Keywords

Synapse, GABA, transporter, vesicle recycling, electrophysiology, imagery