Caractérisation et intérêt thérapeutique de potentialisateurs du co-transporteur potassium-chlorure de type 2 (KCC2) dans les épilepsies du lobe temporal

Florian Donneger

▶ **To cite this version:**

Florian Donneger. Caractérisation et intérêt thérapeutique de potentialisateurs du co-transporteur potassium-chlorure de type 2 (KCC2) dans les épilepsies du lobe temporal. Neurosciences [q-bio.NC]. Sorbonne Université, 2022. Français. NNT : 2022SORUS273 . tel-03863657

HAL Id: tel-03863657
https://theses.hal.science/tel-03863657

Submitted on 21 Nov 2022

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.

Sorbonne Université

Ecole doctorale n°158

Cerveau Cognition Comportement

Institut du Fer à Moulin

Equipe « Plasticité des réseaux corticaux et épilepsie »

Caractérisation et intérêt thérapeutique de potentialisateurs du co-transporteur potassium-chlorure de type 2 (KCC2) dans les épilepsies du lobe temporal

Par **Florian Donneger**

Thèse de doctorat de Neurosciences

Dirigée par Dr Jean-Christophe Poncer

Présentée et soutenue publiquement le 9 septembre 2022

Devant un jury composé de :

Dr. Sandrine Betuing	Présidente du jury
Dr. Yves De Koninck	Rapporteur
Dr. Vincent Magloire	Rapporteur
Dr. Elena Dossi	Examinatrice
Dr. Stéphane Auvin	Examinateur
Dr. Jean-Christophe Poncer	Directeur de thèse

Except where otherwise noted, this work is licensed under
http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/

Résumé

Dans les neurones, les co-transporteurs cation-chlorure (CCCs) tels que le co-transporteur potassium-chlorure de type 2 (KCC2) et le co-transporteur sodium-potassium-chlorure de type 1 (NKCC1), contrôlent l'homéostasie intraneuronale des ions chlorure et, par conséquent, l'efficacité et la polarité de la signalisation synaptique par l'acide gamma-aminobutyrique (GABA). Dans de nombreuses affections neurologiques dont l'épilepsie, une réduction de l'expression ou de la fonction de KCC2 peut conduire à une signalisation GABAergique dépolarisante et paradoxalement excitatrice, et ainsi contribuer à l'émergence d'activités pathologiques et de crises. Compenser la dérégulation de la fonction des CCCs dans la pathologie apparaît donc comme une stratégie thérapeutique prometteuse. Le bumétanide, un antagoniste du transporteur NKCC1, ne parvient pas à prévenir les crises néonatales aiguës lors d'essais cliniques et au contraire induit des effets secondaires tels qu'une ototoxicité. En revanche, deux composés – la prochlorperazine (PCPZ) et le CLP257 – récemment identifiés par criblage de banques de petites molécules et proposés comme potentialisateurs de KCC2, semblent améliorer les symptômes dans différents modèles animaux d'affections associées à une perte d'expression de KCC2. Cependant, leur mode d'action dans les neurones corticaux et leur potentiel thérapeutique dans l'épilepsie restent inconnus, voire controversés. Au cours de ma thèse, j'ai tout d'abord comparé le mode d'action de ces composés dans des neurones hippocampiques de rat et mis en évidence que tous deux améliorent la fonction de KCC2. Cet effet s'accompagne pour le CLP257 d'une modulation allostérique positive des récepteurs $GABA_A$ extrasynaptiques. De façon intéressante, ces deux composés réduisent la diffusion latérale de KCC2 à la membrane plasmique et augmentent l'agrégation du transporteur, sans modifier son expression totale ou membranaire, ni le niveau de phosphorylation de ses résidus canoniques. J'ai alors mis en évidence que ces deux composés suppriment efficacement les décharges spontanées de type interictal, enregistrées *in vitro* dans le tissu hippocampique postopératoire réséqué de patients souffrant d'épilepsie du lobe temporal (ELT). De plus, l'administration chronique de PCPZ permet de réduire l'apparition de crises et la fréquence des événements épileptiformes dans un modèle souris d'ELT. Mes résultats décryptent donc le mode d'action de deux candidats potentialisateurs de KCC2 dans des neurones hippocampiques et démontrent pour la première fois leur potentiel antiépileptique dans une épilepsie pharmacorésistante.

Abstract

In neurons, cation-chloride cotransporters (CCCs), such as the potassium-chloride cotransporter type 2 (KCC2) and the sodium-potassium-chloride cotransporter type 1 (NKCC1), control intraneuronal chloride ion homeostasis and, subsequently, the efficiency and polarity of gamma-aminobutyric acid (GABA) synaptic signaling. In many neurological disorders, including epilepsy, reduced KCC2 expression or function may result in depolarizing and paradoxically excitatory GABA signaling that may then contribute to pathological activities and seizures. Compensating for the dysregulation of CCC function in the pathology therefore appears as a promising therapeutic strategy. Bumetanide, an antagonist of the NKCC1 transporter, failed to prevent acute neonatal seizures in clinical trials and instead induced side effects such as ototoxicity. Instead, two compounds - prochlorperazine (PCPZ) and CLP257 – recently identified from library screening as candidate KCC2 enhancers, appear to improve symptoms in several animal models of disorders associated with KCC2 suppression. However, their mode of action in cortical neurons and their therapeutic potential in epilepsy remain unknown or even controversial. During my thesis, I first compared the mode of action of these two compounds in rat hippocampal neurons and showed that both of them enhance KCC2 function. This effect was accompanied for CLP257 by a positive allosteric modulation of extrasynaptic $GABA_A$ receptors. Interestingly, both compounds reduce the lateral diffusion of KCC2 in the plasma membrane and increases its clustering, without altering its total or membrane expression or the phosphorylation level of its canonical residues. I then demonstrated that both compounds effectively suppress spontaneous interictal-like discharges recorded in postoperative hippocampal tissue resected from intractable, mesial temporal lobe epilepsy (mTLE) patients. Furthermore, chronic administration of PCPZ reduced seizure onset and the frequency of epileptiform events in a mouse model of mTLE. My results thus decipher the mode of action of two candidate KCC2 enhancers in hippocampal neurons and demonstrate for the first time their antiepileptic potential in pharmacoresistant epilepsy.

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier chaleureusement les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail : Yves De Koninck, Vincent Magloire, Elena Dossi, Stéphane Auvin et Sandrine Betuing. J'ai hâte de vous présenter les résultats obtenus au cours ma thèse et d'en discuter avec vous le 9 septembre.

Je tiens également à remercier Corentin Le Magueresse, Alexandre Mourot, Fabrice Wendling et Michel Le Van Quyen pour avoir fait partie de mon comité de suivi de thèse. Votre bienveillance, vos encouragements et vos précieux retours m'ont motivé tout au long de ces années et ont vraiment été indispensables à l'avancée de ce projet.

Merci à la Fondation pour la Recherche Médicale qui a financé ma 4ème année de thèse (FDT202106013286) et qui m'a permis de finir ce travail de recherche sereinement.

Cette partie remerciement ne serait rien sans un immense merci pour toi Jean-Christophe ! Merci de m'avoir fait confiance et d'avoir cru en moi dès le début de mon stage de M2. Ces 4 ans et demi furent intenses : beaucoup de travail, d'émotions, de doutes, de galères et d'échecs, mais aussi beaucoup de réussite et de moments inoubliables. Comme tu me l'as si souvent dit « c'est ça la thèse mon petit gars ». Cette thèse n'aurait jamais été possible sans ton aide, tes précieux conseils, ton souci du détail, ton écoute, ta patience, tes encouragements et ton soutien dans les moments plus difficiles. Je suis extrêmement fier de tout ce qu'on a réussi à faire ensemble et j'ai toujours eu un profond respect pour ta façon de travailler et de voir les choses. J'ai vraiment eu de la chance de faire cette thèse avec toi et j'espère que l'on continuera à échanger et à travailler ensemble par la suite ! Je vais partir du labo avec tout ce que tu m'as transmis, et ne t'inquiète pas je n'oublierai pas de mesurer l'osmolarité des solutions ni de passer un coup de fil plutôt que d'envoyer un mail…

Merci aussi à toi Sabine ! Même si nos échanges n'ont pas été si nombreux que ça au cours de ma thèse, ton expertise sur certaines techniques, ainsi que ton expérience de recherche ont grandement aidé à faire avancer ce projet. Je garderai aussi en tête le fameux barbecue chez toi avec toute l'équipe, qui a fait un bien fou à tout le monde après la période Covid.

Je souhaite remercier de nombreuses personnes dans l'équipe, mais je me dois de commencer par remercier celles sans qui cette thèse aurait été bien différente et beaucoup plus difficile : Marion et Étienne. Merci Marion pour ton aide au labo, pour ton soutien quotidien, pour nos séances de potins, pour le gouffre économique du thaï chaque semaine. Heureusement que l'on se soutenait pendant les fameux « mardis de la poisse » ! Ah oui et encore désolé pour le coup de l'étagère, mais c'est ça de planter beaucoup trop de choux, de tomates et de carottes… Merci Étienne pour ton soutien, pour ton aide si précieuse sur plein de manips et pour nos délires bien à nous (et les fous rires associés). Heureusement que tu étais là pendant toutes ces années ! Si j'ai réussi à garder la motivation et le moral, c'est en grande partie grâce à toi ! Rien de tel qu'une soirée chez JC, un petit tour au ter ter St Charles, un peu de Magic Saint-Tropez et c'est reparti !

Merci Zaha pour nos discussions quotidiennes et nos petites sessions matchs pendant l'Euro, Claire pour les petites découvertes musicales et ta bonne humeur, Anne-Lise pour ta gentillesse et pour m'avoir fait découvrir la fameuse danse des champis ! Merci Jeremy pour ton aide sur cette fin de thèse. Évite de détruire le labo et de taper tout le monde à mon départ s'il te plaît… Tu sais qu'une petite bougie ça permet toujours de détendre l'atmosphère. Merci Marianne pour ta gentillesse et ta bienveillance. Bon courage Erwann pour la thèse et à vous aussi Carla et Solen, je suis sûr que ça va très bien se passer pour vous.

Merci Adrien pour ton aide sur la partie *in vivo* du projet. On se souviendra longtemps de nos aventures/galères à Marseille !

Merci aux stagiaires que j'ai eus la chance et le plaisir d'encadrer : Nicolas, Yoness, Rosenn, Benjamine, Mona, Youcef, Estilla, Pauline. Vous avez toutes et tous contribué directement ou indirectement à l'avancée de cette thèse et m'avez énormément apporté tant sur le plan professionnel que personnel. Vous êtes extrêmement doué(e)s et je ne me fais pas de soucis pour vous pour la suite. Few words in English for you Pauline: you are incredibly talented and you did an amazing work during your internship. I am sure you will succeed in whatever you choose to do next!

Merci aux "anciens" du labo : Marie, Sana, Clémence, Manisha… Marie pour m'avoir tant appris à mon arrivée au labo, pour tes encouragements et nos discussions passionnantes. Sana pour ta bonne humeur contagieuse, ton soutien et ton aide si précieuse avec la biochimie. Clémence pour ta présence et nos petites discussions régulières. Manisha for your kindness and your help with Matlab.

J'ai eu la chance de faire ma thèse au sein de l'environnement « familial » et bienveillant que représente l'IFM. Merci Jean-Antoine pour ton accueil au sein de cet institut et pour tes gentils retours après les progress report. Thank you Fiona for your support and your kindness!

Merci Mythili pour ton aide avec le microscope et pour cette douceur et gentillesse qui te caractérisent tant. Merci Anne pour tes précieux conseils en biochimie, c'était toujours un plaisir de venir te voir pour te poser plein de questions. Merci aussi à l'ensemble du personnel de l'animalerie, du pôle administratif ou de la laverie pour votre travail et votre aide.

J'ai également une pensée toute particulière pour mes collègues enseignants de l'institut : Sophie et Richard. C'était toujours un plaisir de vous croiser et de discuter un peu avec vous de tout et de rien ! Merci Richard pour m'avoir montré comment donner de superbes TPs !

Merci Célia, Billel et Donia pour nos petites discussions de temps en temps et pour votre soutien. Bon courage pour la fin de votre thèse !

Merci aussi aux personnes que j'ai eues plaisir à rencontrer par le biais de collaborations. Merci Antoine pour nous avoir formés, Adrien et moi, à l'implantation de sondes ECoG. Thank you Jinwei for your warm welcome when I arrived in Exeter and for everything you taught me about the immunoprecipitation experiment. I really had a great time discovering this beautiful city, its cathedral and its Christmas market. Merci Aurélie, Louis et Théo pour nos échanges et ce travail fructueux qu'on a produit ensemble.

Au cours de ma thèse, j'ai également donné des enseignements à Sorbonne Université. Cette expérience était vraiment incroyable et ce magnifique métier va énormément me manquer ! Merci à l'ensemble de mes collègues enseignants et au personnel des plateformes techniques qui était toujours là pour aider les petits chargés d'enseignement (moi inclus) en détresse. Un grand merci aussi à tous les étudiants que j'ai pu rencontrer au cours de ces 3 ans et dont j'ai eu plaisir à suivre l'avancée et les progrès.

Qui dit Sorbonne Université dit IBPS, et j'ai forcément une pensée pour toi Stéphanie. Merci de m'avoir fait découvrir le monde de la recherche en M1, et merci pour tes conseils, ta gentillesse, et ta bienveillance. Merci de m'avoir donné confiance en moi et de m'avoir encouragé à continuer dans ce domaine qui me plaît tant !

Merci à tous mes amis qui ont toujours été là pour moi et qui ont très bien compris à quel point cette thèse me demandait du temps et de l'énergie.

Merci Damien d'être là pour moi et de m'avoir encouragé et soutenu depuis si longtemps. Elle est loin cette époque où l'on stressait pour les révisions du bac ! Nos discussions, sorties et moments détente sur WoW n'ont pas de prix. Si j'en suis là où j'en suis aujourd'hui c'est en grande partie grâce à toi, donc merci pour tout !

Merci énormément Julien ! Je n'ai malheureusement pas souvent été disponible ces 4 dernières années, mais tu as toujours très bien compris ce que représentait cette thèse pour moi. Merci pour ton soutien sans faille, pour nos sorties de temps en temps et pour tes encouragements ! J'ai hâte de rendre cette thèse et de fêter ça avec toi !

Merci Alexis, le « bro » de cœur et de thèse. Heureusement qu'on s'est soutenus pendant toutes ces années pas toujours faciles. Personne n'était mieux placé que toi pour comprendre les difficultés, mais aussi les petites victoires du quotidien au labo. Je pense sincèrement que cette thèse n'aurait pas été la même sans toi donc vraiment merci ! Merci aussi à toi Kévin, on peut toujours compter sur toi, ta bonne humeur et ta joie de vivre. Merci pour tous ces moments passés ensemble : les barbecues, les soirées du Nouvel An et nos petites sessions détente (ou prise de tête) à résoudre des énigmes sur différents jeux. Merci Céline, Quentin, Valentin, Adrien, Florent ! C'était toujours la garantie de bons moments lorsque l'on se voyait pour nos escapes game, restos et vacances.

Merci Amina pour ton soutien et tes encouragements dans les moments où j'en avais le plus besoin. Merci pour nos fous rires et tous ces moments passés ensemble. Merci Émeline pour ton aide et ta présence pendant le master. C'était un plaisir de te voir quand tu revenais sur Paris. Bientôt la fin de thèse pour toi aussi !

Merci Sara pour ces petits restos ou balades à Paris qu'on arrivait tant bien que mal à caser dans nos emplois du temps de ministres ! Merci Juliette pour ta présence et ton soutien pendant cette dernière année pas facile. Merci Joachim et Camille pour ces bons souvenirs du master. On ne s'est pas souvent vus ces dernières années, mais j'adorais vous croiser et partager avec vous les avancées et galères de la thèse.

Merci pour tout Chloé. Bien que l'on se soit rencontrés dans un moment vraiment pas facile, tu as toujours été là pour me donner le sourire, me soutenir, m'accompagner et m'encourager. Les moments passés ensemble pendant la rédaction étaient de vraies bouffées d'oxygène et m'ont permis de tenir le coup. J'ai une chance incroyable d'être avec toi.

Je souhaite également remercier ma famille, et en premier lieu mes parents. Merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir soutenu et encouragé sans relâche durant toutes ces années d'études. Je sais que mon rythme de travail pouvait être inquiétant et difficile à comprendre… Malgré cela, vous avez tout fait pour m'accompagner et avez toujours très bien cerné ce que représentait cette thèse pour moi. Merci pour tout ce que vous avez fait, pour ces soirées hors du temps à la Philharmonie et pour nos moments de partage à la maison. J'ai hâte que vous puissiez voir l'ensemble de mon travail !

Merci aussi à mes frères. Merci Aurélien pour ces moments inoubliables au Québec ! C'était vraiment parfait et ça m'a donné toute l'énergie nécessaire pour commencer la thèse. Merci aussi pour toutes nos sorties : concerts, films et autres… autant de moments qui faisaient du bien ! Merci Vincent pour ton soutien et pour nos petites sessions de sport pendant les vacances en Bretagne, qui permettaient de recharger les batteries avant de reprendre le boulot !

Merci aussi à ma tante, mon oncle et mes cousins pour leur soutien et leurs encouragements.

Enfin, j'ai une énorme pensée pour mes grands-parents. J'aurais souhaité du fond de mon cœur que vous puissiez voir ce travail achevé et que vous soyez présent à ma soutenance, mais malheureusement la vie en a décidé autrement. Vous avez toujours été des exemples pour moi dans la vie et m'avez appris à poursuivre mes rêves, à être déterminé, à persévérer et à ne jamais baisser les bras. J'espère que ce modeste travail reflète, ne serait-ce qu'une partie, de toutes les valeurs que vous m'avez transmises.

Sommaire

Résumé **1**
Abstract **2**
Remerciements **3**
Sommaire **8**
Table des figures **14**
Table des tableaux **17**
Liste des abréviations **18**

Introduction **23**

Introduction générale **23**

I. KCC2 : expression, fonction et régulation **26**
I.1- Expression de KCC2 26
I.1.1- La famille des CCCs : présentation et phylogénie 26
I.1.2- Structure moléculaire des CCCs 27
I.1.3- Expression des CCCs 30
I.1.3.1- Expression dans l'organisme 30
I.1.3.2- Expression dans le SNC 32
I.1.3.3- Expression cellulaire et subcellulaire de KCC2 37
I.2- Fonction de KCC2 : rôles canoniques et non canoniques 40
I.2.1- KCC2 et équilibre thermodynamique 40
I.2.2- Homéostasie neuronale des ions chlorure et polarité des réponses GABAergiques 43
I.2.3- Transport d'eau et régulation osmotique dans les neurones 47
I.2.4- Fonctions non canoniques de KCC2 50
I.2.4.1- Synaptogenèse et fonction synaptique 50
I.2.4.2- Excitabilité neuronale 52
I.2.4.3- Autres rôles 53
I.3- Régulations de l'expression, de la stabilité membranaire et de la fonction de KCC2 ... 53
I.3.1- Régulation de l'expression de KCC2 53
I.3.2- Mécanismes de régulation post-traductionnelle de KCC2 56

I.3.2.1- Exocytose, endocytose et dégradation 57
I.3.2.2- Oligomérisation 59
I.3.2.3- Agrégation 61
I.3.2.4- Diffusion latérale 62
I.3.2.5- Phosphorylations 63
I.3.3- Régulation de KCC2 par la transmission synaptique 70
I.3.3.1- Régulation par la transmission excitatrice 70
I.3.3.2- Régulation par la transmission inhibitrice 71
I.3.3.3- Régulation par les récepteurs métabotropiques 72
I.3.4- Régulation de KCC2 par les interactions protéiques 73

II- KCC2 et pathologie 76
II.1- Altération de l'expression et de la fonction de KCC2 dans la pathologie 76
II.1.1 Spasticité et douleur neuropathique 76
II.1.2- Maladies psychiatriques et neurodégénératives 79
II.1.3- Autres pathologies 81
II.2- Epilepsie(s) 82
II.2.1- Définitions et classification des crises et des épilepsies 82
II.2.2- Physiopathologie des épilepsies 87
II.2.3- Mécanismes d'épileptogenèse 88
II.2.3.1- Changements morphologiques et cellulaires 89
II.2.3.2- Modifications transcriptomiques et épigénétiques 93
II.2.3.3- Voies de signalisation 94
II.2.4- Ictogenèse et activités épileptiformes 96
II.2.4.1- Décharges de type interictal (interictal-like discharges, IILDs) 97
II.2.4.2- Décharges de type préictal (PILDs) et ictal (ILDs) 99
II.2.4.3- Oscillations à haute fréquence (HFOs) 101
II.2.5- Diagnostic et examens 102
II.2.6- Traitements antiépileptiques (TAEs) : mécanismes d'action et effets secondaires 107
II.2.6.1- Mécanismes d'action des TAEs 107
II.2.6.2- Effets indésirables des TAEs 113
II.2.7- Épilepsies pharmacorésistantes : quelles solutions et avec quels risques ? 115
II.2.7.1- Résection du foyer épileptique par chirurgie 116
II.2.7.2- Neurostimulation 118
II.2.7.3- Thérapies diététiques 120

II.3- KCC2 et épilepsie 121
II.3.1- Expression de KCC2 et épilepsie 121
II.3.2- Mutations de KCC2 dans l'épilepsie 124
II.3.2.1- Phénotype des modèles animaux KO pour KCC2 124
II.3.2.2- Mutations de KCC2 dans l'épilepsie chez l'homme 125
II.3.3- Existe-t-il un lien causal entre diminution d'expression de KCC2 et épilepsie ? 128

III- Pharmacologie des CCCs 131
III.1- NKCC1 vs KCC2 132
III.1.1- Pharmacologie des inhibiteurs de NKCC1 133
III.1.1.1- Le bumétanide 133
III.1.1.1.1- Potentiel thérapeutique du bumétanide 133
III.1.1.1.1.1- Épilepsie 134
III.1.1.1.1.2- Autisme et schizophrénie 139
III.1.1.1.2- Limites à l'utilisation du bumétanide 140
III.1.1.1.3- Effets « off-target » possibles du bumétanide 144
III.1.1.2- Autres composés ciblant NKCC1 146
III.1.2- Pourquoi cibler KCC2 plutôt que NKCC1 ? 148
III.2- Comment potentialiser la fonction de KCC2 ? 149
III.2.1- Augmenter l'expression génique du transporteur 149
III.2.1.1- Identification des potentialisateurs d'expression de KCC2 (PEKs) 149
III.2.1.2- Potentiel des PEKs dans la pathologie 154
III.2.2- Augmenter la fonction de KCC2 en stabilisant son expression membranaire ... 155
III.2.2.1- Composés ciblant la voie WNK/SPAK/OSR1 156
III.2.2.1.1- Inhibiteurs de WNK1 156
III.2.2.1.2- Inhibiteurs de SPAK/OSR1 159
III.2.2.2- Composés ciblant les récepteurs métabotropiques et la voie PKC/pS940... 162
III.2.2.3- Autres possibilités et limites 165
III.2.3- Identification de nouveaux composés augmentant la fonction de KCC2 165
III.2.3.1- Le CLP257 165
III.2.3.1.1- Identification du CLP257 165
III.2.3.1.2- Controverse sur le CLP257 168
III.2.3.1.3- Effet sur KCC2 et potentiel thérapeutique des CLP257 et CLP290 171
III.2.3.1.3.1- Effet du CLP257 et du CLP290 dans des modèles de douleur et de neuropathie 171
III.2.3.1.3.2- Effet du CLP257 et du CLP290 dans des modèles d'épilepsie 172
III.2.3.1.3.3- Effets du CLP257 et du CLP290 dans d'autres pathologies 173

III.2.3.2- La prochlorpérazine (PCPZ) 177
III.2.3.2.1- Identification de la PCPZ comme potentialisateur de KCC2 177
III.2.3.2.2- La PCPZ : utilisation en clinique 179
III.2.3.2.3- Cibles de la PCPZ 180
III.2.3.2.4- Effets secondaires 181

IV- Rationnel et objectifs du projet 183

Matériel et Méthodes 185

MM.1- Méthodes pour mesurer la fonction de KCC2 185

MM.2- Problématiques liées au marquage et à la quantification de l'expression de KCC2 189

MM.3- Le tissu humain épileptique réséqué : une opportunité unique pour la recherche 191
MM.3.1- Récupération du tissu et conservation 191
MM.3.2- Enregistrement du tissu humain épileptique à l'aide de matrices multi-électrodes (MEA) 193
MM.3.3- Corrélation entre les altérations géniques, cellulaires, protéiques et les activités épileptiformes 196
MM.3.4- Test de nouveaux traitements 197
MM.3.5- Limites à l'utilisation du tissu humain et conclusion 198

MM.4- Modèles animaux d'épilepsie du lobe temporal 199
MM.4.1- Comparaison entre les modèles acide kaïnique et pilocarpine 202
MM.4.1.1- *Status epilepticus* 202
MM.4.1.2- Période latente 204
MM.4.1.3- Phase chronique 205
MM.4.1.4- Altérations neuropathologiques 207
MM.4.2- Choix du modèle ELT pour la thèse et optimisation du protocole 208

Résultats..... 211

Article 1 : KCC2 régule l'homéostasie neuronale des ions Cl^- de manière similaire entre les interneurones à parvalbumine et les cellules pyramidales de l'hippocampe. 211

Article 2 : La géphyrine interagit avec KCC2 et régule l'expression membranaire et la fonction du transporteur dans les neurones corticaux. 230

Article principal: Enhancing KCC2 function prevents epileptiform activity *in vitro* and *in vivo* 251

Abstract..... 252
Introduction 253
Results 255
Discussion..... 261
Methods 266
Primary hippocampal cultures 266
Pharmacology..... 266
Cellular electrophysiology 267
Surface biotinylation..... 268
DNA constructs and transfection 269
Single-particle tracking and analysis 269
Immunocytochemistry 270
Fluorescence image acquisition and analysis..... 270
Immunoprecipitation and immunoblot 271
Kinase profiling assays 273
Human tissue and multi-electrode recordings..... 273
Mouse model of temporal lobe epilepsy and ECoG recordings 274
Immunohistochemistry 275
Statistics 276
Figures 277
References 287

Résultats complémentaires..... 295

RC.I- L'effet du CLP257 et de la PCPZ sur l'agrégation de KCC2 implique-t-il les $GABA_AR$ et la voie WNK/SPAK/OSR1 ? 295

RC.II- Variabilité dans la transition vers la phase chronique et rythmicité de l'activité épileptiforme dans le modèle lithium-pilocarpine d'ELT 300

Discussion 309

I- Mécanismes de potentialisation de KCC2 311
I.1 Potentialisation de KCC2 par le CLP257 311
I.1.1 Hypothèse 1 : implication des $GABA_AR$. 311
I.1.2 Hypothèse 2 : interaction avec d'autres récepteurs ou transporteurs 315
I.2 Potentialisation de KCC2 par la PCPZ 316
I.3 Autres possibilités et conclusion 318

II- Limites à l'utilisation de composés ciblant les partenaires de KCC2 et avantages de cibler directement le transporteur. 319

III- Développement de composés ciblant spécifiquement et directement KCC2 322

IV- Rythmicité d'occurrence des crises et activités épileptiformes : impact sur les approches thérapeutiques 323

Publications supplémentaires 331

Article 3 : KCC2 régule l'excitabilité neuronale et l'activité hippocampique via son interaction avec les canaux Task-3 331

Article 4 : Epilepsie liée à une lipofuscinose neuronale focale : localisation extra-frontale, signatures EEG et implication du GABA 362

Article 5: Ablation thérapeutique ciblée des cellules pathogènes dans l'épilepsie neurodéveloppementale 372

Bibliographie 376

Table des figures

Introduction

Figure 1. CCCs, homéostasie neuronale des ions Cl^- et transmission GABAergique. 24
Figure 2. Phylogénie et structure secondaire des transporteurs de la famille des CCCs. 28
Figure 3. Expression tissulaire des CCCs chez l'humain adulte. 31
Figure 4. Expression cérébrale des CCCs chez l'humain adulte. 35
Figure 5. Localisation cellulaire et subcellulaire de KCC2. 39
Figure 6. Profil développemental de l'expression de KCC2 et polarité de la transmission GABAergique 45
Figure 7. Voies de signalisation régulant l'expression de KCC2. 55
Figure 8. Principaux sites de phosphorylation et de régulation de KCC2. 66
Figure 9. Régulation du trafic membranaire et de la fonction de KCC2 par la diffusion latérale, l'agrégation et l'endocytose/exocytose. 69
Figure 10. Voies de signalisation régulant l'expression, la stabilité membranaire et/ou la fonction de KCC2 73
Figure 11. Partenaires de KCC2 régulant sa stabilité membranaire et/ou sa fonction 74
Figure 12: Classification des crises 84
Figure 13. Classification des syndromes épileptiques 86
Figure 14. Mécanismes d'épileptogenèse 90
Figure 15. Similitudes entre les décharges intericales (IIDs) enregistrées *in vivo* et les décharges de type interictal (IILDs) enregistrées *in vitro*. 98
Figure 16. Similitudes entres les décharges préictales/ictales enregistrées *in vivo* et de type préictal/ictal (PILDs/ILDs) induites *in vitro*. 100
Figure 17. Étapes nécessaires au diagnostic positif d'une épilepsie 106
Figure 18. Mécanismes d'action des traitements antiépileptiques 111
Figure 19. Cibles moléculaires des traitements antiépileptiques 112
Figure 20. Corrélation entre l'expression de KCC2, la polarité de la transmission GABAergique et les activités intericales dans le tissu humain postopératoire in vitro. 123
Figure 21. Mutations de KCC2 dans l'épilepsie 127

Figure 22. Stratégies pour restaurer l'homéostasie neuronale des ions Cl^- dans la pathologie. 131
Figure 23. Limites à l'utilisation du bumétanide dans les affections neurologiques et psychiatriques. 143
Figure 24. Grandes familles de potentialisateurs de l'expression de KCC2 (PEKs) identifiés (d'après Tang et al., 2019). 152
Figure 25. Exemples de voies de signalisation modulées par les PEKs 154
Figure 26. Potentialisateurs vérifiés et hypothétiques de KCC2 ciblant la voie WNK1/SPAK/OSR1 158
Figure 27. Potentialisateurs vérifiés et hypothétiques de KCC2 ciblant la voie PKC/pS940 163
Figure 28. Effets du CLP257 sur $[Cl^-]_i$, KCC2 et E_{GABA} (Gagnon et al., 2013b) 167
Figure 29. Effet de la prochlorperazine (PCPZ) sur la fonction et l'expression de KCC2 (Liabeuf et al., 2017). 178

Matériel et Méthodes

Figure 30. Les IILDs sont associées à des oscillations à haute fréquence (HFOs) dans le tissu réséqué de patients atteints de dysplasie corticale focale (FCD) de type II. 195
Figure 31. Epilepsie du lobe temporale pharmacorésistante : histoire naturelle. 200
Figure 32. Mécanismes d'induction d'épilepsie du lobe temporal (ELT) dans les différents modèles animaux. 201
Figure 33. Comparaison de l'efficacité de deux protocoles d'induction d'épilepsie, basés sur l'injection de pilocarpine (single vs kindling). 209

Résultats

Article principal

Figure 1. PCPZ and CLP257 promote chloride extrusion in hippocampal neurons. 277
Figure 2. CLP257 but not PCPZ modulates $GABA_A$ receptor function. 278
Figure 3. Both PCPZ and CLP257 reduce KCC2 membrane diffusion and promote its clustering in hippocampal neurons. 279
Figure 4. PCPZ and CLP257 do not affect phosphorylation of canonical KCC2 residues. .. 280
Figure 5. PCPZ and CLP257 prevent spontaneous interictal-like discharges in temporal lobe slices from mTLE patients. 281

Figure 6. Chronic PCPZ administration reduces the occurrence of seizures and epileptiform activities in a mouse model of temporal lobe epilepsy. 282

Supplementary fig 1, related to Figure 1. PCPZ is phototoxic. 283
Supplementary fig2, related to Figure 2. Effect of PCPZ and CLP257 on access resistance, input resistance and mIPSC time to peak. 283
Supplementary fig3, related to Figure 2. Eticlopride has no effect on mIPSCs 284
Supplementary fig4, related to Figure 3. PCPZ and CLP257 have no effect on total or membrane NKCC1 expression. 284
Supplementary fig5, related to Figure 3. Eticlopride has no effect on KCC2 clustering. 284
Supplementary fig6, related to Figure 4. PCPZ and CLP257 do not inhibit WNK1, WNK3, SPAK or OSR1 285
Supplementary fig7, related to Figure 5. PCPZ and CLP257 have no effect on the amplitude of remaining IILDs recorded in temporal lobe slices from mTLE patients. 285
Supplementary fig8, related to Figure 6. Markers of epilepsy observed in our lithium-pilocarpine mouse model of temporal lobe epilepsy. 286
Supplementary fig9, related to Figure 6. Chronic administration of PCPZ has no effect on seizure power or duration. 286

Résultats complémentaires

Figure 34. L'effet du CLP257 et de la PCPZ sur l'agrégation de KCC2 implique-t-il les $GABA_AR$ et la voie WNK/SPAK/OSR1 ? 297
Figure 35. L'effet du CLP257 et de la PCPZ sur l'agrégation de KCC2 implique-t-il la voie WNK/SPAK/OSR1 ? 299
Figure 36. Variabilité interindividuelle d'occurrence des crises dans le modèle lithium-pilocarpine d'ELT. 301
Figure 37. Rythmicité circadienne d'occurrence des crises dans un modèle souris lithium-pilocarpine d'ELT 303
Figure 38. Rythmicité circadienne d'occurrence des IIDs dans un modèle souris lithium-pilocarpine d'ELT. 305
Figure 39. Rythmicité circadienne d'occurrence des HFOs dans un modèle souris lithium-pilocarpine d'ELT. 307

Table des tableaux

Tableau 1. Pathologies associées à une altération du ratio d'expression NKCC1/KCC2..... 78
Tableau 2. Résumé des données de la littérature concernant l'effet du CLP257 et du CLP290 sur KCC2 et la pathologie. 176
Tableau 3. Cibles protéiques de la PCPZ. 180

Liste des abréviations

AC	Anhydrase carbonique
aCSF	Liquide cérébrospinal artificiel
ADN	Acide désoxyribonucléique
AE(1-3)	Échangeur d'anion (type 1,2 ou 3)
AK	Adénosine kinase
AMPA	Acide aminométhylphosphonique
AMPAR	Récepteur à l'acide aminométhylphosphonique
APP	Protéine précurseur de l'amyloïde
AP-2	Complexe de protéines adaptatrices 2
ARNm	Acide ribonucléique messager
ASK3	Protéine kinase de type 3 régulée par l'apoptose
ATP	Adénosine triphosphate
AVP	Arginine-vasopressine
BDNF	Facteur neurotrophique dérivé du cerveau
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BN-PAGE	Blue Native PAGE
CA(1-3)	Région 1, 2 ou 3 de la corne d'Ammon
Cbl	Proto-oncogène-b du lymphome de la lignée B Casitas
CCCs	Co-transporteurs cation-chlorure
CCC9	9ème isoforme des co-transporteurs cation-chlorure
CCG	Couche des cellules granulaires
GTC	Généralisées tonico-cloniques
CGRP	Peptide lié au gène calcitonine
CIP	Protéine interagissant avec les CCCs
CKB	Créatine kinase de type cérébral
ClC-2	Canal chlorure 2
CNV	Variantes du nombre de copies
CP	Cellule pyramidale
CPSE	Courant post-synaptique excitateur
CPSI	Courant post-synaptique inhibiteur
CREB	Protéine de liaison à l'élément sensible à l'AMPc
Cryo-EM	Cryo-microscopie électronique
CTD	Domaine carboxy-terminal
DAT	Transporteurs à la dopamine
DBS	Stimulation cérébrale profonde
DIMAEB	Ester N,N-diméthylaminoéthylique du bumétanide
D2R	Récepteurs D2 à la dopamine
E-box	Boite activatrice de transcription
ECoG	Électrocorticographie
EEG	Électroencéphalogramme
EEIP	Encéphalopathie épileptique infantile précoce

E_{GABA}	Potentiel d'inversion du GABA
Egr4	Early growth response 4
EIMFS	Épilepsie infantile avec des crises focales migrantes
ELT	Épilepsie du lobe temporal
EMP	Épilepsies myocloniques progressives
Erk1/2	Kinases 1 et 2 régulées par le signal extracellulaire
ES	Cellules souches embryonnaires
FCD	Dysplasie corticale focale
FDA	Food and Drug Administration
FGFR	Récepteurs aux facteurs de croissance des fibroblastes
FLT3	Récepteur tyrosine kinase de type fms 3
FM	Fibres moussues
FNL	Lipofuscinose neuronale focale
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
$GABA_AR$	Récepteur ionotropique au GABA (type A)
$GABA_BR$	Récepteur métabotropique au GABA (type B)
GABA-T	Acide gamma-aminobutyrique transaminase
GAD	Acide glutamique décarboxylase
Gbz	Gabazine
GFAP	Protéine acide fibrillaire gliale
GLUK2	Sous-unité 2 du récepteur kaïnate
GlyR	Récepteurs de la glycine
GPMV	Vésicules géantes de la membrane plasmique
GSK3β	Glycogène synthase kinase 3 β
HDAC	Histones désacétylases
HEK	Rein embryonnaire humain
HFOs	Oscillations à haute fréquence
HPA	Axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien
HYP	Hypersynchronous onset pattern
H1R	Récepteurs histaminergique de type 1
IC50	Concentration inhibitrice médiane
IGF-1	Facteur de croissance 1 ressemblant à l'insuline
IIDs	Décharges interictales
IILDs	Décharges de type interictal
ILDs	Décharges de type ictal
IL-1R	Récepteur à l'interleukine 1
IL-1β	Interleukine 1β
IL-6	Interleukine 6
IN	Interneurone
IRM	Imagerie par résonance magnétique
JAK	Kinase Janus
KCC(1-4)	Co-transporteur potassium-chlorure (type 1,2,3 ou 4)
KCC2(a,b)	Isoforme A ou B de KCC2
KCNK9	Membre 9 des canaux potassique de la sous-famille K
KI	Invalidation génétique (Knock in)
KO	Invalidation génétique (Knock out)
LCS	Liquide cérébrospinal humain

LPS	Lipopolysaccharides
LVF	Low voltage-fast onset
Mecp2	Protéine de liaison se liant au méthyle CpG (type 2)
mAChRs	Récepteurs muscariniques à l'acétylcholine
MAPK	Protéines kinases activées par les mitogènes
MCD	Malformations du développement cortical
MCT	Transporteurs au monocarboxylate
MEA	Matrice multi-électrodes
miARN	microARN
mIPSCs	Courants miniatures inhibiteurs post-synaptique
MO	Monoamine oxydase
MTF1	Facteur de transcription régulateur des métaux 1
MTOR	Cible de la rapamycine chez les mammifères
MUA	Activité multi-unitaire
mZnR	Récepteurs métabotropiques sensibles au zinc
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NCC	Co-transporteur sodium-chlorure
NEM	N-Ethylmaleimide
NET	Transporteurs à la norepinephrine
Neto2	Protéine Neuropilin et Tolloid Like 2
NeuN	Protéine nucléaire neuronale
NFκB	Nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells
NKCC(1-2)	Co-transporteur sodium-potassium-chlorure (type 1 ou 2)
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NMDAR	Récepteurs au N-méthyl-D-aspartate
NMDG	N-Méthyl-D-Glucamine
NMN	Transporteur aux nicotinamides mononucléotide
NRF2	Facteur nucléaire 2 lié aux érythroïdes
NRSE	Élément silencieux restrictif aux neurones
NRSF	Facteur silencieux restrictif aux neurones
NTD	Domaine N-terminal
nTPM	Nombre de transcrits par million
OAT	Transporteur d'anions organiques
OSR1	Protéine de réponse au stress oxydatif (type 1)
OxT	Ocytocine
OxTR	Récepteur à l'ocytocine
PACSIN1	Protéine 1 du substrat de la caséine kinase dans les neurones
PCPZ	Prochlorperazine
PDE	Phosphodiestérase
PEK	Potentialisateur de l'expression de KCC2
PEST	Séquence Proline/E (glutamate)/Serine/Thréonine
PK(A,C,G)	Protéine kinase A, C ou G
PILDs	Décharges de type préictal
PLC	Phospholipase C
PNI	Lésion des nerfs périphériques
PNN	Filets périneuronaux
PP1	Protéine phosphatase 1

PTZ	Pentylènetétrazole
PV	Parvalbumine
QD-SPT	Suivi de particule unique avec quantum dots
Rab11b	Protéine de liaison 11b associée à Ras
REST	Facteur de transcription d'élément répresseur
RE-1	Site d'éléments répresseur de type 1
RNS	Systèmes de neurostimulation réactive
RTK	Récepteurs tyrosine kinase
RT-PCR	Réaction de polymérisation en chaîne par transcription inverse
RTT	Syndrome de Rett
SCI	Lésion de la moelle épinière
SDH	Corne dorsale de la moelle épinière
SE	*Status epilepticus*
Shc	Protéine de transformation
SNAP23	Protéine 23 associée aux synaptosomes
SNC	Système nerveux central
SNV	Stimulateur du nerf vague
SPAK	Kinase riche en proline-alanine apparentée à Ste20
STAT	Transducteurs de signaux et activateurs de transcription
STC	Scléroses tubéreuses complexes
SV2A	Glycoprotéine 2A de la vésicule synaptique
TAE	Traitement anti-épileptique
Task-3	TWIK-related acid-sensitive K+ channel 3
TGF-β2	Facteur de croissance transformant β2
TLR4	Récepteur de type Toll 4
TM	Segment transmembranaire
TrkB	Récepteur kinase à la tropomyosine de type B
TRPV1	Récepteurs ionotropiques activés par les vanilloïdes
TSS	Site de début de transcription
VGCCs	Canaux calciques dépendants du voltage
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
Vm	Potentiel membranaire de repos
VTA	Aire tegmentale ventrale
WFA	Lectine de *Wisteria floribunda*
WNK(1-4)	Kinase With-No-Lysine (type 1,2,3 ou 4)
WNK-CA	WNK1 constitutivement active
WPC	Semaine de gestation
WS	Syndrome de West
ZnT1	Transporteurs au zinc de type 1
ZT	Zeitgeber time
4-AP	4-aminopyridine
4.1N	Protéine neuronale 4.1
5HT-2AR	Récepteur à la sérotonine de type 2A
α1/2R	Récepteurs alpha-adrénergiques 1 et 2
β-PIX	p21-activated protein kinase exchange factor beta
δ-cat	Delta-caténine

Introduction

Introduction générale

Dans le système nerveux central (SNC), le transfert d'information d'un neurone à l'autre s'effectue au niveau de la synapse. A la suite de l'émission d'un potentiel d'action par le neurone pré-synaptique, un composé chimique, le neurotransmetteur, est libéré dans la fente synaptique. Ce dernier va agir au niveau post-synaptique, en se fixant sur des récepteurs métabotropiques et ionotropiques spécifiques. En fonction de la nature du neurotransmetteur, l'activité du neurone post-synaptique va être potentialisée, ou au contraire inhibée. Dans le SNC mature, le principal neurotransmetteur excitateur est le glutamate, tandis que l'inhibition est majoritairement médiée par le GABA.

Ces neurotransmetteurs vont exercer leur action excitatrice ou inhibitrice en induisant un flux ionique à travers la membrane plasmique. Dans le cas de l'excitation synaptique rapide, le glutamate, en se fixant sur ses récepteurs ionotropiques, va induire l'entrée de cations (Na^+, Ca^{2+}), et ainsi générer un courant post-synaptique excitateur (CPSE). À l'inverse, le GABA va générer un courant post-synaptique inhibiteur (CPSI), en agissant, entre autre, sur les récepteurs ionotropiques de type A ($GABA_AR$), majoritairement perméables aux ions chlorure (Cl^-) (Kaila and Voipio, 1987).

La direction des flux ioniques à travers les récepteurs ionotropiques va dépendre de la relation entre leur potentiel d'inversion (déterminé par le gradient électrochimique de part et d'autre de la membrane), et le potentiel membranaire de repos du neurone (Vm). Dans les neurones, le potentiel d'inversion du GABA (E_{GABA}) est proche du Vm, ce qui signifie que de très faibles variations de concentration en ions Cl^- sont suffisantes pour inverser la direction du flux ionique à travers les $GABA_AR$. Ainsi, le contrôle de l'homéostasie neuronale des ions Cl^- est essentiel pour maintenir l'action hyperpolarisante du GABA (Farrant and Kaila, 2007). Cette homéostasie est assurée principalement par deux co-transporteurs cation-chlorure : NKCC1 et KCC2. Ces derniers utilisent, en conditions basales, les gradients de Na^+ et K^+ générés par la Na^+/K^+ ATPase pour faire entrer ou sortir des ions Cl^- respectivement (Gamba, 2005; Kahle et al., 2008) (Figure 1).

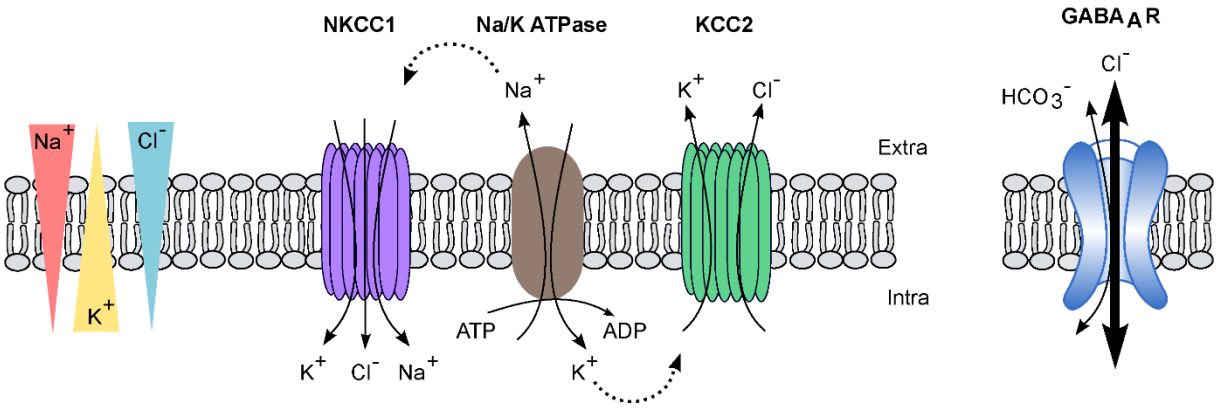


Figure 1. CCCs, homéostasie neuronale des ions Cl^- et transmission GABAergique.

NKCC1 charge la cellule en ions Cl^- en utilisant le gradient de Na^+ généré par la Na^+/K^+ ATPase tandis que KCC2 extrude ces ions en utilisant le gradient de K^+. Étant donné que les $GABA_AR$ sont majoritairement perméables aux ions Cl^-, la polarité des réponses GABAergiques et l'efficacité de l'inhibition dépendent de l'homéostasie neuronale des ions Cl^- et donc de l'activité de KCC2 et NKCC1.

Des modifications du niveau d'expression de KCC2 sont observées, au sein du cerveau mature, dans de nombreuses maladies neurologiques et psychiatriques, telles que les épilepsies (Huberfeld et al., 2007a; Muñoz et al., 2007a), la douleur neuropathique (Coull et al., 2003a), la spasticité à la suite de lésions de la moelle épinière (Boulenguez et al., 2010a; Payne et al., 2003), les troubles du spectre autistique (Duarte et al., 2013a; Tang et al., 2016a) ou encore la schizophrénie (Arion and Lewis, 2011; Hyde et al., 2011a). Dans ces pathologies, une diminution de l'expression de KCC2 semble être à l'origine d'une altération de la transmission GABAergique, qui pourrait avoir une action dépolarisante excitatrice et ainsi promouvoir l'émergence d'activités pathologiques (Cohen et al., 2002a; Coull et al., 2003a; Huberfeld et al., 2007a; Muñoz et al., 2007a). Cette altération du niveau d'expression de KCC2 est notamment observée dans les épilepsies du lobe temporal (ELT) (Huberfeld et al., 2007a), qui sont les formes les plus fréquentes d'épilepsies pharmacorésistantes. En effet, environ 70% des patients atteints d'ELT ne répondent pas à au moins deux antiépileptiques appropriés (Pittau et al., 2009a; Sànchez et al., 2014a). À l'heure actuelle, ces patients n'ont d'autres choix que de subir une cortectomie, au cours de laquelle le foyer épileptique est réséqué. À la suite de cette chirurgie, 80% des patients sont libres de crises pendant plus d'un an (Lowe et al., 2004a; Téllez-Zenteno et al., 2005a). Cependant, l'effet de la chirurgie sur le long terme est limité (de Tisi et al., 2011a), et celle-ci peut être associée à des effets secondaires négatifs majeurs, tels que des déficits de mémoire ou de langage (Duchowny and Bhatia, 2014a). Le traitement de ce type d'épilepsie constitue donc un problème de santé majeur et la recherche d'une alternative thérapeutique est essentielle.

Étant donné la forte corrélation entre l'altération de l'homéostasie des ions Cl^- et l'épilepsie, une stratégie possible pour réduire l'occurrence d'activités pathologiques consisterait à rétablir cette homéostasie, en réduisant notamment la concentration intracellulaire en ions Cl^-. Pour cela, une première approche consisterait à bloquer NKCC1, à l'aide de diurétiques, tels que le bumétanide. Cependant, ce composé passe difficilement la barrière hématoencéphalique (Brandt et al., 2010a; Cohen et al., 1976a) et peut induire des effets secondaires via son action en périphérie (Greenberg, 2000). Une autre stratégie, consisterait, non pas à cibler NKCC1, mais à favoriser la stabilité membranaire et à potentialiser la fonction de KCC2, un co-transporteur spécifiquement exprimé dans les neurones.

En revanche, deux composés – la prochlorperazine (PCPZ) et le CLP257 – récemment identifiés par criblage de banques de petites molécules et proposés comme potentialisateurs de KCC2, semblent améliorer les symptômes dans différents modèles animaux d'affections associées à une perte d'expression de KCC2.

Récemment, deux composés – la prochlorperazine (PCPZ) (Liabeuf et al., 2017) et le CLP257 (Gagnon et al., 2013a) – ont été identifiés par criblage de banques de petites molécules. Ces composés ont été suggérés comme potentialisateurs de KCC2 et semblent améliorer les symptômes dans différents modèles animaux d'affections associées à une perte d'expression de KCC2 (Chen et al., 2017a; Ferrini et al., 2017; Gagnon et al., 2013a; Liabeuf et al., 2017). Toutefois, le mode d'action de ces composés dans les neurones reste inconnu, voir débattu dans le cas du CLP257 (Cardarelli et al., 2017), et leur potentiel effet thérapeutique dans l'épilepsie reste à étudier.

Au cours de ma thèse, j'ai tout d'abord caractérisé l'effet et le mode d'action de ces composés dans des neurones *in vitro*, en étudiant en détail leur effet sur la fonction, l'expression, l'agrégation, la diffusion et le niveau de phosphorylation de KCC2. Par la suite, j'ai testé le potentiel thérapeutique de ces composés, en explorant leur impact sur l'émergence d'activités épileptiformes, enregistrées dans du tissu humain épileptique ou dans un modèle souris d'épilepsie. Avant de présenter mes résultats sous forme d'un article scientifique, j'introduirai I) KCC2, son expression, ses fonctions et ses mécanismes de régulation, II) les altérations d'expression et de fonction du transporteur observées dans différentes pathologies, dont l'épilepsie, et III) l'intérêt de cibler ce co-transporteur plutôt que NKCC1 dans la pathologie ; ainsi que les différentes approches envisageables pour augmenter l'expression et/ou la fonction de KCC2.

I. KCC2 : expression, fonction et régulation

I.1- Expression de KCC2

I.1.1- La famille des CCCs : présentation et phylogénie

KCC2 appartient à la grande famille des CCCs, codés par les gènes *SLC12A1-9*. Les membres de cette famille ont tout d'abord été identifiés au niveau moléculaire chez les poissons (Gamba et al., 1993; Xu et al., 1994), puis chez les mammifères (Gamba et al., 1994; Payne et al., 1996), avant que des homologues ne soient trouvés dans d'autres branches du vivant : crustacés, insectes, nématodes (Sun et al., 2010; Tanis et al., 2009a), plantes (Colmenero-Flores et al., 2007), champignons et bactéries (Kaplan et al., 1996). Chez les vertébrés, la famille des CCCs comprends neuf membres (Gamba, 2005), dont sept codent pour des transporteurs exprimés à la membrane plasmique (Gamba et al., 1993; Gillen et al., 1996; Hartmann and Nothwang, 2015; Hiki et al., 1999; Mercado et al., 2004; Payne et al., 1996). Les CCCs sont exprimés dans tous les organes et jouent des rôles cruciaux dans de nombreux processus physiologiques (voir I.1.3.1). Dans le SNC, une attention toute particulière a été portée à ces transporteurs étant donné leur rôle clé dans la régulation de l'homéostasie neuronale des ions Cl^- et la polarité des réponses GABAergiques qui en découle (voir I.2.2). Tous les CCCs co-transportent des ions Na^+ et/ou K^+ avec des ions Cl^-, en respectant la stœchiométrie d'un cation pour un ion Cl^-. Cela signifie que ces transporteurs sont électroneutres, car ils n'induisent aucun flux net de charges à travers la membrane. Enfin, tous les CCCs sont des transporteurs actifs secondaires, puisqu'ils transportent des ions Cl^- en utilisant les gradients électrochimiques de Na^+ et/ou K^+ générés par le transport actif primaire de la Na^+/K^+-ATPase.

La famille des CCCs est divisée en quatre branches, en fonction de leurs propriétés de transport, mais aussi de leur homologie de séquence (Alvarez-Leefmans and Delpire, 2010; Arroyo et al., 2013; Gagnon and Delpire, 2013; Gamba, 2005) (Figure 2A). La première inclut les deux co-transporteurs $Na^+/K^+/2Cl^-$ NKCC1 et NKCC2, et le co-transporteur Na^+/Cl^- NCC, qui partagent 50% d'homologie de séquence. La seconde inclut les quatre co-transporteurs couplés au K^+/Cl^- : KCC1, KCC2, KCC3 et KCC4, qui partagent 67% d'homologie de séquence. La troisième branche comprend le transporteur CCC9 codé par le gène *SLC12A8*.

Enfin, la dernière branche comprend une protéine interagissant avec les CCCs (CIP) : CIP1, codé par le gène *SLC12A9*. Ces deux derniers membres ont des caractéristiques fonctionnelles moins bien définies. Une étude récente suggère que *SLC12A8* code pour un transporteur aux nicotinamides mononucléotide (NMN) (Grozio et al., 2019), mais cette découverte reste encore vivement débattue (Grozio et al., 2019; Schmidt and Brenner, 2019). Cependant, étant donné l'effet d'un variant de CCC9 (CCC9A) sur le transport de polyamines dans des cellules de rein embryonnaire humain (HEK-293) (Daigle et al., 2009), et le lien entre nicotinamide et flux de polyamines (Kraus et al., 2014; Nikiforov et al., 2015), il est possible que ce transporteur transporte bel et bien des NMN et que ceux-ci aient un effet secondaire sur l'influx de polyamines observé dans l'étude de Daigle et al. *SLC12A9*, quant à lui, ne partage que 22% d'homologie de séquence avec les autres CCCs et code pour CIP1, une protéine qui modifierait l'activité de transport et la cinétique des CCCs, via la formation d'hétérodimères (Caron et al., 2000).

L'absence d'activité de type CCC et la faible similarité de séquence avec les autres co-transporteurs questionnent l'appartenance de CCC9 et CIP1 à cette famille (Alvarez-Leefmans and Delpire, 2010; Hartmann and Nothwang, 2015). Néanmoins, la position de CIP1 d'un point de vue évolutif au sein du clade des CCCs, avec le partage de certains aspects structuraux (Hartmann et al., 2014), ainsi que l'effet comparable d'un diurétique, le furosémide, sur CCC9 et sur les KCCs et NKCCs (Blaesse et al., 2009; Daigle et al., 2009), renforce l'idée que ces composés peuvent légitimement appartenir à cette famille. La diversité observée et la distribution complexe des CCCs dans les sous-familles et différents taxons du vivant peut être expliquée par les résultats d'analyses phylogénétiques, qui mettent en évidence l'existence d'un seul gène ancestral CCC présent chez les Archées, à partir duquel de nombreux évènements de duplications et de pertes géniques ont eu lieu (Hartmann et al., 2014).

I.1.2- Structure moléculaire des CCCs

Les CCCs sont des glycoprotéines transmembranaires avec un poids moléculaire d'environ 120-200 kDa. Bien qu'ils aient été clonés il y a plus de 20 ans, les structures à haute-résolution de NKCC1 chez l'humain et le poisson zèbre (Chew et al., 2019; Yang et al., 2020; Zhang et al., 2021a), de KCC2 et KCC4 chez la souris (Reid et al., 2020; Zhang et al., 2021a), de KCC1, KCC2, KCC3 et KCC4 chez l'humain (Chi et al., 2021; Liu et al., 2019; Xie et al., 2020; Zhao et al., 2020) n'ont été identifiées que récemment.

Cela a été rendu possible grâce au développement de la microscopie électronique cryogénique (cryo-EM) et au traitement d'images de particules uniques. Les structures secondaires estimées précédemment (Gamba, 2005) ont ainsi été confirmées pour la plupart des CCCs (Figure 2B).

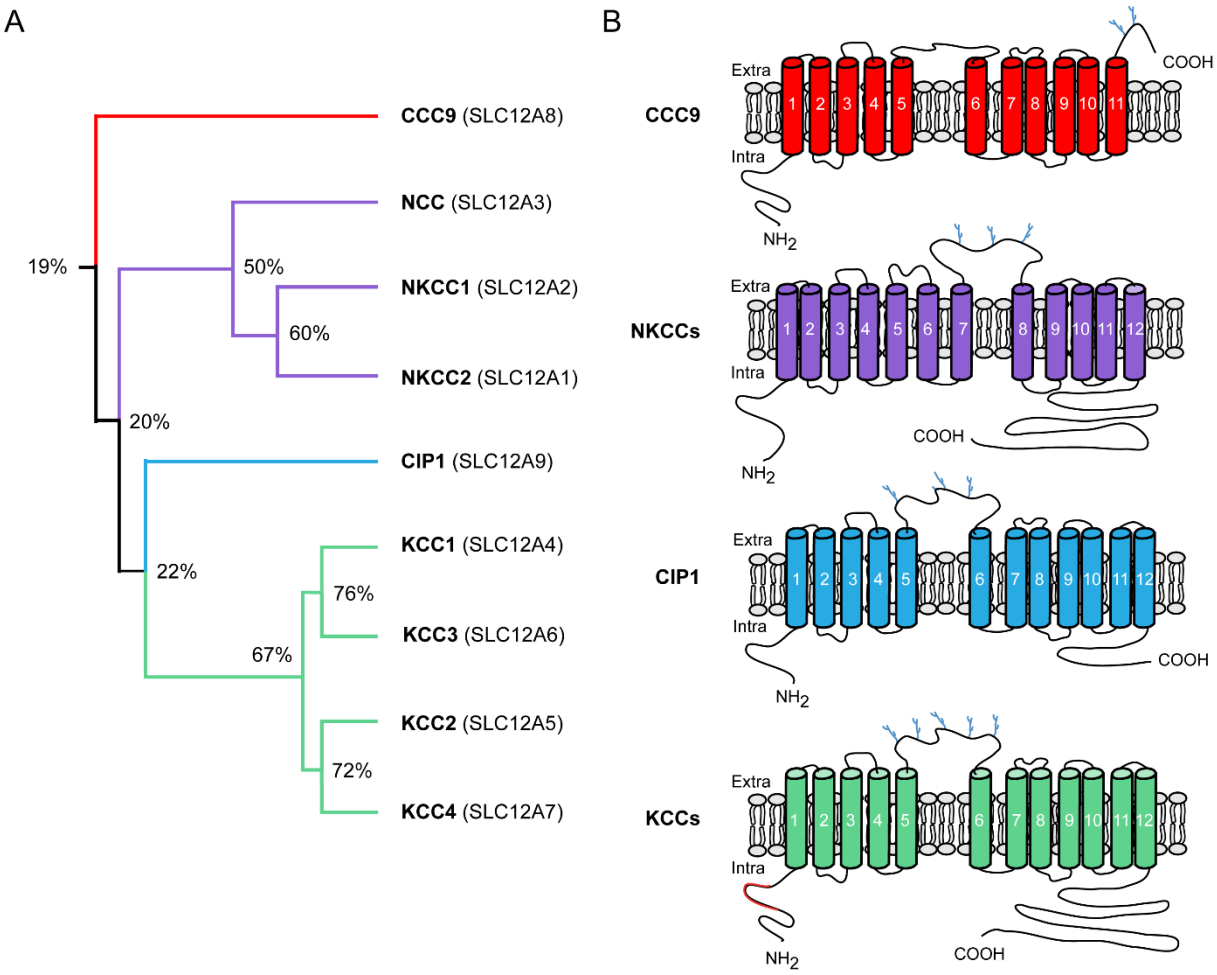


Figure 2. Phylogénie et structure secondaire des transporteurs de la famille des CCCs.

A. Arbre phylogénétique des membres identifiés de la famille des CCCs. Le pourcentage d'homologie de séquence est indiqué au niveau de chaque nœud de l'arbre. **B**. Représentation schématique de la structure secondaire des transporteurs de la famille des CCCs. Les sites de glycosylation sont représentés (bleu) ainsi que la boucle N-terminale auto-inhibitrice présente chez les KCCs (rouge). À noter que les structures de CIP1 et CCC9 ne sont que des estimations, les structures à haute-résolution n'étant pas encore disponibles. Adapté de Gamba, 2005 et Virtanen et al., 2021.

Ils existent ainsi un domaine transmembranaire commun entre KCCs et NKCCs. Celui-ci est constitué de 12 segments transmembranaires (TM), ainsi que 6 boucles extracellulaires et 5 boucles intracellulaires. De plus, il est flanqué de deux domaines intracellulaires hydrophiles : d'un côté un court domaine N-terminal (NTD) et de l'autre un long domaine carboxy-terminal (CTD).

La voie de translocation implique principalement les résidus des TM 1, 3, 6 et 8 (Chew et al., 2021). Le site de liaison du K^+ implique les résidus N133, I134 du TM1, P432 et T435 du TM6 et Y218 du TM3 (selon la numérotation du KCC2 humain ; (Chew et al., 2021)). Le résidu Y218 est d'ailleurs fortement conservé entre les différents NKCC et KCC (Chew et al., 2021).

Deux sites distincts de liaison au Cl^- semblent être présents à la fois chez les KCC et NKCC1. Un directement impliqué dans le transport de Cl^- et un autre qui facilite allostériquement l'occupation du premier. Le site de transport impliquerait les résidus G136, V137 et I138 du TM1 tandis que le site allostérique serait constitué des résidus G436, I437 et M438 du TM6 et Y592 du TM10 (Chew et al., 2021).

Une grande boucle hydrophile connecte TM7 et TM8 chez les NCC et cette même boucle est retrouvée entre les segments transmembranaires TM5 et TM6 chez les KCC. Cette boucle contient de nombreux sites de glycosylation (Hoover et al., 2003) et des résidus cystéines, respectivement essentiels pour l'adressage des transporteurs à la membrane (Weng et al., 2013) et sa fonction (Hartmann et al., 2010a). La résolution en cryo-EM des NTD des CCCs est mauvaise, suggérant une grande flexibilité conformationnelle.

Il est intéressant de noter que les KCCs chez l'humain (Chi et al., 2021; Xie et al., 2020; Zhang et al., 2021a), et KCC2 chez la souris (Zhang et al., 2021a), possèdent une boucle N-terminale de ~25 acides aminés qui bloque l'entrée cytoplasmique du pore de translocation. En accord avec ces observations, la délétion (Chi et al., 2021; Zhang et al., 2021a) ou mutation (Xie et al., 2020) de cette boucle favorise le transport d'ions. Cibler cette boucle pourrait donc constituer un moyen d'augmenter la fonction du transporteur, avec tous les avantages qui en découlent. Enfin, la plupart des CCCs ont tendance à adopter une architecture dimérique, voir oligomérique (voir I.3.2.2). Seule l'oligomérisation de KCC4 reste à confirmer, car même si le transporteur semble être uniquement sous forme monomérique chez la souris (Reid et al., 2020), il est présent sous forme de dimères chez la levure et dans des ovocytes de xénope (Simard et al., 2007a).

L'interface de dimérisation a été caractérisée pour tous les autres KCCs chez l'humain (Liu et al., 2019; Zhao et al., 2020) et NKCC1 chez la drosophile (Chew et al., 2019). Elle serait située au niveau d'une région qui connecte le domaine transmembranaire au CTD de chaque sous-unité.

L'ensemble des connaissances sur la structure moléculaire des transporteurs fournit des informations essentielles pour mieux comprendre comment sont modulées la stabilité, l'expression ou la fonction du transporteur (voir I.3).

I.1.3- Expression des CCCs

I.1.3.1- Expression dans l'organisme

Bien que les CCCs partagent des caractéristiques communes, il est intéressant de se pencher sur la diversité d'expression tissulaire et cellulaire, qui annonce le rôle clé de chaque transporteur dans l'organisme.

Les données sur l'expression des CCCs sont nombreuses, mais sont fréquemment restreintes à des analyses montrant la présence ou non d'acide ribonucléique messager (ARNm). De plus, même si quelques revues essayent de résumer l'ensemble des résultats, il s'agit généralement de listes répertoriant l'expression de chaque transporteur séparément (bien souvent sans faire la distinction entre expression de l'ARNm et de la protéine). Cela ne permet donc pas d'avoir une vue d'ensemble. Dans cette optique, j'ai souhaité, en me basant sur l'atlas des protéines humaines (https://www.proteinatlas.org/), regrouper sous forme d'un schéma les informations sur l'expression des CCCs dans la plupart des tissus de l'organisme (Figure 3).

Cet atlas se concentre sur les profils d'expression des gènes, aussi bien au niveau de l'ARNm que de la protéine, dans le tissu humain adulte. Les données d'expression ARNm proviennent de séquençage d'ARN (ARN-seq) d'échantillons de tissus, tandis que les données d'expression protéique sont issues de marquages immunohistochimiques réalisées sur ces microéchantillons. Les valeurs d'expression d'ARNm sont représentées par une valeur normalisée du nombre de transcrits par million (nTPM), qui représente le nombre de transcrits d'un gène d'intérêt ou d'une isoforme donnée, si le séquençage d'un million de transcrits est effectué. J'ai choisi de façon arbitraire ne pas représenter le niveau d'expression ARNm pour des valeurs inférieures à 5 nTPM, afin de permettre une meilleure représentation et ainsi avoir une idée des régions où s'expriment les différents transporteurs.

Pour les niveaux d'expression protéique, ceux-ci sont considérés comme négatifs, faibles, moyens ou élevés, en fonction des réglages du gain du détecteur utilisés pour l'acquisition de l'image, et en combinaison avec l'aspect visuel de l'image (pour plus d'information, voir https://www.proteinatlas.org/).

J'ai complété les résultats d'expression protéique avec les données de la littérature, pour les tissus ou structures cérébrales de l'atlas où la protéine n'a pas été détectée/ pour lesquels les données ne sont pas disponibles.

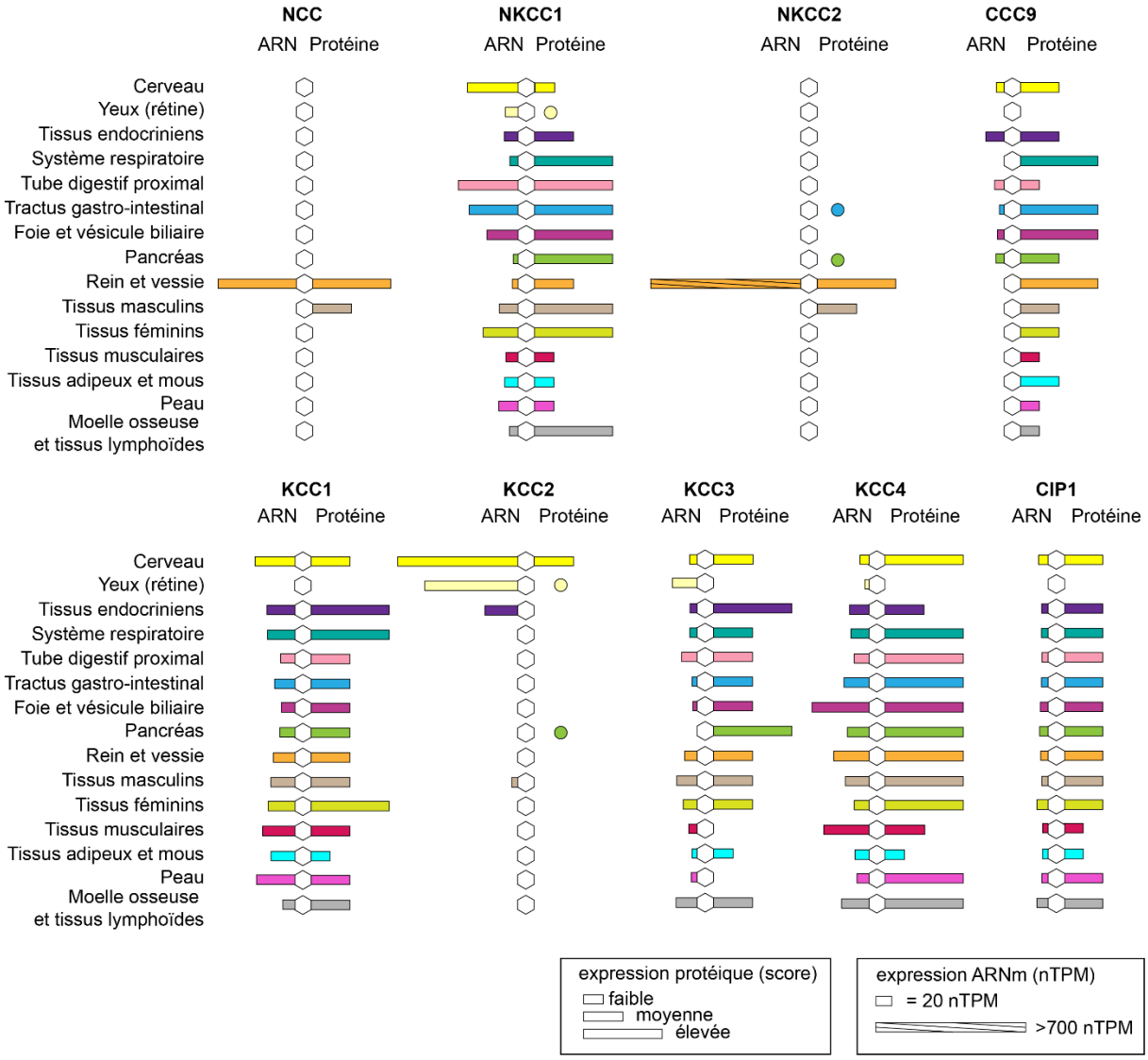


Figure 3. Expression tissulaire des CCCs chez l'humain adulte.

Représentation schématique des niveaux d'expression (ARNm et protéines) des CCCs chez l'humain adulte dans différents tissus de l'organisme. Un cercle est représenté dans le cas où la protéine a été détectée dans cette structure mais dans d'autres études/modèles. nTPM : nombre de transcrits pas millions. Adapté de https://www.proteinatlas.org/ et enrichi avec les données de la littérature.

Ces données, bien qu'issues du tissu humain, reflètent bien les résultats de la plupart des études réalisées sur des modèles rongeurs. De plus, la combinaison des données d'expression ARNm et protéique permet d'avoir une idée précise de la présence ou pas de la protéine dans tel ou tel tissu, ce qui n'est pas certain avec des analyses uniquement basées sur la présence d'ARNm.

Ainsi, on peut voir que NKCC2 et NCC sont majoritairement exprimés dans le rein, où ils sont connus pour jouer un rôle dans la réabsorption de sels (Kahle et al., 2010; Russell, 2000a). Ils sont aussi présents dans le tissu testiculaire, mais leur rôle dans ce tissu reste inconnu. Des études chez les rongeurs ont également montré que NKCC2 est exprimé dans le tractus gastro-intestinal où il favorise l'absorption de Cl^- (Zhu et al., 2011a) et dans le pancréas où il jouerait un rôle dans la sécrétion d'insuline (Alshahrani and Fulvio, 2012).

KCC2 est exprimé quasiment exclusivement dans le cerveau (Karadsheh and Delpire, 2001; Payne et al., 1996; Uvarov et al., 2005; Williams et al., 1999). En effet, une étude a montré l'existence d'une isoforme de KCC2 dans différentes cellules endocrines du pancréas, où elle régule de façon calcium-dépendante la sécrétion d'insuline (Kursan et al., 2017).

Hormis ces trois co-transporteurs, on retrouve les autres CCCs dans presque tous les tissus de l'organisme. Ils jouent ainsi des rôles cruciaux dans de nombreux processus physiologiques essentiels, tels que la régulation du volume cellulaire ou de la pression artérielle, le transport transépithélial d'ions, la sécrétion de potassium, les fonctions rénales, ou encore celles du système auditif (Adragna et al., 2004; Alvarez-Leefmans and Delpire, 2010; Arroyo et al., 2013; Blaesse et al., 2009; Gagnon and Delpire, 2013; Gamba, 2005; Kahle et al., 2008; Payne et al., 2003).

Il est intéressant de noter que les données de l'atlas ne montrent pas d'expression protéique des CCCs dans la rétine alors que les ARNm de la plupart des transporteurs (NKCC1, KCC2, KCC3 et KCC4) sont présents. Cette absence de détection s'explique probablement par les anticorps utilisés, car des protéines NKCC1 et KCC2 sont bien présentes au niveau des cellules de la rétine chez la souris adulte (LI et al., 2008; Vardi et al., 2000; Yin et al., 2020).

L'ensemble de ces données souligne la spécificité d'expression de certains transporteurs, dont KCC2, mais révèle aussi l'expression et l'importance des CCCs dans la plupart des tissus de l'organisme.

I.1.3.2- Expression dans le SNC

Si l'on s'intéresse maintenant à l'expression des CCCs au sein du SNC, on observe que les ARNm de la majorité des transporteurs sont détectés dans l'ensemble des régions cérébrales (Figure 4). Cependant, les niveaux d'expression d'ARNm sont très variables d'une région cérébrale à l'autre et surtout d'un transporteur à l'autre.

On observe ainsi, grâce à leur niveau d'expression, que les deux CCCs principaux du SNC sont NKCC1 et KCC2. Les autres transporteurs ont une très faible expression d'ARNm voir quasi inexistante pour CCC9.

Les données de l'atlas, et celles issues de la littérature, sur l'expression protéique de ces transporteurs dans les différentes régions cérébrales sont incomplètes. Cela peut s'expliquer par le travail extrêmement fastidieux de marquer par immunohistochimie différentes protéines dans plusieurs régions cérébrales et par le fait que les anticorps existants pour certains transporteurs manquent encore de spécificité.

Des protéines de KCC1 sont détectées chez l'humain dans les neurones des ganglions de la base, de l'hippocampe, du cervelet, et dans les neurones et cellules endothéliales du cortex. Une étude chez le rat a aussi montré la présence de KCC1 dans le noyau suprachiasmatique de l'hypothalamus (Belenky et al., 2010). Des données obtenues chez le rat adulte en hybridation *in situ* confirment la présence d'ARNm dans toutes les régions cérébrales.

De plus, la protéine est exprimée aussi bien dans les neurones que dans les cellules non neuronales, telles que les cellules épithéliales du plexus choroïde, les cellules gliales et les cellules épendymaires (Kanaka et al., 2001; Wang et al., 2002). L'expression de ce transporteur dans différents types cellulaires lui permet de maintenir et de réguler le volume cellulaire à grande échelle (Ringel and Plesnila, 2008).

À noter que des différences de niveau d'expression de KCC1 existent entre les sous-types neuronaux. Par exemple, les cellules granulaires de l'hippocampe expriment plus fortement KCC1 que les cellules pyramidales (Kanaka et al., 2001). De la même manière, dans le cervelet, les cellules de la couche granulaire et de la glie de Bergman expriment KCC1 tandis qu'aucune expression n'est détectée dans les cellules de Purkinje (Mikawa et al., 2002). Le rôle spécifique de ce transporteur dans ces sous-types neuronaux reste à identifier.

Enfin, il est intéressant de noter que malgré son expression dans de nombreuses régions du cerveau, des souris présentant une invalidation génétique (KO) pour KCC1 ne présentent pas de phénotype évident (Rust et al., 2007). Cela suggère l'existence de mécanismes de compensation par d'autres KCC ou d'autres co-transporteurs d'ions.

Concernant KCC3, son expression protéique n'a été détectée que dans les neurones des ganglions de la base et dans les neurones et cellules gliales du cortex.

Chez les rongeurs, la protéine a été détectée dans d'autres structures, telles que dans les cellules épithéliales du plexus choroïde, dans certains neurones de l'hippocampe, du cervelet, du tronc cérébral, de l'hypothalamus et de la moelle épinière (Belenky et al., 2010; Pearson et al., 2001). Cependant, la spécificité de l'anticorps reste à prouver, étant donné qu'une autre équipe n'a révélé aucun marquage dans le plexus choroïde avec le même anticorps (Steffensen et al., 2018) et que seule l'étude de Belenky et al., 2010 observe KCC3 dans l'hypothalamus.

De façon originale, et afin d'avoir une information plus précise sur l'expression cellulaire, une étude a combiné immunohistochimie et hybridation *in situ* pour étudier la distribution de l'ARNm de KCC3 dans le SNC. KCC3 est ainsi présent dans les neurones et des sous-population d'interneurones de nombreuses régions cérébrales, ainsi que dans les cellules gliales de la moelle épinière (Shekarabi et al., 2011). De la même manière que KCC1, KCC3 contribuerait à l'homéostasie volumique dans ces différents types cellulaires (Kahle et al., 2015; Ringel and Plesnila, 2008). De plus, l'idée que KCC3 joue un rôle essentiel dans le SNC est renforcée par le fait que le syndrome d'Andermann, une maladie neurodégénérative, est lié à une altération génétique de ce transporteur (Boettger et al., 2003; Gagnon and Delpire, 2013; Howard et al., 2002). De plus, l'invalidation neuronale de l'expression de KCC3 chez la souris induit des désordres neurologiques comparables à ceux observés dans cette affection (Shekarabi et al., 2012).

La protéine KCC4, quant à elle, a été détectée dans les cellules neuronales, les cellules gliales et même les cellules endothéliales de différentes structures cérébrales humaines (ganglions de la base, bulbe rachidien, cortex, cervelet). De plus, KCC4 est aussi détectée dans les neurones de l'hypothalamus chez le rat (Belenky et al., 2010).

Cependant, comme précédemment, aucun phénotype neurologique évident n'a été observé dans des souris n'exprimant pas ce transporteur (Boettger et al., 2002; Rust et al., 2007). Cela est probablement lié à sa faible expression dans le SNC mature. Par conséquent, son rôle reste à ce jour inconnu.

L'expression de CCC9 et CIP1 dans le cerveau humain chez l'adulte n'est confirmée que par la présence de protéines dans certaines régions, les niveaux d'ARNm étant extrêmement faibles, voire inexistants. Des études supplémentaires sont nécessaires pour identifier la distribution d'expression protéique de ces transporteurs dans le cerveau.

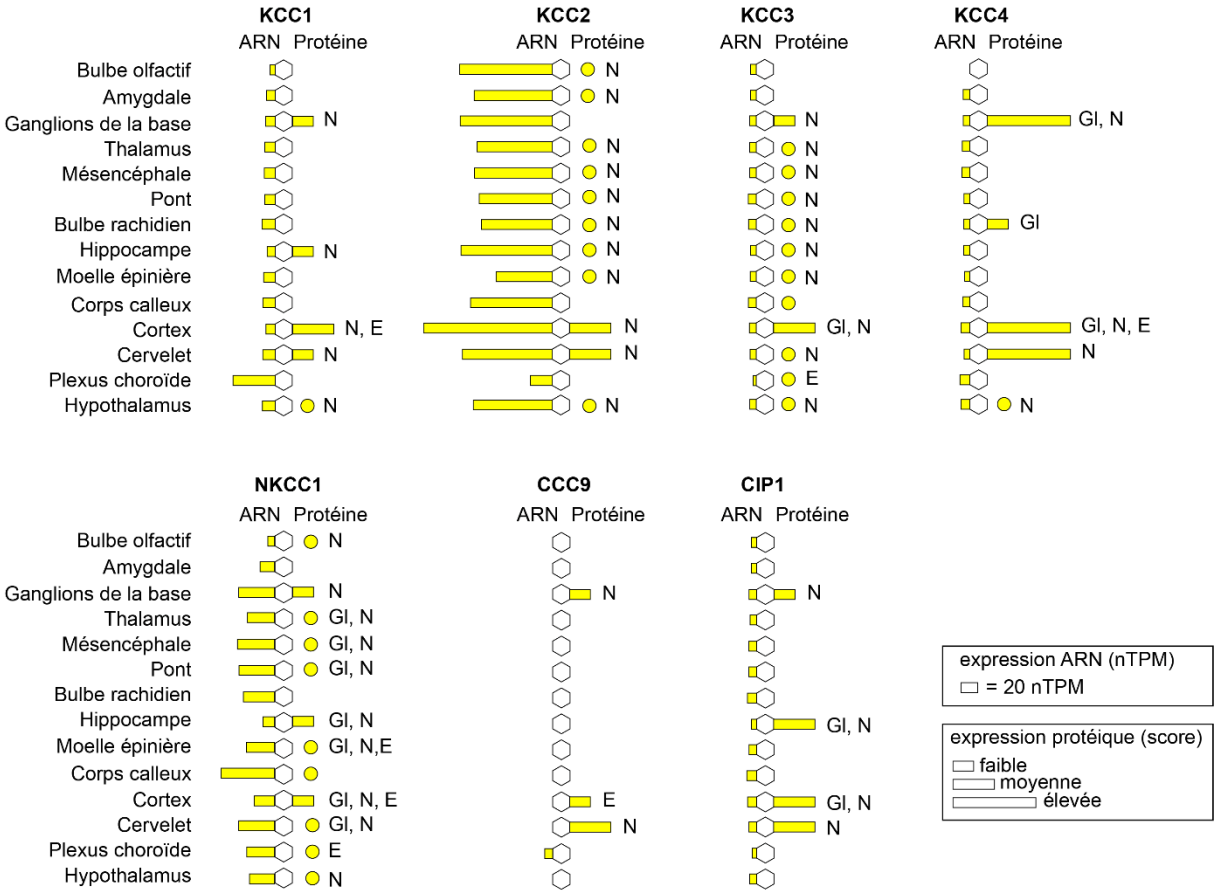


Figure 4. Expression cérébrale des CCCs chez l'humain adulte.

Représentation schématique des niveaux d'expression (ARNm et protéines) des CCCs chez l'humain adulte dans différentes structures du SNC. Un cercle est représenté dans le cas où la protéine a été détectée dans cette structure, mais dans d'autres études/modèles. Le type cellulaire dans lequel la protéine a été détectée est aussi indiqué. Gl : cellules gliales, N : neurones, E, cellules endothéliales. nTPM : nombre de transcrits pas millions. Adapté de https://www.proteinatlas.org/ et enrichi avec les données de la littérature.

Contrairement à ces co-transporteurs, deux transporteurs ont été largement étudiés dans le SNC étant donné leur niveau d'expression et leur rôle majeur dans la régulation de l'homéostasie des ions Cl^- : NKCC1 et KCC2 (voir I.2.2).

NKCC1 est essentiel, car il est le seul transporteur du SNC faisant entrer des ions Cl^-. Cependant, malgré ce rôle essentiel, les données sur l'expression protéique de NKCC1 dans les différentes régions cérébrales sont là encore peu nombreuses. Les données de l'atlas indiquent que la protéine NKCC1 est présente dans les cellules neuronales, gliales et les cellules endothéliales de plusieurs structures. Ces résultats sont complémentaires de travaux effectués sur des modèles rongeurs et répertoriés dans la revue de Virtanen et al., 2020.

Cependant, comme discuté dans cette revue, les données concernant l'ARNm et la protéine NKCC1 restent incohérentes dans de nombreuses études. Par exemple, une étude a observé des protéines de NKCC1 uniquement dans les neurones du cortex cérébral de rat (Plotkin et al., 1997), tandis qu'une autre a également détecté ces protéines dans les astrocytes (Yan et al., 2001). De plus, la plupart des méthodes utilisées pour quantifier les ARNm de NKCC1 (Western-blot, RT-PCR) sont faites sur tissus entiers, ce qui rend impossible la quantification du niveau d'expression pour chaque type cellulaire. Il serait donc nécessaire d'effectuer des analyses unicellulaires de l'ARNm et de la protéine NKCC1 et cela peut être rendu possible par le séquençage des ARNm sur cellules uniques, l'utilisation de protéines endogènes génétiquement marquées ou le développement d'anticorps plus spécifiques.

Comme indiqué précédemment, KCC2 est d'un intérêt tout particulier, car il est fortement exprimé dans le cerveau mature. Cela est confirmé par les données de l'atlas qui montrent une forte expression d'ARNm de KCC2 dans l'ensemble des structures cérébrales. De plus, les données présentées ici et complétées avec celles de la littérature confirment que la protéine KCC2 est détectée dans de nombreuses structures cérébrales, telles que le bulbe olfactif (Gödde et al., 2016), l'amygdale (Goulton et al., 2018), l'hippocampe (Al Awabdh et al., 2022; Goutierre et al., 2019a; Otsu et al., 2020), le thalamus (Barthó et al., 2004), la moelle épinière (Hübner et al., 2001b), le cervelet (Seja et al., 2012) et les régions corticales (Gulyás et al., 2001; Szabadics et al., 2006).

Même si l'expression de KCC2 semble ubiquitaire dans le SNC, des différences de niveau d'expression sont observées parmi les populations neuronales et structures cérébrales. Par exemple, les neurones du noyau réticulé thalamique expriment très peu KCC2 en comparaison aux structures adjacentes (Klein et al., 2018a). De plus, il est important de prendre en compte un aspect essentiel, mais souvent ignoré, qui est qu'il n'existe pas une mais deux isoformes de KCC2 dans le SNC. En effet, le gène codant pour KCC2 (Slc12a5) génère deux ARNm différents : KCC2a et KCC2b, via l'utilisation de promoteurs alternatifs conduisant à deux premiers exons distincts (Uvarov et al., 2007).

La différence entre les deux isoformes se trouve au niveau du NTD, car KCC2a possède 40 acides aminés uniques, incluant une séquence putative de liaison des kinases SPAK (Kinase riche en proline-alanine apparentée à Ste20) et OSR1 (protéine 1 de réponse au stress oxydatif) (delos Heros et al., 2014; Uvarov et al., 2007).

Il est intéressant de noter que ce site de liaison est aussi présent au niveau du NTD d'autres isoformes au sein de la famille des CCCs (Delpire and Gagnon, 2007; Richardson and Alessi, 2008) et qu'il est conservé d'un point de vue évolutif, car présent dans des orthologues de KCC2 chez *Drosophila melanogaster* (Hekmat-Scafe et al., 2006a) et *C. elegans* (Tanis et al., 2009b).

Des différences existent en termes de localisation d'expression de ces isoformes au sein du SNC mais aussi au cours du développement. Ainsi, l'expression protéique de KCC2b augmente dans le cortex et le cervelet au cours des premières semaines postnatales et il est fortement exprimé dans le cerveau adulte (90% de la fraction totale d'ARNm codant pour KCC2), tandis que le niveau d'expression de KCC2a est faible dans le cerveau adulte au niveau du cortex, de l'hippocampe, du thalamus et du cervelet (Uvarov et al., 2007, 2009a). Les deux isoformes sont présentes dans l'hypothalamus immature et mature, dans une majeure partie du tronc cérébral, et dans la moelle épinière (Markkanen et al., 2014).

La majorité des études s'intéressant à l'expression de KCC2 et utilisant des anticorps non spécifiques de KCC2a ou KCC2b chez l'adulte mettent donc en évidence KCC2b dans la plupart des structures.

I.1.3.3- Expression cellulaire et subcellulaire de KCC2

Une autre particularité de KCC2 réside dans le fait qu'il est exprimé uniquement dans les cellules neuronales du SNC. Il est ainsi la seule isoforme KCC à ne pas être exprimé dans la glie (Gagnon et al., 2007; Le Rouzic et al., 2006; Payne et al., 1996) (Figure 5A). Cette expression spécifique dans les neurones est due à la présence d'éléments silencieux restrictifs aux neurones (NRSE) sur la séquence du gène Slc12a5 (Karadsheh and Delpire, 2001; Uvarov et al., 2006, 2005; Yeo et al., 2009). Deux séquences NRSE ont été trouvées dans l'intron 1 du gène (Karadsheh and Delpire, 2001) et dans la région régulatrice en amont (Yeo et al., 2009). La liaison de chaque élément restrictif à un facteur silencieux restrictif aux neurones/un facteur de transcription d'élément répresseur (NRSF/REST) est suffisante pour réprimer la transcription de gènes (Yeo et al., 2009). En plus de ces éléments de régulation négative, deux régions régulatrices positives sont aussi présentes. La liaison du facteur de transcription Egr4 (early growth response 4) au site de liaison Egr (early growth response) active la transcription de KCC2 (Uvarov et al., 2006). De la même manière, l'expression de KCC2 est induite lors de la liaison de facteurs de stimulation (USF1 et 2) aux boites activatrices (E-box) (Markkanen et al., 2008).

L'expression de KCC2 dans les neurones de différentes régions cérébrales est bien connue, mais son expression et son rôle dans les interneurones restent peu étudiés. Une étude a montré que la plupart des sous-types d'interneurones des régions 1 et 3 de la corne d'Ammon (CA1 et CA3) expriment KCC2 (Gulyás et al., 2001). Cependant, le rôle du transporteur dans ces cellules est resté jusqu'à récemment inconnu. Au cours de ma thèse, j'ai confirmé l'expression de KCC2 dans les interneurones à parvalbumine (PV) de CA1. Pour cela, j'ai combiné un marquage de KCC2 et des filets périneuronaux (PNN), chez des souris exprimant le marqueur tomato dans les interneurones PV (Figure 5B). De plus, nous avons mis en évidence des mécanismes similaires de régulation des ions Cl^- entre les interneurones PV et les cellules pyramidales de l'hippocampe (Otsu et al., 2020) (voir I.2.2). KCC2 est aussi exprimé dans les interneurones du striatum (Tapia et al., 2019), du cortex (Herrmann et al., 2022a; Zechel et al., 2016) et du cervelet (Herrmann et al., 2022a) mais son expression et son rôle dans d'autres interneurones du SNC restent encore à déterminer. De plus, aucune étude n'a, à ce jour, identifié laquelle des deux isoformes de KCC2 est majoritairement exprimée dans les interneurones, et si ces isoformes ont un rôle bien précis dans ces sous-types neuronaux.

Au niveau subcellulaire, KCC2 est généralement exprimé au niveau de la membrane plasmique somatodendritique. L'expression membranaire de KCC2 est enrichie à proximité des synapses excitatrices et inhibitrices et dans la tête des épines des neurones hippocampiques (Blaesse et al., 2006a; Chamma et al., 2012; Gauvain et al., 2011; Gulyás et al., 2001; Hübner et al., 2001b) (Figure 5C). On retrouve KCC2 au niveau présynaptique uniquement dans les photorécepteurs en développement (Zhang et al., 2006) et dans les cellules bipolaires de la rétine (Vardi et al., 2000).

De façon intéressante, KCC2 n'est pas exprimé dans l'axone (Chamma et al., 2012; Hübner et al., 2001b; Williams et al., 1999) (Figure 5D), ce qui conduit à une concentration intracellulaire en Cl^- plus importante (Price and Trussell, 2006). Par conséquent, l'activation des $GABA_AR$ axonaux - par diffusion de GABA ou par libération de GABA au niveau des synapses axo-axonale - conduit à une réponse postsynaptique dépolarisante et même excitatrice le long de l'axone (Pugh and Jahr, 2013, 2011; Ruiz et al., 2010; Stell, 2011; Stell et al., 2007).

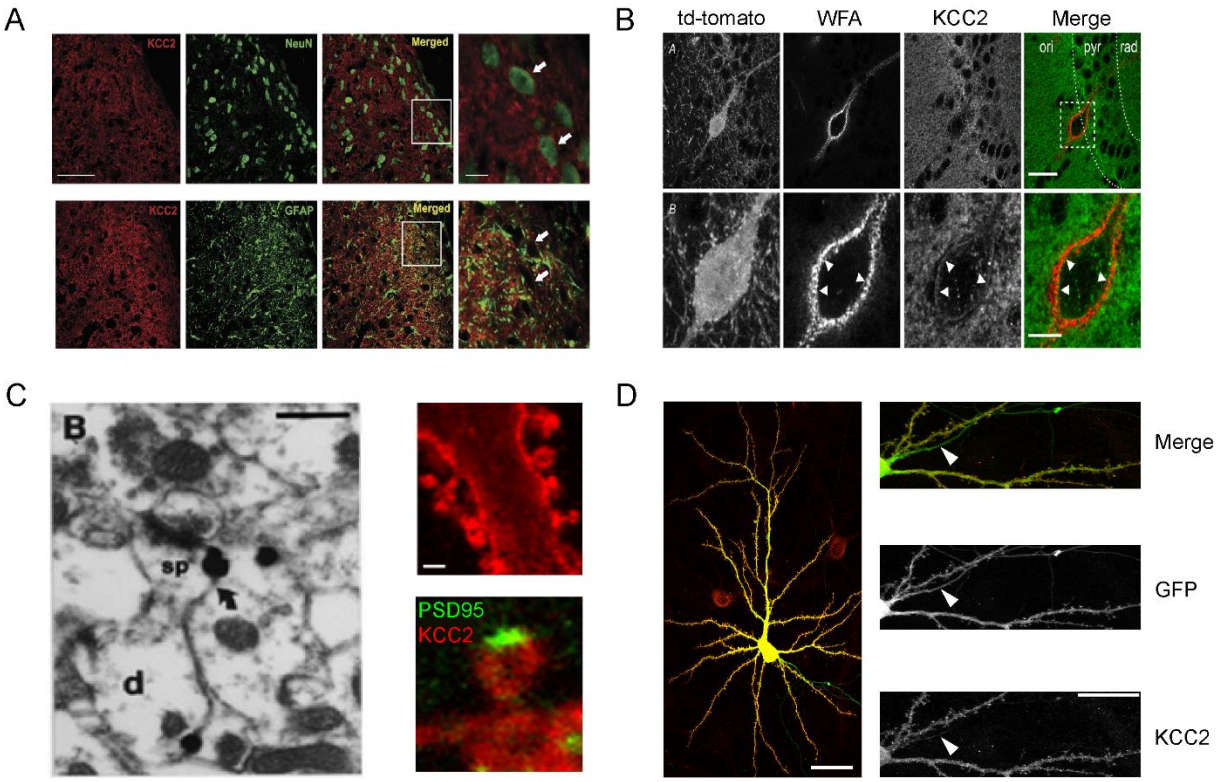


Figure 5. Localisation cellulaire et subcellulaire de KCC2.

A. KCC2 est exprimé spécifiquement dans les neurones. Double marquage KCC2 (rouge)/ protéine nucléaire neuronale (NeuN, vert, neurones) ou KCC2 (rouge)/ protéine acide fibrillaire gliale (GFAP, vert, astrocytes) dans la corne dorsale de la moelle épinière. À droite, images fusionnées des deux marquages. On observe que KCC2 colocalise avec NeuN mais pas avec GFAP (flèches). Échelle, 50 µm (Adapté de Tang et al., 2015). **B.** KCC2 est exprimé dans les interneurones. Immunomarquage pour KCC2 (rouge) et la lectine de *Wisteria floribunda* (WFA, vert), au niveau de la région CA1, chez une souris exprimant td-tomato dans les interneurones à parvalbumine. À droite, images fusionnées des colorations KCC2 et WFA. Échelle, 30 µm. On observe que KCC2 est exprimé au niveau de la membrane des interneurones PV (flèches) (Adapté de Otsu et al., 2020). **C.** KCC2 est exprimé à proximité des synapses glutamatergiques. À gauche, microscopie électronique révélant la présence de KCC2 dans les épines dendritiques (Adapté de Gulyás et al., 2001, échelle 0.6 µm). À droite, immunocytochimie montrant que KCC2 forme des agrégats dans les épines dendritiques à proximité de la synapse (Adapté de Gauvain et al., 2011, échelle 2 µm). **D**. KCC2 n'est pas exprimé dans les axones. Immunocytochimie de KCC2 sur culture de neurones hippocampiques co-exprimant la GFP et KCC2 recombinant. On observe une absence de marquage KCC2 au niveau de l'axone (flèche). Échelle, 40 µm pour l'image de gauche et 10 µm pour les régions zoomées (Adapté de Chamma et al., 2013).

Des différences d'expression subcellulaire sont observées entre KCC2a et KCC2b, probablement lié au fait que le domaine NTD de KCC2 est critique pour l'insertion du transporteur à la membrane, ainsi que pour le trafic de la protéine (Friedel et al., 2017a). De manière générale, ces isoformes co-localisent seulement partiellement et elles ne sont pas localisées dans les mêmes compartiments subcellulaires au sein des neurones matures. En effet, KCC2b semble plus concentré que KCC2a à la membrane somatique (Markkanen et al., 2014).

Même si les conséquences fonctionnelles de ces observations ne sont pas claires, de telles différences suggèrent différents rôles des isoformes dans le cerveau mature. Étant donné que le NTD de KCC2 a aussi été suggéré comme étant fortement impliqué dans la régulation de l'activité du transporteur (Casula et al., 2001a; Fiumelli et al., 2013; Horn et al., 2010; H. Li et al., 2007; Shen et al., 2003), on pourrait imaginer des différences de niveau d'activité entre KCC2a et KCC2b. Pourtant, cela ne semble pas être le cas étant donné que les deux isoformes montrent des niveaux de transport de Cl^- comparables dans des cellules hétérologues (Uvarov et al., 2007), ainsi que dans les neurones (Markkanen et al., 2017).

KCC2a paraît malgré tout avoir une importance fonctionnelle toute particulière. En effet, une souris génétiquement déficiente pour les deux isoformes montre des déficits respiratoires sévères et meurt immédiatement après la naissance (Hübner et al., 2001b; Tornberg et al., 2005a), tandis qu'une souris invalidée uniquement pour KCC2b montre des crises épileptiques spontanées, mais peut survivre jusqu'à 3 semaines après la naissance (Uvarov et al., 2007; Woo et al., 2002a). L'importance vitale de KCC2a à la naissance est probablement liée à son rôle transitoire dans le contrôle de la neuromodulation pontine des circuits moteurs respiratoires (Dubois et al., 2018). À noter cependant, que des souris seulement déficientes pour KCC2a survivent jusqu'au stade adulte et ne semblent pas montrer de phénotype particulier (Markkanen et al., 2014), ce qui sous-entend que KCC2b peut compenser l'absence de KCC2a.

L'impact de la perte d'expression de KCC2 sur l'apparition de crises épileptiques spontanées et sur la survie des animaux suggère un rôle fonctionnel essentiel de ce transporteur dans le SNC. L'étude des fonctions neuronales de KCC2 est donc primordiale et révèle des rôles fonctionnels. Ceux-ci peuvent être liés à son activité de transport ionique, mais aussi indépendants de celui-ci et impliquant des interactions avec différents partenaires protéiques.

I.2- Fonction de KCC2 : rôles canoniques et non canoniques

I.2.1- KCC2 et équilibre thermodynamique

En plus d'être exprimé exclusivement dans les neurones, KCC2 présente de nombreuses caractéristiques fonctionnelles uniques, qui font de lui un transporteur essentiel dans le SNC. La première particularité réside dans le fait que, contrairement aux autres CCCs qui sont activés par un stress osmotique (voir I.2.3), KCC2 est actif en conditions isotoniques (John A. Payne, 1997).

Cette particularité lui est conférée par une courte séquence de 15 acides aminés (1022-1037), située au niveau du CTD et nommée domaine ISO (Acton et al., 2012; Mercado et al., 2006a). À noter que KCC2 sans son domaine ISO est toujours activable en conditions hypotoniques (Jourdain et al., 2011a), ce qui suggère l'existence de deux domaines fonctionnels distincts : un domaine ISO spécifique de KCC2 et un second, partagé avec les autres KCCs, qui lui confère une activité de transport en conditions hypotoniques (Acton et al., 2012).

Cette activité en condition isotonique signifie que le transporteur est actif en permanence et utilise le gradient électrochimique de K^+ généré par la pompe Na^+/K^+ ATPase afin de faire sortir les ions Cl^-. Ce transporteur va donc indirectement consommer beaucoup d'énergie dans la cellule. Quel peut être l'intérêt d'un tel transporteur dans le SNC ?

Tout d'abord, il faut comprendre comment ce transporteur maximise l'énergie fournie par le transport de K^+ pour transporter du Cl^-.

Si l'on considère que KCC2 d'une part, et NKCC1 et les $GABA_AR$ d'autre part, sont respectivement les principales sources d'extrusion et d'entrée de Cl^- dans les neurones, alors on peut calculer assez facilement les concentrations de Cl^- pour lesquelles le transport de Cl^- via KCC2 va être minimal, maximal ou passif.

Ces valeurs peuvent être obtenues si l'on regarde le système à l'équilibre et dans notre cas le potentiel pour lequel le flux de courant net d'ions Cl^- à travers la membrane est nul. On parle alors de potentiel d'inversion (E) et celui-ci peut être calculé selon l'équation de Nernst :

$$E_{Cl^-} = - (RT/zF) * \ln ([Cl^-]_i / [Cl^-]_e)$$

Où R représente la constante des gaz parfaits ($R= 8.31\ J.K^{-1}.mol^{-1}$), T la température absolue en Kelvins ($T=310°K$), F la constante de Faraday ($F=9.65*10^4\ C.mol^{-1}$) et z la valence de l'ion étudié ($z=-1$).

Etant donné que $\ln(x)= 2.3026 \log(X)$, après simplification l'équation revient à :

$$E_{Cl^-} = 60 * \log ([Cl^-]_i / [Cl^-]_e)$$

Si l'on considère que $[Cl^-]_e = 140$ mM alors on a :

$$[Cl^-]_i = 140 * 10^{E_{Cl^-}/60}$$

$[Cl^-]_{i, min}$ correspond à la valeur de $[Cl^-]_i$ pour laquelle l'extrusion de Cl^- via KCC2 est nulle.

Selon la formule du courant ionique on a donc :

$I_{KCC2} = 0 = I_{K+} - I_{Cl-} = \gamma_{K+} (Vm - E_{K+}) - \gamma_{Cl-} (Vm - E_{Cl-})$

Où I représente le courant ionique via KCC2 (ou le courant de l'ion considéré), γ la conductance de l'ion et Vm le potentiel de membrane.

Étant donné que $\gamma_{K+} = \gamma_{Cl-}$ l'équation revient à $E_{K+} = E_{Cl-}$

E_{K+} est considéré comme fluctuant autour de -90mV, on a donc :

$$[Cl^-]_{i,\,min} = 140 * 10^{-90/60} = 4.4 \text{ mM}$$

De façon assez similaire, on peut calculer $[Cl^-]_{i,\,max}$ qui correspond à la concentration de Cl^- pour laquelle l'extrusion de Cl^- via KCC2 va être maximale. On peut donc imaginer un système où $[Cl^-]_i$ serait tellement élevée que le courant via NKCC1 serait nul :

$$I_{NKCC1} = 0 = I_{K+} + I_{Na+} - 2I_{Cl-} = \gamma_{K+} (Vm - E_{K+}) + \gamma_{Na+} (Vm - E_{Na+}) - 2\gamma_{Cl-} (Vm - E_{Cl-})$$

De la même manière que précédemment, étant donné que $\gamma_{K+} = \gamma_{Na+} = \gamma_{Cl-} = 0$ est atteint lorsque $E_{Cl-} = 1/2 (E_{K+} + E_{Na+})$ on a pour $E_{Na+} = 60$ mV l'équation suivante :

$$[Cl^-]_{i,\,max} = 140 * 10^{(½(-90+60)/60)} = 78.7 \text{ mM}$$

Il peut être intéressant de calculer $[Cl^-]_i$ à l'équilibre ($[Cl^-]_{i,\,eq}$), c'est-à-dire lorsque $E_{Cl-} = V_{rest}$ (considéré comme étant autour de -60mV) et que la diffusion de Cl^- se fait de façon passive. On a donc :

$$[Cl^-]_{i,eq} = 140 * 10^{-60/60} = 14 \text{ mM}$$

Bien que ces valeurs représentent des approximations, elles donnent une idée des limites de $[Cl^-]_i$ pour lesquelles le transport de Cl^- via KCC2 va être minimal, maximal ou se faire de manière passive.

Il est intéressant de noter que les concentrations au repos de $[Cl^-]_{i,\,rest}$ ont été estimées à 7 mM dans un modèle computationnel (Doyon et al., 2011a), ce qui suggère qu'en conditions physiologiques KCC2 extrude bien du Cl^-. De plus, l'inhibition de KCC2 avec un antagoniste spécifique - le VU0240551 - conduit à une augmentation de $[Cl^-]_i$ pouvant aller jusqu'à 13 mM (Doyon et al., 2011a). $[Cl^-]_{i,VU}$ étant très proche de $[Cl^-]_{i,eq}$, cela suggère que KCC2 est bien la source majeure d'extrusion du Cl^- dans les neurones et est ainsi responsable en grande partie de la faible concentration de Cl^- intraneuronal (Ben-Ari et al., 2012a; Kaila et al., 2014; Payne et al., 2003; Williams and Payne, 2004).

De plus, $[Cl^-]_{i,\ rest}$ est proche de $[Cl^-]_{i,\ min}$ ce qui suggère que KCC2 fonctionne près de son équilibre thermodynamique (John A. Payne, 1997). Cela est en accord avec la même étude de (Doyon et al., 2011a) qui montre qu'une augmentation de l'activité de KCC2 de 100 à 200% a très peu d'effet sur E_{Cl-}. Ce fonctionnement de KCC2 proche de l'équilibre thermodynamique permet ainsi de maximiser l'efficacité d'utilisation d'énergie fournie par le transport de K^+ pour transporter du Cl^- (Payne et al., 2003).

En revanche, ce fonctionnement proche de l'équilibre peut conduire, lors d'une activité neuronale intense et d'une augmentation de $[K^+]_e$ (jusqu'à 8 mM selon Branston et al., 1982) à une inversion du sens de transport de Cl^-.

Cela va permettre de tamponner le potassium extracellulaire et ainsi de réduire l'excitabilité neuronale. Enfin, et comme nous allons le voir, KCC2, en maintenant des niveaux de Cl^- très bas dans le neurone, permet de maintenir la polarité de la transmission GABAergique et ainsi l'inhibition synaptique des neurones par le GABA.

I.2.2- Homéostasie neuronale des ions chlorure et polarité des réponses GABAergiques

Les $GABA_AR$ étant majoritairement perméables aux ions Cl^- (Kaila and Voipio, 1987), NKCC1 et KCC2, en contrôlant l'homéostasie neuronale des ions Cl^-, jouent un rôle essentiel dans le contrôle de la polarité des réponses GABAergiques (Kaila, 1994; Payne et al., 2003). En effet, cette polarité est fortement dépendante des variations du niveau de Cl^- intracellulaire, étant donné que le potentiel d'inversion des réponses GABAergiques et le potentiel de repos membranaire sont relativement proches (Raimondo et al., 2017).

L'exemple le plus frappant mettant en évidence la corrélation entre l'activité de ces transporteurs et la polarité de la transmission GABAergique a lieu au cours du développement (Figure 6). En effet, le niveau d'expression de NKCC1 est élevé dans les phases précoces du développement (Plotkin et al., 1997; Yamada et al., 2004), tandis que l'expression de KCC2 est faible (Rivera et al., 1999). Cela conduit à des niveaux de $[Cl^-]_i$ relativement importants, à un flux sortant d'ions Cl^- lors de l'activation des récepteurs $GABA_A$ et à un effet dépolarisant de la transmission GABAergique (Ben-Ari et al., 1989; Sulis Sato et al., 2017). Par la suite, au cours du développement, le niveau d'expression de KCC2 augmente tandis que celui de NKCC1 se stabilise, conduisant à de faibles niveaux de Cl^- intracellulaires (Yamada et al., 2004). Cela conduit à un flux entrant de Cl^- dans les neurones lors de l'activation des récepteurs $GABA_A$ et à un effet inhibiteur de la transmission GABAergique.

Ce changement d'expression neuronale des CCCs et donc du niveau de chlore dans les neurones a lieu durant la deuxième semaine postnatale chez les rongeurs (Ben-Ari et al., 2012a; Dzhala et al., 2005a; Rivera et al., 1999) et vers la 40ème semaine post-conception chez l'humain (Dzhala et al., 2005a). Les niveaux adultes d'expression de NKCC1 dans le cortex humain sont quant à eux atteints vers la 50ème semaine post-conception (Dzhala et al., 2005a).

Il a été suggéré que la signalisation GABAergique dépolarisante dans les neurones immatures jouerait un rôle dans la maturation des circuits neuronaux (Ben-Ari, 2007; Wang and Kriegstein, 2011). De plus, il faut bien garder en tête que, bien que l'effet de l'activation des récepteurs $GABA_A$ dans les neurones immatures soit dépolarisant, son effet sur le réseau neuronal n'est pas forcément excitateur. En effet, une étude dans le cortex néonatal a mis en évidence que la dépolarisation GABAergique maintenait toujours un contrôle inhibiteur sur l'activité cortical du réseau *in vivo* (Kirmse et al., 2015), probablement via l'inhibition de « shunt » (Heigele et al., 2016).

Ce type d'inhibition repose sur le principe d'une augmentation de la conductance membranaire réduisant ainsi l'effet excitateur des synapses glutamatergiques adjacentes (Destexhe et al., 2003; Paulus and Rothwell, 2016).

Comme indiqué précédemment, la régulation dans les interneurones de l'homéostasie des ions Cl^- et de la polarité des réponses GABAergiques par les CCCs a été peu étudiée. L'une des difficultés réside dans la difficulté d'évaluer l'effet du GABA ou du transport de Cl^- sans perturber l'intégrité neuronale (voir MM.1).

Au cours de ma thèse, j'ai contribué à une étude visant à comparer la signalisation GABAergique dans les interneurones PV de CA1 et les cellules pyramidales de l'hippocampe chez la souris adulte (Otsu et al., 2020). Pour cela, nous avons combiné des approches électrophysiologiques *in vitro* invasives et non invasives. Nos résultats ont mis en évidence que la signalisation médiée par les $GABA_AR$ est légèrement dépolarisante et pourtant inhibitrice dans les deux types cellulaires.

De plus, KCC2 et NKCC1 sont fonctionnels, même s'ils contribuent différemment aux gradients transmembranaires de Cl^- présents au niveau somatique et au niveau dendritique dans les deux types cellulaires. En effet, le gradient est plus important dans les cellules pyramidales en comparaison avec les interneurones PV, suggérant que l'extrusion de Cl^- le long des dendrites est plus faible dans les interneurones PV.

Cependant, l'E_{GABA} somatique est plus hyperpolarisé dans les interneurones PV que les cellules pyramidales, suggérant que le transport de Cl^- au niveau somatique est plus important dans les interneurones. Ces différences suggèrent une expression et/ou fonction de KCC2 et NKCC1 (et/ou des $GABA_AR$) différente le long de l'axe somatodendritique entre les deux types cellulaires, avec un ratio fonctionnel KCC2/NKCC1- $GABA_AR$ plus important dans le soma des interneurones PV. L'ensemble de ces résultats démontre que, dans l'hippocampe adulte, les interneurones PV et les cellules pyramidales dépendent tous deux de l'activité des CCCs pour maintenir la signalisation inhibitrice du GABA.

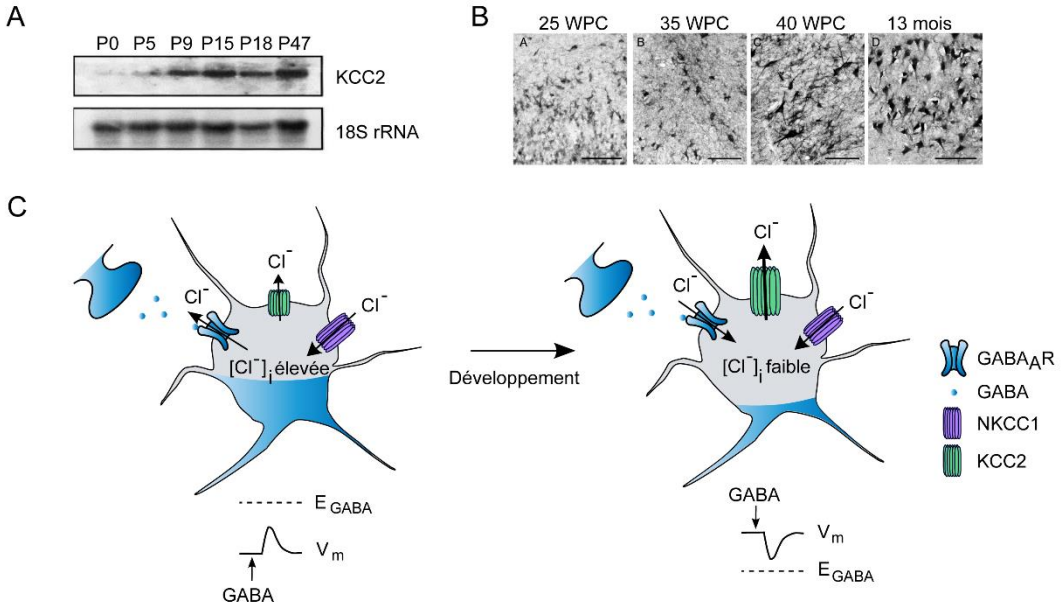


Figure 6. Profil développemental de l'expression de KCC2 et polarité de la transmission GABAergique.

A. L'expression d'ARNm de KCC2 augmente au cours du développement postnatal. Expériences de Northern Blot réalisées sur des échantillons d'hippocampes de rats (adapté de Rivera et al., 1999). **B**. L'expression protéique de KCC2 augmente aussi au cours du développement chez l'humain (WPC : semaine post-conception). Échelle, 100 µm. (Adapté de Sedmak et al., 2016). **C**. L'augmentation d'expression de KCC2 au cours du développement induit un changement progressif de la polarité de la signalisation GABAergique.

Il est important de noter que l'entrée de Cl^- dans les neurones ne se fait pas toujours via NKCC1 (Balakrishnan et al., 2003; Zhang et al., 2007a) et que l'homéostasie neuronale des ions Cl^- n'est pas exclusivement régulée par KCC2 et NKCC1. En effet, les échangeurs d'anions dépendants du Cl^- (Majumdar and Bevensee, 2010) ou indépendants du Na^+ (AE1, AE2 et AE3) (Alper, 2009), ainsi que les canaux Cl^- perméables au Ca^{2+} et dépendants du voltage, participent, eux aussi, mais dans une moindre mesure, à l'homéostasie neuronale des ions Cl^-.

Par exemple, le transporteur AE3 est fortement exprimé dans les neurones et est le principal échangeur d'anions (Hentschke et al., 2006; Kopito et al., 1989; Raley-Susman et al., 1993; Romero et al., 2013). Il contribuerait ainsi, entre autres, à l'excitation GABAergique précoce dans les neurones de l'olive latérale supérieure (Becker et al., 2003). Cependant, le potentiel d'inversion des réponses au GABA, ainsi que les influx de Ca^{2+} évoqués par le GABA dans les neurones de CA1 de souris KO pour AE3, ne diffèrent pas de ceux observés dans les souris sauvages (WT) (Pfeffer et al., 2009). Cela suggère que, dans ce type de neurone, l'accumulation de Cl^- par AE3 est négligeable en comparaison à NKCC1. De plus, aucune altération comportementale, ou morphologique du cerveau, n'a été observée dans des souris KO pour AE3 (Alvarez et al., 2007; Hentschke et al., 2006), suggérant là aussi un rôle mineur dans la régulation de l'homéostasie neuronale des ions Cl^-.

Le canal chlorure de type 2 (ClC-2), un canal dépendant du voltage, contribue lui aussi à l'homéostasie des ions Cl^- et influence la fonction des récepteurs $GABA_A$ (Staley et al., 1996). Néanmoins, ClC-2 semble majoritairement actif à la suite d'une entrée transitoire de Cl^- dans la cellule plutôt qu'en conditions basales (Rinke et al., 2010). Enfin, des souris KO pour ClC-2 ne présentent pas de déficit d'homéostasie des ions Cl^- (Bösl et al., 2001), suggérant une faible participation du canal à cet équilibre.

Enfin, une étude a soulevé de nombreuses questions en suggérant que les concentrations de Cl^- ne seraient pas régulées par l'activité des CCCs, mais seraient contraintes par les concentrations relatives d'anions imperméants de part et d'autre de la membrane (Glykys et al., 2014). En effet, les anions imperméants peuvent créer un gradient de charges électriques à travers la membrane, influençant par conséquent la diffusion transmembranaire d'ions perméables tels que les ions Cl^-. Un tel effet est connu sous le nom d'effet Gibbs-Donnan. L'observation la plus surprenante de cette étude réside dans le fait que le blocage pharmacologique de l'activité des CCCs n'a aucun effet sur la concentration de Cl^- évaluée par imagerie. Ce résultat est ainsi en complète contradiction avec toutes les publications antérieures sur le sujet (Dargaei et al., 2018a; Doyon et al., 2011b; Dzhala et al., 2005a; Gauvain et al., 2011; Rivera et al., 1999; Zhu et al., 2005). Par conséquent, même si les anions imperméants peuvent effectivement influencer $[Cl^-]_i$, comme cela a été récemment mis en évidence dans les neurones thalamiques réticulaires (Klein et al., 2018b), l'ensemble des données de recherche démontrent malgré tout un rôle central des CCCs - et notamment de KCC2 et NKCC1 - dans le contrôle des niveaux de Cl^- neuronaux.

I.2.3- Transport d'eau et régulation osmotique dans les neurones

En plus de son rôle critique dans le contrôle de l'homéostasie neuronale des ions Cl^-, KCC2 joue un rôle essentiel dans la régulation osmotique des neurones.

Les cellules de mammifères et notamment les érythrocytes, les cellules épithéliales, les cellules rénales, et les neurones, sont régulièrement soumis à des challenges osmotiques importants (Lang et al., 1998). Dans les neurones, les flux d'ions lors de la genèse de potentiels d'action sont accompagnés de flux entrant ou sortant d'eau pour maintenir l'osmolarité intracellulaire. Étant donné l'absence d'aquaporines dans les neurones (Amiry-Moghaddam and Ottersen, 2003; Andrew et al., 2007), ces flux d'eau peuvent conduire à des altérations du volume cellulaire, compromettant ainsi l'intégrité structurelle et le milieu intracellulaire, et pouvant conduire à la mort cellulaire (Hoffmann et al., 2009; Lang et al., 1998).

Pour compenser les changements osmotiques liés au transport d'ions, les cellules impliquent les CCCs, qui sont activés dans des conditions de stress osmotique et qui opèrent un couplage du transport d'eau au transport de cations et d'ions Cl^- (environ 500 molécules d'eau pour le transport d'un ion Cl^- par KCC2 et de deux ions Cl^- par NKCC1) (MacAulay and Zeuthen, 2010; Zeuthen and MacAulay, 2002). Dans ce contexte, des expériences de microscopie holographique numérique ont révélé que l'activation des récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDAR) dans les neurones déclenche un influx d'eau par l'intermédiaire des NMDAR et de NKCC1, tandis que l'activation retardée de KCC2 compense cet influx en assurant une sortie nette d'eau (Jourdain et al., 2011b). Ces résultats sont à mettre en parallèle à ceux d'une étude montrant l'importance de KCC2 pour la survie neuronale à la suite d'une excitotoxicité induite par du NMDA (Pellegrino et al., 2011a). Ainsi, même si les auteurs n'ont pas exploré complétement les mécanismes sous-tendant cet effet neuroprotecteur, il est possible qu'il soit dû au rôle de KCC2 dans le contrôle du volume cellulaire. Enfin, des travaux dans l'équipe ont montré qu'une suppression ou un blocage pharmacologique de KCC2 conduit à une augmentation du volume des épines dendritiques, suggérant là aussi un rôle essentiel de KCC2 dans l'extrusion d'eau (Gauvain et al., 2011).

La modulation de l'activité des KCCs et NKCCs par le stress osmotique dépends de l'activité des kinases With-No-Lysine (WNK) et de la voie des kinases sous-jacentes SPAK et OSR1.

Les kinases « With-No-Lysine » sont des sérines-thréonines kinases caractérisées par l'absence inhabituelle de lysine catalytique dans le sous-domaine 2. En revanche, ce résidu (Lys233) est présent au niveau du sous-domaine 1, où il est impliqué dans la liaison de l'adénosine triphosphate (ATP) (Min et al., 2004a; Xu et al., 2002). La famille des kinases WNK comprend 4 membres chez l'humain (WNK1-4) et chaque membre possède plusieurs isoformes. WNK1 est exprimé de manière ubiquitaire et est particulièrement enrichi dans les tissus portant des épithéliums polarisés (Choate et al., 2003). WNK2, en revanche, est exprimé de manière proéminente dans les neurones du cerveau (Rinehart et al., 2011). WNK3 a des transcrits ubiquitaires, ainsi que des transcrits enrichis dans le cerveau ou les reins (Glover et al., 2009). Comme WNK1, WNK4 est également enrichi dans les tissus contenant des épithéliums sécrétoires (Kahle et al., 2004). Bien qu'ubiquitaires, des différences d'expression existent au niveau des régions cérébrales. WNK1 et WNK3 sont par exemple les WNK majoritaires dans l'hippocampe (Heubl et al., 2017).

Le domaine kinase est fortement conservé entre les WNK tandis que le domaine C-terminal à une faible homologie de séquence. Les caractéristiques communes au niveau du domaine C-terminal comprennent des motifs en superhélice, des motifs PXXP et un motif RFXV (Arg-Phe-Xaa-Val). Ce dernier permet la liaison des kinases WNK au domaine carboxy-terminal fortement conservé des kinases SPAK et OSR1 en aval (résidus 436–527 pour OSR1 et 456–547 pour SPAK) (Richardson et al., 2008; Vitari et al., 2006).

Les kinases WNK activent les kinases SPAK et OSR1 en phosphorylant un résidu thréonine fortement conservé dans leur domaine kinase (Thr185 et Thr233 respectivement), et un résidu sérine dans le motif S (S373 et S325 respectivement) (Huang et al., 2020). Il est intéressant de noter que SPAK et OSR1 possèdent aussi une poche secondaire hydrophobe qui fonctionne comme un site allostérique, et qui n'est pas directement affecté par la liaison des kinases WNK (AlAmri et al., 2017b). Les kinases SPAK et OSR1 activées se lient ensuite via une séquence RFXV à KCC2a (Josiah et al., 2021) et agissent sur KCC2b malgré l'absence de séquence de liaison (Markkanen et al., 2017). Elles phosphorylent ensuite le résidu thréonine T1007 de KCC2 et les résidus thréonines T199, T201 et T206 de NKCC1, favorisant et inhibant respectivement la fonction des transporteurs (Gagnon et al., 2006; Rinehart et al., 2009) (voir I.3.2.5).

Les voies WNK et SPAK/OSR1 sont inhibées en condition hypo-osmotique, conduisant à l'activation de KCC2 et à l'inhibition de NKCC1. L'effet inverse est observé dans des conditions hyper-osmotiques (Chen et al., 2004; Dowd and Forbush, 2003; Lenertz et al., 2005; Moriguchi et al., 2005; Naito et al., 2011; Richardson et al., 2008; Zagórska et al., 2007). Des questions subsistent cependant quant aux mécanismes impliqués dans l'inhibition ou l'activation des kinases WNK suite à des perturbations osmotiques. Plusieurs études ont montré que ces kinases, dont la kinase WNK1, peuvent être directement activées par un stress hyper-osmotique (Xu et al., 2002; Zagórska et al., 2007). Dans le cas de WNK1, le stress hyper-osmotique favoriserait son autophosphorylation au niveau d'un résidu S382 de la boucle T, un événement permettant son activation (Xu et al., 2002; Zagórska et al., 2007).

Une particularité des kinases WNK réside aussi dans le fait que leur activité est modulée par les niveaux de Cl^- intracellulaire (Moriguchi et al., 2005; Piala et al., 2014). Il a ainsi été montré qu'une réduction de $[Cl^-]_i$ induit l'autophosphorylation et l'activation de ces kinases (Moriguchi et al., 2005; Ponce-Coria et al., 2008). Il a été montré *in vitro* que le Cl^- se lie au niveau du domaine kinase de WNK1 et inhibe son autophosphorylation (Piala et al., 2014).

La concentration inhibitrice médiane (IC50) du Cl^- est d'environ 20 mM pour l'autophosphorylation de WNK1 (Piala et al., 2014) et de 100 mM pour la phosphorylation de SPAK (Terker et al., 2016). Transposées *in situ*, ces valeurs suggéreraient que WNK1 est constitutivement active dans les neurones. Des travaux dans l'équipe ont montré que ce n'était pas le cas et que même de faibles variations de Cl^- sont capables de moduler l'activité de WNK1 (Heubl et al., 2017). Une caractérisation plus poussée de la localisation de WNK1 et de son activité dans les neurones reste cependant nécessaire afin d'évaluer la sensibilité au chlore de la kinase.

Malgré cette sensibilité au Cl^-, il existe certaines situations de stress osmotique dans lesquelles des protéines intermédiaires empêchent l'autophosphorylation des kinases WNKs et les rendent « insensible » au Cl^-. C'est ainsi le cas de la protéine kinase de type 3 régulée par l'apoptose (ASK3), se liant à WNK1 et sensible au stress osmotique, qui inhibe l'autophosphorylation de la boucle T de WNK1 (Naguro et al., 2012). Enfin, contrairement aux autres kinases WNK, WNK3 est la seule à ne pas être sensible au Cl^- (Bazúa-Valenti et al., 2015), ce qui fait de cette kinase une protéine candidate pour être un osmosenseur direct détectant les changements de volume cellulaire.

I.2.4- Fonctions non canoniques de KCC2

Le rôle essentiel de KCC2 dans les neurones n'est pas uniquement lié à son rôle canonique de transporteur d'ions Cl^-. En effet, il contribue également à un ensemble de fonctions non canoniques primordiales, telle que la régulation de la synaptogenèse, de la fonction synaptique, et de l'excitabilité membranaire. Celles-ci impliquent son interaction avec de nombreux partenaires moléculaires (Al Awabdh et al., 2022; Mahadevan et al., 2017; Smalley et al., 2020).

I.2.4.1- Synaptogenèse et fonction synaptique

De nombreuses études ont mis en évidence un rôle critique de KCC2 dans la synaptogenèse et l'efficacité synaptique, aussi bien au niveau des synapses inhibitrices, que des synapses excitatrices. Par exemple, la surexpression de KCC2 recombinant dans des neurones hippocampiques immatures augmente la densité de terminaisons GABAergiques, le nombre d'agrégats de $GABA_AR$ postsynaptiques, ainsi que la fréquence et l'amplitude des courants miniatures inhibiteurs post-synaptique (mIPSCs) médiées par les $GABA_AR$ (Chudotvorova et al., 2005a).

À l'inverse, la fréquence des mIPSCs est réduite dans des souris hypomorphiques pour KCC2 (Tornberg et al., 2005b), suggérant que KCC2 est nécessaire pour la maturation fonctionnelle des synapses GABAergiques. Des résultats similaires sont observés au niveau des synapses glycinergiques. En effet, la suppression de l'expression de KCC2 *in vitro* dans des neurones de la moelle épinière réduit le nombre et la taille des agrégats de certains récepteurs glycinergiques dendritiques, et cela est associé à une diminution de la fréquence et de l'amplitude des courants miniatures inhibiteurs glycinergiques (Schwale et al., 2016).

Ces effets sont probablement liés à une perturbation de la géphyrine, principale protéine d'échafaudage aux synapses inhibitrices, qui est connue pour stabiliser les récepteurs $GABA_A$ et glycinergiques aux synapses inhibitrices (Feng et al., 1998; Kneussel et al., 1999; Lévi et al., 2004; Jacob et al., 2005; Yu et al., 2007). En effet, nous avons récemment mis en évidence une interaction et une régulation directe de KCC2 par la géphyrine (Al Awabdh et al., 2022). Enfin, KCC2 est connu pour interagir directement avec les $GABA_AR$ (Huang et al., 2012; Wan et al., 2020) et $GABA_BR$ (Wright et al., 2017a).

Cela suggère qu'un changement de l'expression de KCC2 pourrait avoir un effet sur la maturation fonctionnelle des synapses inhibitrices, en perturbant l'organisation et la stabilité de la géphyrine et des récepteurs GABAergiques/glycinergiques. Ces effets de l'expression de KCC2 sur la synaptogenèse et la fonction synaptique aux synapses inhibitrices pourraient aussi être liés à un changement de l'activité neuronale, et à une plasticité adaptative de l'inhibition (Kullmann et al., 2012).

Bien que KCC2 influence principalement la transmission GABAergique dans les neurones corticaux, son accumulation dans les épines dendritiques proches de synapses excitatrices (Gulyás et al., 2001) suggère une possible interaction avec la transmission glutamatergique excitatrice. Il a ainsi été mis en évidence que KCC2 module le développement, la fonction, et la plasticité des synapses glutamatergiques, via son interaction avec des protéines liées au cytosquelette d'actine telles que les protéines 4.1 (4.1N) et β-PIX (p21-activated protein kinase exchange factor beta) (Chevy et al., 2015; Fiumelli et al., 2013; Gauvain et al., 2011; H. Li et al., 2007; Llano et al., 2015). Ainsi, une suppression de KCC2 dans des neurones corticaux ou hippocampiques immatures prévient la maturation des épines et conduit à une augmentation des protrusions de filopodes (H. Li et al., 2007; Llano et al., 2015). En revanche, une suppression de KCC2 dans des neurones hippocampiques matures empêche la potentialisation à long terme des synapses excitatrices, en perturbant l'expression membranaire des récepteurs à l'acide aminométhylphosphonique (AMPAR) (Chevy et al., 2015; Gauvain et al., 2011).

Bien que ces résultats semblent cohérents, il est intéressant de noter que la régulation KCC2-dépendante du développement dendritique est variable d'une région à l'autre (Awad et al., 2018). Ainsi, l'expression prématurée de KCC2 dans les stages précoces du développement diminue significativement la densité d'épines dendritiques dans les neurones de CA1 (Awad et al., 2018), tandis qu'elle a l'effet inverse dans les neurones du cortex somatosensoriel (Fiumelli et al., 2013).

Cet effet différent de KCC2 sur le développement dendritique, entre les neurones pyramidaux de CA1 et ceux du cortex somatosensoriel, peut s'expliquer par le fait que KCC2 est exprimé plus précocement dans les neurones de CA1 et que son expression membranaire est significativement plus importante dans l'hippocampe que dans le cortex (Awad et al., 2018).

Or, il a été montré qu'une expression prématurée de KCC2 conduit à des valeurs plus négatives d'E_{GABA} (Cancedda et al., 2007; Galanopoulou, 2008; Khirug et al., 2010; Pellegrino et al., 2011b; Rivera et al., 2005). Cela peut ainsi réduire l'activité neuronale et la potentialisation synaptique, conduisant alors à une perte neuronale (Turrigiano and Nelson, 1998). Une expression prématurée de KCC2 pourrait donc avoir un impact plus important dans les neurones hippocampiques de CA1, conduisant alors à une perturbation de la formation et de la stabilisation des épines dendritiques. Des études supplémentaires sont cependant nécessaires pour identifier à quel point E_{GABA} diffère entre les cellules pyramidales de CA1 et celles du cortex somatosensoriel au cours des premières semaines postnatales.

I.2.4.2- Excitabilité neuronale

Comme indiqué précédemment, KCC2 joue un rôle essentiel dans l'excitabilité neuronale via son contrôle de l'homéostasie des ions Cl^-, et sa capacité à tamponner le K^+ extracellulaire.

Pour étudier plus en détail l'impact de KCC2 sur l'excitabilité neuronale, nous avons récemment étudié l'impact fonctionnel d'une diminution d'expression de KCC2 dans le gyrus denté du rat au niveau cellulaire, synaptique et de l'activité du réseau (Goutierre et al., 2019a). Bien que le potentiel d'inversion des courants médiés par les $GABA_AR$ est davantage dépolarisé suite à la diminution d'expression de KCC2, le potentiel de repos est, lui aussi, dépolarisé, ce qui compense largement la « driving-force » des courants GABAergiques. Cependant, l'excitabilité neuronale est altérée avec notamment une dépolarisation du potentiel de membrane et de la résistance d'entrée, ainsi qu'une altération de l'activité de réseau du gyrus denté.

Cela suggère une réduction des courants potassiques de fuite. Nous avons confirmé cette hypothèse en montrant que KCC2 interagit avec les canaux potassiques de fuite Task-3 (TWIK-related acid-sensitive K+ channel 3) et est nécessaire pour leur expression à la membrane. Ainsi, via son interaction avec les canaux Task-3, KCC2 est capable de réguler l'excitabilité neuronale.

KCC2 est également engagé dans des interactions avec de nombreuses protéines membranaires, telles que la sous-unité GLUK2 des récepteurs kaïnate (Kesaf et al., 2020; Mahadevan et al., 2014), et sa sous-unité auxiliaire Neto2 (Ivakine et al., 2013). Cela enrichit les possibilités pour KCC2 d'influencer la fonction synaptique et l'excitabilité neuronale.

I.2.4.3- Autres rôles

Un article récent a montré que KCC2, indépendamment de ses fonctions de transport ionique, favorise également la survie des neurones pyramidaux en migration pendant la première vague d'apoptose (Mavrovic et al., 2020). Ce mécanisme implique le domaine C-terminal de KCC2 et l'inhibition de l'hyperphosphorylation de la cofiline, qui contrôle la libération cytosolique du cytochrome c et l'apoptose. Cet effet est surprenant puisqu'il intervient pendant la corticogenèse, c'est-à-dire à un moment où KCC2 est faiblement exprimé. Cela suggère que KCC2 joue un rôle essentiel, même au début du développement, lorsque son niveau d'expression est faible.

L'étude de l'interactome de KCC2 (Al Awabdh et al., 2022; Mahadevan et al., 2017; Smalley et al., 2020) met en évidence l'existence de nombreux autres partenaires du transporteur, tels que la protéine précurseur de l'amyloïde (APP), le complexe de protéines adaptatrices 2 (AP-2), la protéine 1 du substrat de la caséine kinase dans les neurones (PACSIN1), CIP1, la créatine kinase de type cérébral (CKB) ou encore la protéine 23 associée aux synaptosomes (SNAP23). L'identification de ces partenaires protéiques ouvre encore plus le champ des possibles concernant les fonctions non canoniques de KCC2. De plus, l'interaction de ces protéines avec KCC2 suggèrent qu'elles peuvent jouer un rôle essentiel dans la régulation de l'expression et de la fonction du transporteur (voir I.3.4).

En conclusion, KCC2 joue donc un rôle essentiel dans le SNC de par sa fonction de transport et ses rôles non canoniques. Cette diversité fonctionnelle nous a conduits à nous intéresser aux mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression, de la stabilité ou de la fonction du transporteur.

I.3- Régulations de l'expression, de la stabilité membranaire et de la fonction de KCC2

I.3.1- Régulation de l'expression de KCC2

L'activité de transport de KCC2 dépend en premier lieu du niveau d'expression du transporteur. Ce dernier est régulé, comme on a pu le voir précédemment, par des facteurs de transcription et des éléments spécifiques (éléments de restrictions, facteurs de stimulation, régions régulatrices…).

Cette régulation transcriptionnelle est également modulée, au cours du développement, par la voie de signalisation impliquant le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF), et les récepteurs kinase à la tropomyosine de type B (TrkB) (Figure 7).

L'expression progressive de KCC2 au cours du développement est favorisée par la libération du BDNF (Aguado et al., 2003). Ce dernier, en se liant aux récepteurs TrkB, conduit à l'activation de la protéine de transformation (Shc), qui à son tour active la voie des kinases 1 et 2 régulées par le signal extracellulaire (Erk1/2). Celles-ci conduisent à une augmentation de l'activité du facteur de transcription Egr4, favorisant l'expression de KCC2 (Ludwig et al., 2011). De manière surprenante, des souris KO pour le BDNF présentent toujours cette régulation de l'expression de KCC2 (Puskarjov et al., 2015). Cela peut s'expliquer par la présence de mécanismes compensatoires au BDNF. Par exemple, le facteur neurotrophique neurturine peut aussi induire l'activité d'Egr4 et ainsi favoriser l'expression de KCC2 (Ludwig et al., 2011). De façon intéressante, cette régulation est restreinte à l'isoforme KCC2b (Ludwig et al., 2011), expliquant les proportions différentes des deux isoformes dans le cerveau en développement par rapport au cerveau mature (Uvarov et al., 2009b).

La régulation développementale de KCC2 requiert aussi l'expression précoce de la neuroligine 2 (Sun et al., 2013). Cependant, les mécanismes sous-tendant une telle régulation et l'implication du BDNF ou de la neurturine dans une telle signalisation demeurent inconnus.

Contrairement à son rôle dans le cerveau en développement, le BDNF possède des effets complètement opposés sur l'expression et la stabilité membranaire de KCC2 dans le cerveau mature. En effet, une incubation de 2 à 3 heures avec du BDNF est suffisante pour induire une diminution massive de l'expression de KCC2 et des niveaux d'ARNm (Rivera et al., 2002a).

Cet effet opposé est lié au fait que, dans le cerveau mature, la liaison du BDNF à TrkB entraine la co-activation de Shc et de la phospholipase Cγ (PLCγ), conduisant à l'inhibition de l'expression de KCC2 via la protéine de liaison à l'élément de réponse de l'AMPc (CREB) (Rivera et al., 2004a). Ce changement dans la signalisation BDNF/ TrkB au cours de la maturation peut s'expliquer par des changements âge-dépendants de la phosphorylation de TrkB et de son site de liaison à la PLCγ (Di Lieto et al., 2012).

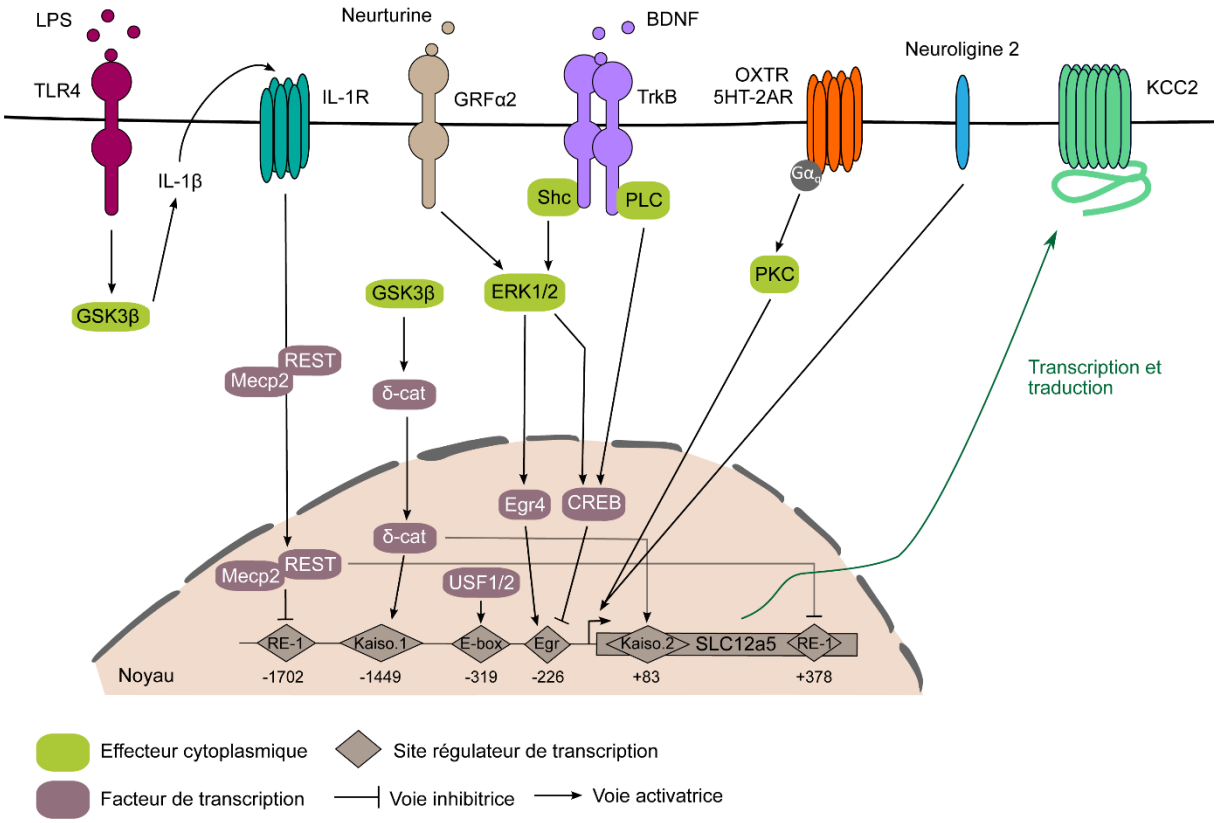


Figure 7. Voies de signalisation régulant l'expression de KCC2.

Le BDNF régule différemment l'expression de KCC2 au cours du développement. Dans les neurones immatures, seul Shc est stimulé, conduisant à la transcription du gène codant pour KCC2. À l'inverse, dans les neurones matures, la liaison du BDNF à TrKB induit la co-activation de Shc et de la phospholipase C (PLC), ce qui conduit à l'inhibition d'expression de KCC2. La neurturine est également capable de moduler cette voie. Les changements des niveaux d'expression de KCC2 au cours du développement sont aussi liés à la liaison des protéines USF1/2 à la E-box. L'expression de KCC2 est en revanche inhibée par la liaison du facteur de transcription REST aux sites répresseurs RE-1. REST peut s'associer avec le facteur de transcription de la protéine de liaison se liant au méthyle CpG (type 2) (Mecp2) pour inhiber la transcription du gène codant pour KCC2. L'association de REST et Mecp2, ainsi que leur translocation au noyau, dépend d'une voie impliquant les récepteurs de type Toll 4 (TLR4), activés par les lipopolysaccharides (LPS), la glycogène synthase kinase 3 β (GSK3β), l'interleukin 1β (IL-1β) et les récepteurs IL-1R. La GSK3β phosphoryle aussi la delta-caténine (δ-cat), favorisant sa translocation au noyau et l'activation de la transcription du gène SLC12a5, via les sites Kaiso 1 et 2. L'activation de la protéine kinase C (PKC) par les récepteurs à l'ocytocine (OxT) et les récepteurs 5HT-2A augmente l'expression de KCC2. Enfin, la neuroligine 2 augmente l'expression du transporteur. Cependant, la voie de signalisation impliquée est inconnue. La position des sites régulateurs de transcription est indiquée par rapport au site de début de transcription (TSS) du KCC2b chez la souris.

Deux autres régulations spécifiques de l'expression de KCC2b sont connues. La première, implique la liaison de facteurs de stimulation (USF1 et 2) aux boites activatrices (E-box) (Markkanen et al., 2008). La seconde, implique le facteur de transcription REST, qui se fixe sur les sites d'éléments répresseurs (RE-1) et inhibe la transcription du gène codant pour KCC2 (Yeo et al., 2009). Il est intéressant de noter que cette inhibition a lieu uniquement lorsque REST se fixe aux deux sites RE-1. Le premier est situé en amont du site de début de transcription (TSS), tandis que l'autre est situé au niveau intronique.

Le gène codant pour KCC2 est ainsi le seul gène avec deux sites RE-1 qui encadre le TSS. De plus, c'est également le seul gène cible de REST qui code pour un transporteur ionique. Cela renforce l'idée que KCC2 présente des mécanismes de régulation unique dans le SNC.

Récemment, une étude a mis en évidence un mécanisme de régulation de l'expression de KCC2 impliquant cet élément REST. Tomita et al., 2022a ont ainsi montré que l'activation des récepteurs de type Toll 4 (TLR4) par les lipopolysaccharides (LPS) augmente l'expression de l'interleukine 1β (IL-1β) via la glycogène synthase kinase 3 β (GSK3β). IL-1β active ensuite les récepteurs IL-1R, qui favorisent la translocation nucléaire des facteurs de transcription REST et de la protéine de liaison se liant au méthyle CpG (type 2) (Mecp2). Ces derniers inhibent ensuite la transcription du gène codant pour KCC2.

La GSK3β semble fortement impliquée dans la régulation de l'expression de KCC2, car elle augmente la transcription du gène codant pour le transporteur, via une autre voie de signalisation. Celle-ci implique la delta-caténine, dont la translocation nucléaire est favorisée lors de sa phosphorylation par la GSK3β. La delta-caténine, une fois dans le noyau, augmente la transaction du gène SLC12a5, par le biais de sa fixation sur deux sites Kaiso (Kaiso1-2) (Yeo et al., 2021a).

Enfin, très récemment, deux voies de signalisation impliquant la PKC ont été mises en évidence comme promouvant la transcription du gène codant pour KCC2. La première implique les récepteurs à l'ocytocine (OxTR) (Ba et al., 2022a) et la deuxième les récepteurs à la sérotonine de type 2A (5HT-2AR) (Yuan et al., 2022a). Hormis la PKC, les autres acteurs de cette voie ne sont pas connus.

I.3.2- Mécanismes de régulation post-traductionnelle de KCC2

La fonction de KCC2 ne dépend pas seulement de son niveau d'expression transcriptionnel, mais également de mécanismes de régulation post-traductionnelle. Ces derniers impliquent, d'une part, l'interaction avec de nombreuses protéines impliquées dans le transport vésiculaires et l'ancrage au cytosquelette, et d'autre part, l'activité de kinases et phosphatases qui régulent son trafic cellulaire.

I.3.2.1- Exocytose, endocytose et dégradation

L'exocytose joue un rôle important dans le contrôle de l'activité de KCC2, en favorisant son expression à la membrane. Récemment, l'utilisation de protéines recombinantes liées à des fluorochromes sensibles au pH, a permis de visualiser de façon dynamique les phénomènes d'exocytose et d'endocytose de récepteurs aux neurotransmetteurs (Petrini and Barberis, 2014; Zhang et al., 2015).

Cette même approche a été utilisée pour étudier le trafic de KCC2. Cependant, étant donné que le NTD et le CTD de KCC2 sont cytosoliques, un marqueur pHluorin non fonctionnel a été inséré dans la seconde et la troisième boucle extracellulaire du transporteur, afin de servir de motif extracellulaire (Friedel et al., 2015a, 2017b). Après vérification que ce marqueur ne perturbait pas la fonction du transporteur, des mutants de KCC2 exprimant cette construction, et délétés des domaines N-ter et C-ter, ont été utilisés dans le but d'étudier l'importance de ces domaines dans l'adressage et la stabilité membranaire du transporteur. Ces mutants, couplés à des techniques d'immunomarquage en temps réel dans des cellules hétérologues et des neurones hippocampiques en culture, ont permis de mettre en évidence l'importance du NTD pour l'adressage de KCC2 à la membrane, et du CTD pour sa stabilité membranaire (Friedel et al., 2017b).

Par la suite, des précisions ont été apportées concernant le mécanisme d'exocytose de KCC2. Le facteur de croissance transformant B2 (TGF-β2) semble important pour la translocation à la membrane plasmique du KCC2 intracellulaire. Ce mécanisme a été observé aussi bien dans des neurones en développement que dans des neurones hippocampiques matures (Roussa et al., 2016a), et implique la protéine de liaison 11b associée à Ras (Rab11b). L'interaction de KCC2 et Rab11b a été récemment confirmée dans des études d'interactome de KCC2 (Al Awabdh et al., 2022; Mahadevan et al., 2017).

Une fois synthétisé et inséré à la membrane, KCC2 suit de nombreux cycles d'endocytose et d'exocytose jusqu'à sa dégradation finale. Le taux de renouvellement de KCC2 à la membrane est compris entre 20 et 30 min (Lee et al., 2010; Rivera et al., 2004b), tandis que la durée de vie du transporteur est supérieure à 4 h (Puskarjov et al., 2012).

Via des expériences de co-immunoprécipitation, Zhao et al., 2008a a montré que le KCC2 endogène interagît avec la protéine de liaison à la clathrine AP-2. Cela suggère que l'internalisation de KCC2 peut être contrôlée par la voie d'endocytose médiée par la clathrine.

Ils ont ensuite identifié, dans des cellules HEK293, un motif non canonique d'endocytose situé sur le CTD de KCC2. Quatre résidus leucine sont nécessaires pour ce mécanisme d'endocytose, mais le résidu L658 est le plus important. Les deux résidus d'acide glutamique en aval régulent la fonction du motif di-leucine. Ce motif est fortement conservé parmi la famille des KCC mais est absent chez NKCC1, NKCC2, ou les protéines NCC (Zhao et al., 2008a). Il est important de noter que ce motif a été identifié dans des cellules hétérologues surexprimant KCC2. Des études supplémentaires sont donc nécessaires afin de confirmer si oui ou non ce motif joue un rôle dans l'endocytose de KCC2, au sein des neurones, et si d'autres régions sont impliquées.

En plus d'AP-2, deux autres protéines impliquées dans l'endocytose médiée par la clathrine et le transport vésiculaire dans les neurones ont été identifiées comme interagissant avec KCC2 : la protéine kinase C (PKC) et PACSIN1 (Mahadevan et al., 2017). L'ensemble de ces résultats suggère ainsi qu'AP-2, PKC et PACSIN1 contribuent à l'endocytose de KCC2.

Différentes voies de signalisation sont impliquées dans la dégradation de KCC2. KCC2 peut par exemple être dégradé par voie lysosomale dans des conditions d'augmentation d'activité glutamatergique (Lee et al., 2010; Wake et al., 2007a). Il a ainsi été montré que l'activation des récepteurs muscariniques à l'acétylcholine (mAChRs) augmente la phosphorylation des résidus tyrosine de KCC2. Cela conduit à une réduction de sa stabilité membranaire, à une augmentation de son endocytose, et de sa dégradation (Lee et al., 2010; Wake et al., 2007a).

En parallèle, les récepteurs NMDA sont également capables de moduler la dégradation du transporteur. Ainsi, l'influx de calcium via ces récepteurs active, d'une part, la protéine phosphatase 1 (PP1) qui déphosphoryle la S940 (Chamma et al., 2013; Lee et al., 2011a), et d'autre part, la calpaïne, responsable du clivage du domaine CTD de KCC2 et de sa dégradation (Chamma et al., 2013; Puskarjov et al., 2012; Zhou et al., 2012).

KCC2 est aussi rapidement dégradé par une voie impliquant son ubiquitinylation et le protéasome. Il a ainsi été montré que le BDNF diminue l'expression de KCC2 via l'ubiquitinylation médiée par le proto-oncogène-b du lymphome de la lignée B Casitas (Cbl-b, Ma et al., 2021). L'existence de ces deux voies de dégradation a été confirmée par deux études montrant qu'APP en interagissant avec KCC2 limite les pTyr et l'ubiquitinylation de KCC2 et donc sa dégradation (Chen et al., 2017; Shen et al., 2022a).

I.3.2.2- Oligomérisation

L'assemblage multimérique a été mis en évidence chez un certain nombre de membres de la famille des CCCs (Blaesse et al., 2006b; Casula et al., 2009, 2001b; Moore-Hoon and Turner, 2000; Simard et al., 2007b; Starremans et al., 2003; Warmuth et al., 2009). KCC2 est connu pour former des homo-dimères de KCC2a et de KCC2b, ainsi que des hétérodimères KCC2a-KCC2b, KCC2-KCC4 et KCC2-NKCC1, aussi bien dans des neurones que dans des cellules hétérologues (Blaesse et al., 2006b; Simard et al., 2007b; Uvarov et al., 2009b).

La proportion de monomères, de dimères et de multimères de KCC2 dans les neurones reste débattue. Blaesse et al., 2006b ont montré que l'augmentation d'oligomères de KCC2 est à mettre en parallèle avec l'activation du transporteur dans le tronc cérébral en développement (entre P2 et P30), tandis qu'Uvarov et al., 2009b ont observé une oligomérisation de KCC2 dès P2 dans différentes régions cérébrales.

En utilisant une technique de native PAGE, Mahadevan et al., 2017, 2014 ont mis en évidence des monomères, des dimères et des multimères de KCC2. Cependant, en utilisant des approches similaires, Agez et al., 2017 ont uniquement détecté des monomères et des dimères de KCC2. Des résultats opposés sont également obtenus en SDS-PAGE, où aucune agrégation n'est observée (Smalley et al., 2020).

Ces différences peuvent s'expliquer par des différences dans les gels (Blaesse et al., 2006b; Uvarov et al., 2009b) et dans les détergents utilisés lors de la préparation des échantillons (Agez et al., 2017; Mahadevan et al., 2017).

Des résultats intéressants sont malgré tout obtenus en Blue Native PAGE (BN-PAGE), une technique permettant une séparation à haute résolution de complexes multi-protéiques. À la suite de cette technique, différentes bandes protéiques de KCC2 sont observées. Une bande est notamment observée à 300 kDa et contient 10 fois plus de KCC2. Cela indique que KCC2 existe en tant qu'homodimères à la membrane plasmique (Smalley et al., 2020). Ces résultats sont en accord avec les résultats d'Agez et al., 2017, et ceux obtenus en cryo-EM de Zhang et al., 2021a, qui montrent que KCC2 est présent sous forme de dimères.

Comme indiqué précédemment (voir I.1.2), l'interface de dimérisation a été identifiée très récemment pour tous les KCCs chez l'homme (Liu et al., 2019; Zhang et al., 2021a; Zhao et al., 2020) et NKCC1 chez la drosophile (Chew et al., 2019). Cette interface serait située au niveau d'une région qui connecte le domaine transmembranaire au domaine C-terminal.

Cela est en accord avec les précédentes études montrant une capacité d'auto-assemblage du CTD de NKCC1 et d'un CCC d'archée (Simard et al., 2004; Warmuth et al., 2009), ainsi qu'une réduction d'oligomérisation des KCCs tronqués du CTD, ou de KCC2 muté sur le résidu tyrosine 1087 (Simard et al., 2007b; Watanabe et al., 2009). Cependant, il est important de noter que Watanabe et al., 2009 ont muté la Tyr1087 en aspartate, afin de mimer un état déphosphorylé, alors que cet acide aminé est davantage utilisé pour mimer une phosphorylation. De plus, ce résidu a une structure très éloignée du résidu tyrosine. Cela questionne donc les résultats de cette étude et suggère plutôt que cette mutation a entrainé une déstabilisation du domaine C-terminal de KCC2, qui s'est reflétée par une perte d'oligomérisation du transporteur.

Le lien entre oligomérisation de KCC2 et fonction reste à définir. Plusieurs études ont mis en évidence une corrélation entre diminution d'oligomérisation de KCC2 et réduction de la fonction de transport (Mahadevan et al., 2014; Watanabe et al., 2009). Par exemple, la protéine Neto-2 interagit avec des formes oligomériques de KCC2, augmentant la fonction d'extrusion des ions Cl^- dans les neurones hippocampiques en culture (Ivakine et al., 2013). De façon similaire, la sous-unité du récepteur au kaïnate GluK2 interagît avec KCC2, et joue un rôle essentiel dans l'oligomérisation, l'expression de surface, et la fonction de KCC2 (Mahadevan et al., 2014; Pressey et al., 2017). Enfin, l'interaction de KCC2 avec CIP1 favoriserait sa fonction via la formation d'hétérodimères (Caron et al., 2000; Wenz et al., 2009).

Cependant, étant donné que l'oligomérisation et l'expression de surface ont lieu en parallèle dans la plupart des études, ces observations ne démontrent pas clairement de lien causal entre l'oligomérisation de KCC2 et sa fonction de transport.

Ainsi, même si le lien entre l'oligomérisation de KCC2 et la fonction du transporteur n'a pas encore été prouvé, il reste important de prendre en compte les différentes formes oligomérisées de KCC2 lors des analyses. Du fait des difficultés expérimentales mentionnées plus haut, de trop nombreuses études s'intéressent uniquement aux monomères ou aux dimères de KCC2, ce qui masque probablement des effets oligomères-dépendants.

I.3.2.3- Agrégation

KCC2 est connu pour former des agrégats à la membrane plasmique (Barthó et al., 2004; Chamma et al., 2012, 2013; Gauvain et al., 2011; Gulyás et al., 2001; Heubl et al., 2017; Hübner et al., 2001b; Watanabe et al., 2009). Ces agrégats sont majoritairement localisés au niveau des synapses excitatrices et inhibitrices dans les neurones hippocampiques en culture, sans localisation préférentielle pour un type de synapse (Chamma et al., 2013). Des analyses plus poussées d'ultrastructure indiquent que KCC2 s'accumule à la périphérie des synapses des épines dendritiques et de l'arbre dendritique (Báldi et al., 2010; Gulyás et al., 2001).

L'agrégation de KCC2 pourrait favoriser sa localisation et/ou sa stabilisation dans les compartiments sous-membranaires, aussi bien au niveau des synapses excitatrices, qu'inhibitrices. De plus, l'agrégation de KCC2 a été suggérée comme régulant la fonction du transporteur. Une étude a ainsi montré qu'une inhibition de la phosphorylation des résidus tyrosines, ou une délétion d'une région proche (Δ1089–1116), conduisait à une réduction de l'agrégation de KCC2 et de sa fonction de transport, sans changement de son expression membranaire (Watanabe et al., 2009). Cela suggère que le domaine CTD de KCC2 est impliqué dans la formation d'agrégats de KCC2 et que l'agrégation et la fonction du transporteur sont fortement liées.

De façon intéressante, la surexpression du CTD de KCC2 dans des neurones hippocampiques induit une diminution de la taille des agrégats, sans changements de leur densité, ou de la fonction du transporteur. Cela suggère que l'agrégation de KCC2 ne repose pas uniquement sur la liaison du CTD au cytosquelette (Al Awabdh et al., 2022; Chamma et al., 2013).

L'agrégation de KCC2 semble aussi être influencée par l'association du transporteur avec les radeaux lipidiques. Ces derniers sont des microdomaines enrichis en cholestérol et sphingolipides, qui sont connus pour jouer un rôle dans la signalisation cellulaire et l'assemblage protéique (Brodbek and Schmid, 2016; Munro, 2003; Owen et al., 2012). Watanabe et al., 2009 ont ainsi observé dans des cultures de neurones que l'association de KCC2 avec les radeaux lipidiques augmente son agrégation et sa fonction, tandis que Hartmann et al., 2009 observent des agrégats plus larges et une augmentation de l'activité de transport après une perturbation des radeaux lipidiques. Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer par le fait que l'étude de Hartmann et al., 2009 a été effectuée sur des cellules HEK 293 surexprimant un KCC2 recombinant.

Les mécanismes expliquant l'impact de l'agrégation de KCC2 dans les radeaux lipidiques sur la fonction du transporteur restent encore à déterminer. Dans ce sens, l'imagerie à super-résolution peut permettre de mieux comprendre les mécanismes d'agrégation de protéines au sein des radeaux lipidiques (Yan et al., 2018).

L'utilisation de vésicules géantes de la membrane plasmique (GPMV) peut aussi constituer une alternative intéressante et faciliter l'étude des radeaux lipidiques, qui ont une taille limitée par la diffraction et ne sont stables que de manière transitoire. En effet, l'une des principales caractéristiques des GPMV est leur capacité à subir une démixtion en fonction de la température, qui conduit à la formation de domaines liquides macroscopiques de type radeau lipidique. Ces domaines peuvent ensuite être visualisés à l'aide d'approches classiques de microscopie à fluorescence (Fricke et al., 2022).

I.3.2.4- Diffusion latérale

La diffusion latérale est un mécanisme clé qui module rapidement le nombre et l'agrégation des récepteurs aux synapses, suite à des changements d'activité. Ce phénomène est essentiel dans les processus de transmission synaptique et de plasticité (Choquet and Triller, 2013). Les récepteurs alternent constamment entre des périodes de diffusion Brownienne en dehors des synapses, et une diffusion ralentie aux synapses. Ils sont capturés et confinés aux synapses par des interactions avec les molécules d'échafaudage post-synaptique, qui ancrent ces récepteurs au cytosquelette. Une diminution de la densité des protéines d'échafaudage aux synapses et/ou des interactions plus faibles entre les récepteurs et les protéines d'échafaudage augmente la diffusion des récepteurs des synapses vers la périphérie, et par conséquent réduit l'agrégation et l'efficacité synaptique.

KCC2 étant agrégé de façon similaire à proximité des synapses excitatrices et inhibitrices, plusieurs travaux dans l'équipe se sont penchés sur le rôle de la diffusion latérale de KCC2 sur sa distribution subcellulaire et sa fonction. Par le biais d'une technique de suivi de particule unique, utilisant des nanoparticules fluorescentes appelées quantum dots (QD-SPT), ces travaux ont montré que KCC2 présente bel et bien une diffusion de type Brownienne en dehors des synapses. En revanche, celle-ci est ralentie dans les agrégats à proximité des synapses excitatrices et inhibitrices (Chamma et al., 2013, 2012). Cependant, KCC2 s'échappe des agrégats plus rapidement au niveau des synapses inhibitrices, qu'au niveau des synapses excitatrices, ce qui reflète des contraintes moléculaires plus fortes à proximité des synapses excitatrices.

Comme indiqué précédemment, KCC2 interagit avec l'actine au niveau des synapses excitatrices via la protéine de liaison 4.1N (Chamma et al., 2013), tandis qu'il interagit avec la géphyrine aux synapses inhibitrices (Al Awabdh et al., 2022). Cela suggère donc que l'interaction de KCC2 avec l'actine serait plus forte que celle avec la géphyrine. De plus, l'ensemble de ces résultats montre que KCC2 suit un mécanisme de diffusion-capture semblable à celui des récepteurs aux neurotransmetteurs.

I.3.2.5- Phosphorylations

La stabilité membranaire de KCC2 et son activité peuvent être modulées par le niveau de phosphorylation de résidus situés sur ses domaines N-terminal et C-terminal (Figure 8). La phosphorylation de certains de ces résidus est connue pour augmenter l'expression, la stabilité et/ou la fonction du transporteur (phosphorylations activatrices), tandis que la phosphorylation d'autres sites va avoir l'effet opposé (phosphorylations inhibitrices).

Parmi les phosphorylations activatrices les plus étudiées, on trouve la phosphorylation de la sérine 940 (S940) par la PKC. Celle-ci augmente l'expression membranaire et la fonction du transporteur dans des cellules HEK293 et des neurones hippocampiques (Lee et al., 2007). De façon intéressante, la phosphorylation de la S940 et le clivage du CTD médiée par la calpaïne sont négativement corrélées dans des neurones hippocampiques en culture (Chamma et al., 2013). Il est intéressant de noter que deux régions constituées d'une séquence Proline/E (glutamate)/Serine/Threonine (PEST) sont situées à proximité de cette S940. Ces séquences ont été suggérées comme pouvant constituer des motifs reconnus par des protéines impliquées dans la dégradation médiée par la calpaïne (Mercado et al., 2006b). D'autres sites sont aussi connus pour être phosphorylés par la PKC (T34, S728, T787 et S1034) mais l'effet de leur phosphorylation sur KCC2 reste inconnu.

À l'inverse, parmi les phosphorylations inhibitrices, on trouve les phosphorylations des résidus thréonine 906 et 1007 (T906, T1007). Celles-ci semblent diminuer la stabilité et l'expression membranaire de KCC2, aussi bien dans des neurones immatures (Friedel et al., 2015b) que dans des neurones matures (Heubl et al., 2017). En accord avec ces observations, la majorité du KCC2 membranaire est déphosphorylée sur les résidus T906/T1007 dans des conditions basales (Friedel et al., 2015b; Heubl et al., 2017; Rinehart et al., 2009). Une étude, via l'utilisation de souris KI chez lesquelles les résidus T906 et T1007 sont mutés en alanine, suggère que ces phosphorylations réguleraient directement l'activité intrinsèque de transport de KCC2, sans changer son expression membranaire (Moore et al., 2018).

Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour identifier l'impact de la phosphorylation de ces résidus sur l'expression membranaire et la fonction du transporteur.

La phosphorylation de la T1007 est médiée par WNK1 et ses effecteurs SPAK et OSR1 (de Los Heros et al., 2014; Zhang et al., 2016). La T906, quant à elle, n'est pas phosphorylée par SPAK ou OSR1 dans différents modèles (de Los Heros et al., 2014; Zhang et al., 2016). De plus, la nature de la kinase reste inconnue (Zhang et al., 2016).

Il est intéressant de noter que des travaux dans l'équipe ont montré que l'inhibition de WNK1 réduit la phosphorylation de la T906 (Heubl et al., 2017). Cette observation confirme des résultats obtenus dans la littérature, qui montrent l'implication de cette kinase dans la phosphorylation de ce résidu (de Los Heros et al., 2014; Rinehart et al., 2009). La phosphorylation de la T906 n'impliquant pas les kinases SPAK/OSR1, il est possible que WNK1 phosphoryle directement ce résidu, ou qu'une kinase intermédiaire soit impliquée.

Étant donné que KCC2a, mais pas KCC2b, possède un domaine de liaison à SPAK/OSR1 (Figure 8), on pourrait s'attendre à ce que la régulation de l'activité de transport de KCC2 via la voie WNK/SPAK existe uniquement pour KCC2a. Cependant, la plupart des études sur la voie WNK-SPAK ont été faites sur le variant KCC2b, soulevant la question de l'essentialité du motif de liaison dans la régulation de KCC2 par WNK-SPAK. Une étude récente propose que KCC2a, ainsi que KCC2b, peuvent être régulées par SPAK. Néanmoins, la présence d'un site d'interaction direct sur KCC2a, suggère qu'il serait plus strictement régulé par la voie WNK-SPAK (Markkanen et al., 2017).

L'utilisation d'anticorps reconnaissant des protéines phosphorylées au niveau des résidus tyrosine permet de mettre en évidence que KCC2 est phosphorylé au niveau de ces résidus dans des cellules HEK-293 (Lee et al., 2010) et dans des neurones hippocampiques en culture (Lee et al., 2010; Wake et al., 2007b; Watanabe et al., 2009). Il est intéressant de noter qu'aucune phosphorylation de ces résidus n'est observée par Lee et al., 2010 dans des cellules HEK-293, ou des neurones hippocampiques en culture, en absence de sodium pervanadate, un inhibiteur à large spectre des tyrosines phosphatases. Cela suggère que l'activité basale des tyrosines phosphatase est élevée dans ces cellules.

En utilisant le serveur NetPhos 2.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/) permettant de prédire les sites phosphorylés de KCC2, dont les sites tyrosines, Lee et al., 2010 ont identifié deux sites d'intérêts : Y903 et Y1087.

Étant donné qu'il n'existe pas d'anticorps dirigé contre des résidus tyrosines spécifiques de KCC2, l'approche idéale pour estimer leur rôle consiste à les muter. Les résidus peuvent ainsi être mutés en phénylalanine pour mimer un état déphosphorylé, ou en alanine pour mimer un état phosphorylé. Lee et al., 2010 ont ainsi mis en évidence que la mutation de la Y903, ou de la Y1087, en phénylalanine (Y903F et Y1087F), réduit le niveau de pTyr de KCC2 d'environ 52% et 70% respectivement. Cela met en évidence que ces sites sont les principaux sites tyrosine phosphorylés de KCC2 dans des cellules HEK-293 (Lee et al., 2010). Les auteurs montrent ensuite que la double mutation Y903F/Y1087 augmente l'expression de surface et l'expression totale de KCC2, suggérant que la phosphorylation de ces résidus favorise la dégradation du transporteur. Ils ont également mis en évidence, sur des neurones en culture, que PP2, un inhibiteur des kinases de la famille Src, réduit la phosphorylation des résidus tyrosines et augmente l'expression totale et membranaire de KCC2. En plus de ces kinases, la voie de signalisation impliquerait les mAChRs, dont l'activation avec du carbachol augmente la phosphorylation des résidus tyrosine (Lee et al., 2010).

En comparaison avec ces travaux, Wake et al., 2007b ont montré, dans des neurones en culture, qu'un stress induit par du H_2O_2 réduit l'expression membranaire et totale de KCC2 et conduit à une dépolarisation du E_{GABA}. Ces effets passent par une diminution de la phosphorylation des résidus tyrosines de KCC2 et sont bloqués par l'ajout de sodium orthovanadate, un inhibiteur des tyrosines phosphatases.

Une étude dans la même équipe montre deux ans plus tard que l'inhibition des tyrosines kinases avec de la génistéine (un inhibiteur à large spectre), ou avec de la lavendustine A (un inhibiteur spécifique des EGFR), dans des neurones hippocampiques en culture, ou des cellules GT1-7 transfectées avec KCC2, réduit l'agrégation et la fonction de KCC2. De plus, cela n'implique pas de modification de l'expression totale ou membranaire du transporteur (Watanabe et al., 2009). Ils montrent également que la mutation de la Y1087 en aspartate (Y1087D) dépolarise E_{GABA}, réduit l'agrégation de KCC2, mais ne change pas l'expression membranaire du transporteur dans des cellules GT1-7. De façon intéressante, cette mutation réduit également l'oligomérisation du transporteur.

De manière surprenante, les auteurs utilisent ici une mutation aspartate pour mimer l'effet d'une inhibition des tyrosines kinases (et donc une déphosphorylation de la Y1087), alors qu'elle est habituellement utilisée pour mimer un état phosphorylé.

Il est donc fort probable que l'effet observé avec la mutation en aspartate, dont la structure est très différente d'un résidu tyrosine, soit davantage lié à une perturbation de la structure tridimensionnelle de KCC2, plus qu'à un effet lié au niveau de phosphorylation du transporteur.

Enfin, des travaux étudiant le rôle d'APP sur KCC2 ont révélé qu'APP limite la phosphorylation des résidus tyrosines et l'ubiquitinylation de KCC2, ce qui prévient la dégradation du transporteur (Chen et al., 2017), suggérant là aussi un effet positif des pTyr.

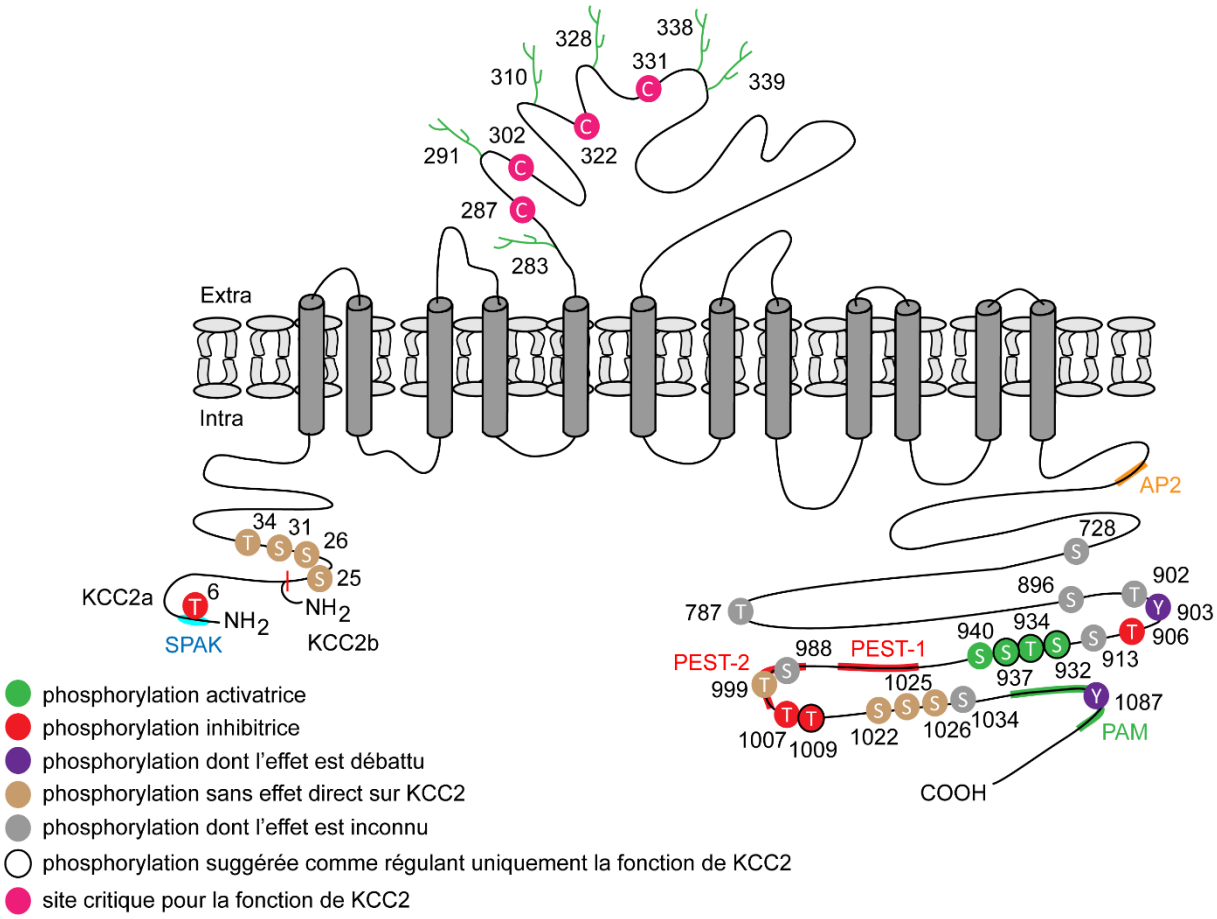


Figure 8. Principaux sites de phosphorylation et de régulation de KCC2.

Les principaux sites de phosphorylation et sites régulateurs de KCC2 sont représentés. Les phosphorylations régulant positivement l'expression, la stabilité membranaire, l'agrégation et/ou la fonction du transporteur sont représentées en vert. Les phosphorylations régulant négativement ces mêmes paramètres sont représentées en rouge. Les phosphorylations dont l'effet est débattu sont en violet. Les phosphorylations qui n'ont pas d'effet direct sur KCC2 en marron et les phosphorylations dont l'effet est inconnu en gris. Les séquences régulatrices sont aussi présentes telles que les domaines de liaison à AP2 et PAM et les séquences Proline/E/S/T (PEST). Les domaines N-terminaux de KCC2b et KCC2a sont représentés. Ce dernier contient un site de liaison à la kinase SPAK. Le domaine extracellulaire entre les domaines transmembranaires 5 et 6 contient de nombreux sites de glycosylation nécessaires à l'adressage membranaire de KCC2 et des résidus cystéine, critiques pour la fonction de transport de KCC2. Adapté de Côme et al., 2019.

En résumé, certaines études mettent en évidence un effet positif des pTyr sur l'expression et la fonction de KCC2 (Chen et al., 2017; Wake et al., 2007b; Watanabe et al., 2009), tandis que l'étude de Lee et al., 2010 montre des résultats complétements opposés. Cela est probablement lié au fait que l'étude de la phosphorylation des résidus tyrosine de KCC2 est très compliquée de par le faible niveau de phosphorylation au niveau basal et l'absence d'anticorps spécifiques. De plus, l'utilisation de tyrosine kinases ou tyrosine phosphatases à large spectre rend les résultats difficilement interprétables, étant donné l'expression ubiquitaire de ces kinases et leur implication dans la régulation de nombreuses autres protéines. La mutagénèse dirigée présente des résultats intéressants, mais la diversité des modèles d'études et des conditions expérimentales dans les études actuelles ne permettent toujours pas de conclure quant à l'effet des résidus Y903 et Y1087 sur KCC2.

D'autres sites de phosphorylations de KCC2 ont été identifiés dans des études de phospho-protéomique à large échelle : S31, S913, S932, S988, T999 (Cordshagen et al., 2018a), S25, S26, T34, S937, T1009, S1022, S1025 et S1026 (Weber et al., 2014) et S896, T902, T906, et S1034 (Smalley et al., 2020). Parmi ces sites, nombreux sont ceux qui ne semblent avoir aucun effet direct sur la fonction de KCC2 (S25, S26, S31, T34, S913, S988 T999, S1022, S1025 et S1026) et l'effet de la phosphorylation de certains d'entre eux (S896, T902, T906, et S1034) sur KCC2 n'a même pas été testé.

Les sites S932, T934, S937 et T1009 en revanche sont particulièrement intéressants car, contrairement à S940, T906 et T1007, ils modulent l'activité de transport de KCC2 sans changer son expression totale ou membranaire. La phosphorylation de ces résidus induirait donc directement un changement intrinsèque de la protéine. Cependant, il est important de prendre en compte que ces études ont été effectuées sur des cellules HEK-293. De plus, l'effet de ces phosphorylations sur l'agrégation de KCC2 n'a pas été testé. Des études supplémentaires sur des neurones sont donc nécessaires pour confirmer ces résultats.

Le N-Ethylmaleimide (NEM), un composé organique dérivé de l'acide maléique, a été l'un des premiers composés décrits comme potentialisateurs du transport des KCCs (Lauf and Adragna, 2000; J. A. Payne, 1997). Son mode d'action était jusqu'à présent inconnu, mais récemment une étude a montré que le NEM augmente la phosphorylation de la S940 tandis qu'il réduit la phosphorylation de la T1007 (Conway et al., 2017a).

En comparaison, la staurosporine, un inhibiteur de protéines kinases, module l'activité de transport de KCC2 en induisant la phosphorylation de la S932 et la déphosphorylation de la T1009 (Cordshagen et al., 2018a).

Ces composés semblent aussi modifier, via un mécanisme complexe, le niveau de phosphorylation d'autres résidus, tels que les résidus S31, T34 et S932 pour le NEM et S31, T34 et T999 pour la staurosporine (Cordshagen et al., 2018a). Ces sites ne modulent pas directement la fonction du transporteur, mais favorisent, ou empêchent de façon indirecte, l'effet potentialisateur de la staurosporine et du NEM, en modifiant la conformation de KCC2.

Bien que ces résultats soient intéressants et qu'ils suggèrent que la phosphorylation d'autres résidus de KCC2 est importante pour sa fonction, il est important de prendre en compte que ces composés ne sont pas du tout spécifiques de KCC2. Le NEM est notamment connu pour inhiber la fusion des vésicules synaptiques et de transport dans les cellules (Block et al., 1988), la désumoylation des protéines (Escobar-Ramirez et al., 2015) et les déubiquitinases (Li et al., 2018). La staurosporine, quant à elle, inhibe plusieurs protéines kinases dont la PKC la protéine kinase A (PKA) et la protéine kinase G (PKG) (Gani and Engh, 2010). L'utilisation de ces composés pour potentialiser KCC2 n'est donc pas envisageable.

En résumé, de nombreux mécanismes post-traductionnels permettent de réguler l'expression à la membrane, la stabilité et la fonction de KCC2 (Figure 9). KCC2 présente une diffusion de type brownien dans la membrane extrasynaptique et subit des contraintes spécifiques au niveau des zones péri-synaptiques, dans lesquelles il est agrégé et confiné. Cette agrégation résulte probablement d'une combinaison de plusieurs facteurs :

- son accumulation dans des zones riches en cholestérol et sphingolipides (radeaux lipidiques),
- son oligomérisation,
- son interaction avec le cytosquelette d'actine, des protéines d'échafaudage (géphyrine), ou d'autres interacteurs.

In fine, l'agrégation du transporteur influence directement sa fonction. **Il y a donc un lien important entre diffusion, agrégation et fonction** (Côme et al., 2020, 2019).

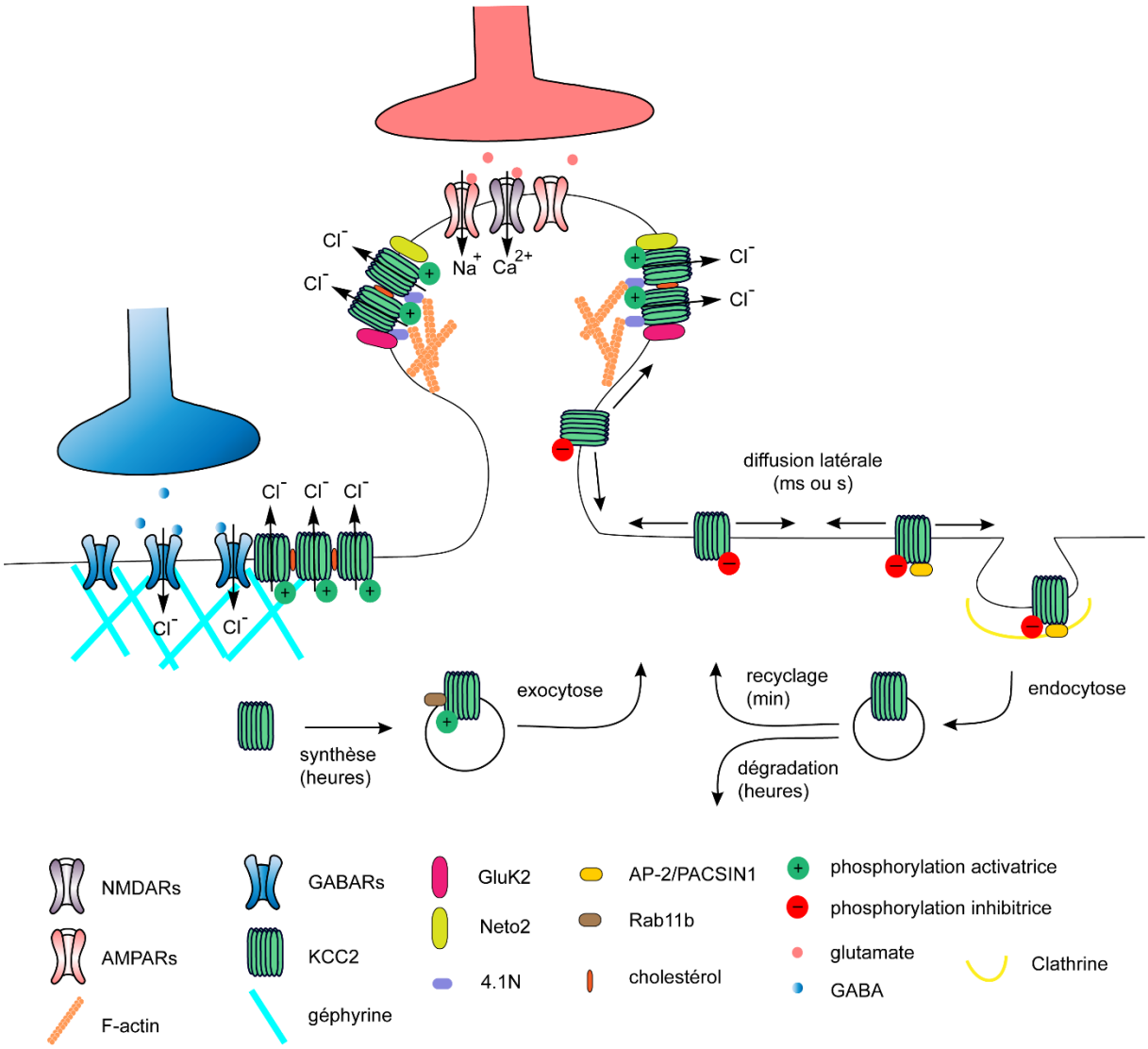


Figure 9. Régulation du trafic membranaire et de la fonction de KCC2 par la diffusion latérale, l'agrégation et l'endocytose/exocytose.

Différentes sous-populations de KCC2 sont présentes à la membrane plasmique : l'une diffusant librement dans la membrane et l'autre agrégée et parfois confinée au niveau des zones péri-synaptiques. L'agrégation de KCC2 résulte probablement de son accumulation dans des radeaux lipidiques et de son oligomérisation, ainsi que de son interaction avec le cytosquelette d'actine (via 4.1N), avec des protéines d'échafaudages telles que la géphyrine ou avec d'autres interacteurs. À l'inverse, les molécules en diffusion passive sont plus susceptibles d'interagir avec des protéines impliquées dans l'endocytose médiée par la clathrine, telles qu'AP-2 ou PACSIN1. Le confinement de KCC2 dans des agrégats peut donc prévenir son endocytose. L'équilibre entre ces deux états peut être rapidement modulé par la phosphorylation de résidus spécifiques. Les phosphorylations dites « activatrices » favorisent l'expression à la membrane du transporteur, réduisent sa diffusion, favorisent son agrégation et par conséquent sa fonction. Les phosphorylations dites « inhibitrices » ont l'effet inverse. Adapté de Côme et al., 2019.

En dehors des régions péri-synaptiques, KCC2 est plus susceptible d'interagir avec des protéines impliquées dans l'endocytose médiée par la clathrine, telles qu'AP-2 ou PACSIN1. Le transporteur peut ensuite être recyclé ou dégradé.

Enfin, la balance entre les formes agrégées et diffuses de KCC2 est fortement dépendante et rapidement modulée par le niveau de phosphorylation du transporteur. Les phosphorylations dites « activatrices » agissent en favorisant l'expression membranaire du transporteur, en réduisant sa diffusion, et en promouvant son agrégation. Cela conduit, *in fine*, à une augmentation de sa fonction. Les phosphorylations dites « inhibitrices » ont l'effet inverse.

I.3.3- Régulation de KCC2 par la transmission synaptique

I.3.3.1- Régulation par la transmission excitatrice

L'expression et la fonction de KCC2 sont rapidement régulées par l'activité neuronale dans des conditions physiologiques (Kaila et al., 1997; Kitamura et al., 2008; Woodin et al., 2003). Ce processus jouerait un rôle essentiel dans l'homéostasie de l'activité neuronale (Wang et al., 2006) et dans les fonctions liées à l'apprentissage (Fiumelli and Woodin, 2007).

Le groupe de Mu-Ming Poo a été le premier à mettre en évidence une régulation de KCC2 par les ions Ca^{2+} dans les neurones immatures (Woodin et al., 2003). Cet effet est lié aux canaux calciques dépendants du voltage (VGCCs) et à l'activité de la PKC (Fiumelli et al., 2005). Cependant, cette dernière n'a probablement pas d'activité directe sur la S940, car contrairement à ce que l'on vient de voir, elle ne stabilise pas l'expression membranaire du transporteur.

L'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire et la régulation négative de KCC2 qui en découle peut être liée à l'activation des canaux calciques dépendants du voltage (VGCCs), mais aussi des NMDARs. En effet, l'activation des NMDARs engendre un influx calcique, qui d'une part active PP1, conduisant à la déphosphorylation de la S940 de KCC2 (Lee et al., 2011b), et d'autre part, induit le clivage du CTD par la calpaïne (Puskarjov et al., 2012; Zhou et al., 2012) (Figure 10).

Ces mécanismes s'accompagnent d'une augmentation de la diffusion et d'une endocytose rapide du transporteur, conduisant à une réduction négative de l'agrégation et de la fonction de KCC2 (Chamma et al., 2013).

I.3.3.2- Régulation par la transmission inhibitrice

Bien que ces études aient montré que KCC2 peut être régulé par la transmission excitatrice, le rôle de la transmission inhibitrice sur la régulation de KCC2 est peu connu. Une étude a montré qu'une augmentation de la transmission GABAergique peut conduire à une diminution d'expression de KCC2 (Woodin et al., 2003). Cependant, cette étude a été effectuée sur des neurones immatures qui présentent des réponses GABAergiques dépolarisantes excitatrices, associées à l'activation de canaux calciques voltage dépendants et à des signaux calciques intracellulaires. Par conséquent, cette étude ne montre pas de régulation de KCC2 par la transmission inhibitrice, mais plutôt par une transmission GABAergique qui est excitatrice à ce stade de développement.

Dans l'optique d'étudier le rôle de la transmission inhibitrice sur la régulation de KCC2, un travail récent dans notre équipe a été effectué sur des neurones matures (Heubl et al., 2017). En manipulant pharmacologiquement la fonction des récepteurs $GABA_A$, il a été mis en évidence que la diffusion membranaire de KCC2, ainsi que sa stabilité, sont rapidement régulées par la transmission GABAergique. Ce mécanisme implique l'inhibition de la kinase WNK1 sensible aux ions Cl^- et la réduction des phosphorylations T906 et T1007 de KCC2 (Figure 10).

Une autre étude a aussi montré que l'activation des récepteurs $GABA_B$ métabotropiques conduit rapidement à une perte de stabilité de KCC2 (Wright et al., 2017b) (Figure 10). Ces récepteurs ne sont pas affectés par des bloquants classiques des voies de signalisation calcique, ou par des inhibiteurs des kinases et phosphatases impliqués dans la régulation de KCC2. En revanche, les auteurs ont mis en évidence une interaction entre le domaine transmembranaire de KCC2 et les récepteurs $GABA_B$. La diminution d'expression membranaire des $GABA_BR$ est ainsi corrélée à une diminution d'expression membranaire de KCC2, suggérant que ces récepteurs activés vont favoriser l'internalisation de KCC2. Ces résultats contredisent d'une certaine manière les résultats obtenus dans notre équipe, qui montrent que l'activation des $GABA_BR$ n'a pas d'effet sur la diffusion de KCC2 ni sa stabilité membranaire (Heubl et al., 2017). Cependant, ces différences peuvent s'expliquer par les modèles d'études utilisés. En effet, contrairement à ce que l'on peut observer dans les cultures de neurones dissociés (Vargas et al., 2008), l'activation des $GABA_BR$ induit leur internalisation dans les tranches organotypiques (Laffray et al., 2007).

I.3.3.3- Régulation par les récepteurs métabotropiques

En plus des récepteurs $GABA_B$, d'autres récepteurs métabotropiques ont été mis en évidence comme jouant un rôle dans la stabilité et la fonction de KCC2. Par exemple, l'activation des récepteurs glutamatergiques métabotropiques de type 1 ou de type 5 (Banke and Gegelashvili, 2008a), des récepteurs à la sérotonine de type 2A (Bos et al., 2013a) ou des récepteurs au kaïnate (Garand et al., 2019), conduit à une augmentation de la stabilité et de la fonction de KCC2. Ces récepteurs sont tous couplés à la protéine $G\alpha_q$ et leur activation conduit au recrutement calcium-dépendant de la PKC, ainsi qu'à la phosphorylation de la sérine 940 (Figure 10).

A l'inverse, comme nous avons pu le voir, l'activation intense des mAchRs semble conduire à la phosphorylation des tyrosines 903 et 1087 par la protéine kinase Src, et à la diminution d'expression de KCC2 (Lee et al., 2010). Cependant, comme discuté précédemment, ces résultats sont contradictoires avec d'autres études. En effet, ces dernières montrent que ces résidus jouent un rôle dans la modulation positive de la fonction de KCC2, sans affecter son expression membranaire dans des cellules hétérologues (Strange et al., 2000; Watanabe et al., 2009), ou des neurones (Akerman and Cline, 2006; Chudotvorova et al., 2005b; Pellegrino et al., 2011c). Le rôle de la phosphorylation de ces résidus sur la stabilité et la fonction de KCC2 reste donc à confirmer, mais il est possible que l'activation des récepteurs muscariniques induise deux mécanismes distincts, l'un entrainant la phosphorylation des résidus tyrosines et un autre la déstabilisation de la protéine, probablement via l'une des voies de signalisation mentionnées précédemment.

Enfin, de manière intéressante, l'activation de récepteurs métabotropiques peut réguler l'expression membranaire et la fonction de KCC2, sans forcément impliquer de voie de signalisation modulant le niveau de phosphorylation du transporteur. Il a ainsi été montré récemment que l'activation de récepteurs métabotropiques sensibles au zinc (mZnR/GPR39) augmente l'expression membranaire et la fonction de KCC2 dans les neurones, sans changer son niveau de phosphorylation. Ce mécanisme implique la voie des MAP kinases et l'interaction de KCC2 avec les protéines SNAP23 et syntaxin 1A (Asraf et al., 2022a) (Figure 10).

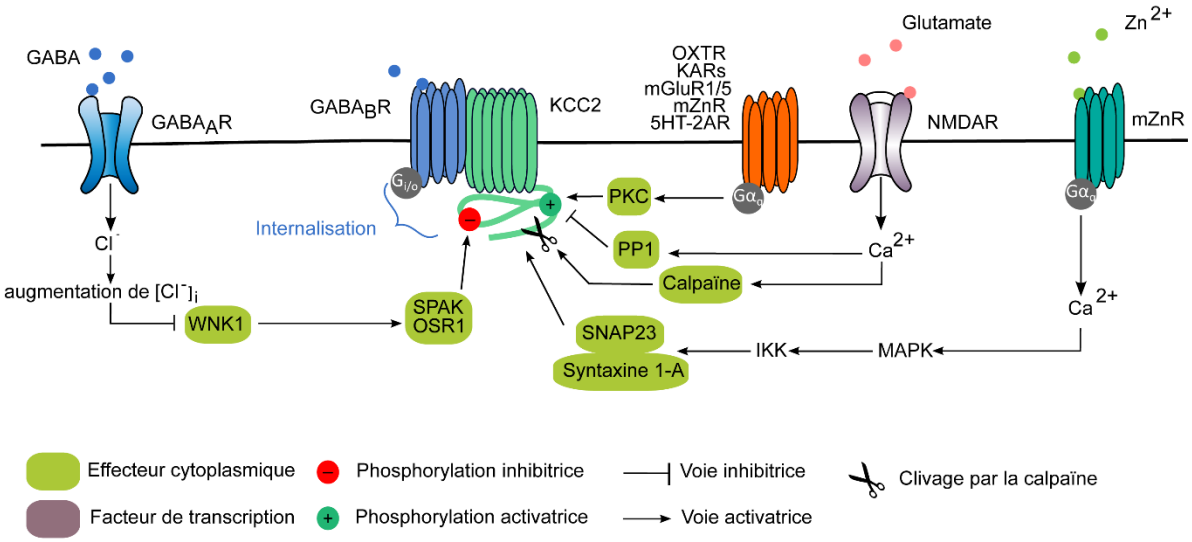


Figure 10. Voies de signalisation régulant l'expression, la stabilité membranaire et/ou la fonction de KCC2.

KCC2 est fortement régulé au niveau post-traductionnel par différentes voies de signalisation. Par exemple, les récepteurs métabotropiques au zinc augmentent la stabilité membranaire et la fonction de KCC2 via deux voies différentes : l'une impliquant la PKC et la pS940, et l'autre impliquant les protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK), et l'interaction de SNAP23 et de la syntaxine 1-A avec KCC2.

I.3.4- Régulation de KCC2 par les interactions protéiques

La stabilité membranaire de KCC2 et sa fonction peuvent être régulées par différents mécanismes post-traductionnels, dont des changements de son niveau de phosphorylation. Cependant, comme nous venons de le voir avec SNAP23, des interactions directes de différentes protéines avec KCC2 peuvent modifier son expression membranaire, son agrégation, sa diffusion, et sa fonction, sans forcément impliquer de modifications directes de son niveau de phosphorylation.

Dans la plupart des cas, ces interactions vont favoriser la stabilité membranaire du transporteur et sa fonction. C'est le cas de différentes protéines dont j'ai déjà parlé : 4.1N (Chamma et al., 2013), la sous-unité GluK2 des récepteurs du kaïnate (Kesaf et al., 2020; Mahadevan et al., 2014), la sous-unité auxiliaire Neto2 (Ivakine et al., 2013), ou Rab11b (Roussa et al., 2016b) (Figure 11). J'ai aussi montré au cours de ma thèse que KCC2 interagit directement avec la géphyrine et que celle-ci promeut son agrégation et augmente sa fonction dans des neurones hippocampiques matures (Al Awabdh et al., 2022).

La protéine associée à Myc (PAM) est également connue pour se lier au domaine C-terminal de KCC2 (Figure 8) et cette association augmente la fonction du transporteur. De plus, la mutation de la région de liaison de PAM sur KCC2 empêche l'effet potentialisateur du NEM (Garbarini and Delpire, 2008). Il est probable que PAM en s'associant à KCC2, modifie la conformation de la protéine, augmentant ainsi sa fonction. PAM semble aussi moduler directement le niveau d'expression de KCC2 via un mécanisme qui n'a pas encore été identifié (Garbarini and Delpire, 2008).

À l'inverse, l'interaction du domaine CTD de KCC2 avec AP-2 induit l'endocytose de KCC2, via un mécanisme médié par la clathrine et dépendant de la dynamine (Zhao et al., 2008b).

L'expression membranaire de KCC2 est aussi négativement régulée par son interaction avec la protéine régulatrice d'endocytose PACSIN1 (Mahadevan et al., 2017) ou avec les récepteurs $GABA_B$ (Wright et al., 2017b) (Figure 11).

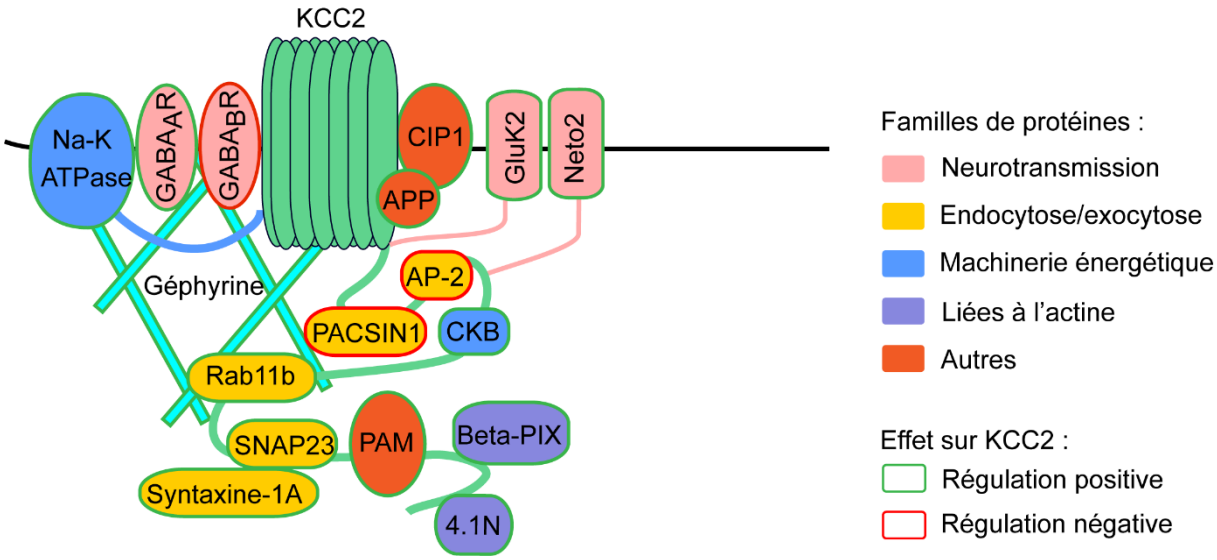


Figure 11. Partenaires de KCC2 régulant sa stabilité membranaire et/ou sa fonction.

Au niveau des synapses glutamatergiques, KCC2 interagit et est positivement régulé par le récepteur au kaïnate GluK2 et la protéine auxiliaire Neto2. L'interaction avec les récepteurs $GABA_A$ ou $GABA_B$ stabilise ou déstabilise KCC2 à la membrane respectivement. De plus, aux synapses inhibitrices, la géphyrine augmente l'agrégation et la fonction de KCC2. Cette dernière est aussi positivement régulée par son interaction avec CIP1, APP et PAM. En revanche, l'interaction de KCC2 avec PACSIN1 et AP-2 favorise son internalisation, tandis que celles avec le complexe SNAP23/Syntaxine-1A ou avec Rab11b favorisent son expression à la membrane et sa fonction. KCC2 interagit aussi avec des protéines impliquées dans la machinerie énergétique, telles que la Na^+/K^+ ATPase et CKB. Ces interactions augmentent la fonction de KCC2 mais le mécanisme sous-jacent demeure inconnu. Enfin, des protéines liées au cytosquelette d'actine, telles que beta-Pix et 4.1N, augmentent la stabilité membranaire et la fonction de KCC2 en interagissant avec son domaine C-terminal.

KCC2 interagit avec d'autres protéines et influence ainsi la fonction de ces protéines ou leur expression à la membrane, mais l'effet réciproque n'est pas forcément très clair. On peut par exemple mentionner l'interaction de KCC2 avec les canaux potassiques de fuite Task-3, dont l'expression à la membrane est dépendante de KCC2 (Goutierre et al., 2019a). De plus, des kinases interagissent aussi avec KCC2, comme la PKC (Lee et al., 2007), ou WNK, SPAK et OSR (Friedel et al., 2015b). Cependant, ces protéines semblent réguler la stabilité et la fonction de KCC2 via les mécanismes de phosphorylations mentionnés plus haut, plus que via leur interaction directe avec KCC2.

On a vu précédemment qu'il existe un lien positif entre agrégation, diffusion et fonction du transporteur. De plus, de nombreuses protéines modifient la fonction de KCC2 en jouant sur ces paramètres de stabilité membranaire. Néanmoins, certaines protéines paraissent réguler directement la fonction de KCC2.

L'activité de KCC2 est ainsi positivement régulée par CIP1 dans les cellules HEK-293 (Caron et al., 2000; Wenz et al., 2009). De façon similaire, KCC2 interagit avec la sous-unité alpha 2 de la Na-K-ATPase (Ikeda et al., 2004; Mahadevan et al., 2017), qui peut jouer un rôle dans le ciblage subcellulaire et peut-être dans la formation d'un métabolon de transport ionique (Kaila et al., 2014). KCC2 interagit aussi avec CKB, une enzyme qui régénère l'ATP en utilisant l'énergie contenue dans la phosphocréatine (Inoue et al., 2004). L'activité de CKB affecte la fonction de transport de KCC2 (Inoue et al., 2006). Cependant, là encore, le mécanisme impliqué reste à identifier.

Ce lien entre structure de KCC2 et fonction a d'ailleurs été mis en évidence dans une étude sur le rôle des résidus cystéine de la boucle extracellulaire de KCC2 (Figure 8). Cette étude révèle que la mutation de ces résidus abolit la fonction de transport de KCC2 sans modifier son expression membranaire. Cet effet implique probablement la perte de ponts disulfure et une désorganisation de la structure de KCC2 (Hartmann et al., 2010b).

En conclusion, la fonction de KCC2 est finement régulée par le niveau d'expression membranaire du transporteur, sa diffusion et son agrégation (Figure 9). Ces quatre paramètres sont modulés ensemble. D'une part, par différentes voies de signalisation (Figure 10), qui influencent principalement le niveau de phosphorylation du transporteur (Figure 8), et d'autre part, par ses interactions directes avec de nombreux partenaires moléculaires (Figure 11).

Étant donné le rôle fonctionnel de KCC2 dans le SNC et ses nombreux mécanismes de régulation, il apparait pertinent de se pencher sur les perturbations de ces processus pouvant sous-tendre l'émergence d'activités pathologiques. Une dérégulation de l'expression et de la fonction de KCC2 est notamment observée dans différentes formes d'épilepsie (voir II.3.1). Une meilleure compréhension de la pathophysiologie de ces affections et de l'implication de KCC2 dans les *rythmopathies* auxquelles elles sont associées est donc essentielle afin de concevoir d'éventuelles approches thérapeutiques ciblant ce transporteur.

II- KCC2 et pathologie

II.1- Altération de l'expression et de la fonction de KCC2 dans la pathologie

Comme on l'a vu, en parallèle de ses activités non canoniques liées aux diverses interactions moléculaires dans lesquelles il est engagé, KCC2 influence l'efficacité et la polarité de la transmission GABAergique et glycinergique. De ce fait, il a un impact sur le maintien d'une signalisation inhibitrice dans le SNC. Il n'est donc pas surprenant que des dérégulations de son expression ou de sa fonction soient observées dans de nombreuses affections neurologiques et psychiatriques liées à une perte d'inhibition (Tableau 1).

II.1.1 Spasticité et douleur neuropathique

La spasticité et la douleur neuropathique sont deux maladies fréquentes chez les personnes atteintes de lésions cérébrales, de la moelle épinière ou des nerfs périphériques. La spasticité est caractérisée par une augmentation du tonus musculaire, qui provoque des spasmes et des contractions (Nielsen et al., 2007), tandis que la douleur neuropathique est définie comme une douleur causée par une lésion ou une maladie du système nerveux somatosensoriel (Jensen et al., 2011).

L'un des éléments déclencheurs de la spasticité et de la douleur neuropathique est la réduction de l'inhibition dans les réseaux neuronaux de la moelle épinière. Celle-ci est due à la perte des projections inhibitrices corticales, mais aussi à une excitabilité intrinsèque accrue dans les réseaux sous-jacents à la lésion (Colloca et al., 2017; Corleto et al., 2015). Dans des conditions normales, l'action inhibitrice des interneurones de la moelle épinière dépend de l'activité de KCC2, qui agit en maintenant la concentration intraneuronale en ions Cl^- à des niveaux faibles.

Or, suite à une lésion de la moelle épinière ou des nerfs périphériques, le niveau d'expression de KCC2 est considérablement réduit, conduisant à un changement de polarité de la transmission GABAergique, à une réduction de l'inhibition, et *in fine*, à la spasticité (Bos et al., 2013b; Boulenguez et al., 2010b; Côté et al., 2014; Liabeuf et al., 2017; Viemari et al., 2011; Vinay and Jean-Xavier, 2008), ou la douleur neuropathique (Asiedu et al., 2012; Coull et al., 2003b; Gagnon et al., 2013b; Janssen et al., 2012; Miletic and Miletic, 2008; Okada-Ogawa et al., 2015). Dans ces conditions, restaurer pharmacologiquement la fonction de KCC2 à la suite d'une lésion limite le développement de la douleur neuropathique (Gagnon et al., 2013b), comme de la spasticité (Liabeuf et al., 2017) (voir III.2.3.1.1 et III.2.3.2.1).

Bien que la diminution d'expression de KCC2 ait été observée dans de nombreuses études sur la douleur neuropathique, ce qu'il advient de la signalisation GABAergique et glycinergique reste controversé. En effet, des études évaluant le nombre d'interneurones inhibiteurs, les niveaux de GABA, d'acide glutamique décarboxylase (GAD), de transporteur vésiculaire au GABA, ainsi que le nombre de $GABA_AR$ donnent des résultats contradictoires (Bráz et al., 2012; Castro-Lopes et al., 1995, 1993; Eaton et al., 1998; Ibuki et al., 1997; Lorenzo et al., 2014; Moore et al., 2002; Polgár et al., 2005; Polgár and Todd, 2008; Satoh and Omote, 1996; Scholz et al., 2005).

Dans l'une de ces études, une diminution des terminaisons GABAergiques a été observée dans la corne dorsale de la moelle épinière (SDH), à la suite d'une lésion des nerfs périphériques (PNI) (Lorenzo et al., 2014). Cependant, aucune donnée quantitative n'a été obtenue sur la nature et le degré d'expression des récepteurs aux synapses de la SDH.

Dans ce sens, et pour combler cette lacune, une étude a effectué une analyse quantitative détaillée des $GABA_AR$ et des récepteurs de la glycine (GlyR), présents au niveau des sites postsynaptiques inhibiteurs des neurones de la SDH (Lorenzo et al., 2020). Les auteurs ont observé que la diminution du nombre de synapses inhibitrices sur les neurones SDH, après PNI, est associée à une augmentation du nombre de $GABA_AR$ au niveau des synapses restantes, sans aucun changement dans le nombre de GlyRs synaptiques. De plus, un changement dans la composition des sous-unités des $GABA_AR$ est également observé, avec un nombre plus important de $GABA_AR$ contenant les sous-unités α2, 3. Cette observation est intéressante car elle permet de comprendre l'effet analgésique de benzodiazépines ne ciblant pas les $GABA_AR$ α1 (Knabl et al., 2008).

Pathologie	Dérégulation de l'expression des CCCs	Altération de l'inhibition	Article
Spasticité	Diminution de l'expression de KCC2	Dépolarisation de l'E_{IPSP} et réduction de la force inhibitrice	Boulenguez et al 2010
		Réduction de la force inhibitrice	Liabeuf et al 2017
Douleur neuropathique	Diminution de l'expression de KCC2	Dépolarisation de l'E_{anion} et inversion de la polarité des réponses GABAergiques/glycinergiques	Coull et al 2003
		Dépolarisation de l'E_{GABA} et réduction de l'extrusion de Cl^-	Gagnon et al 2013
Schizophrénie	Augmentation du ratio d'expression NKCC1/KCC2	Non étudié	Hyde et al 2011
	Diminution de l'expression de KCC2	Non étudié	Atefimanash et al 2021
Autisme	Diminution de l'expression de KCC2	Réduction de la driving force des courants GABAergiques et inversion de la polarité des réponses GABAergiques	Tyzio et al 2014
Syndrome de Rett	Augmentation du ratio d'expression NKCC1/KCC2	Non étudié	Duarte et al 2013
	Diminution de l'expression de KCC2	Réduction de la conductance inhibitrice et dépolarisation de l'E_{Cl-}	Banerjee et al 2016
		Réduction de la driving force des $GABA_AR$ et inversion de la polarité des réponses GABAergiques	Lozavaya et al 2019
Huntington	Augmentation du ratio d'expression NKCC1/KCC2	Dépolarisation de l'E_{GABA} et inversion de la polarité des réponses GABAergiques	Dargaei et al 2018
Alzheimer	Diminution de l'expression de KCC2	Réduction de la driving force des courants GABAergiques et inversion de la polarité des réponses GABAergiques	Laghostena et al 2010
Trisomie 21	Augmentation de l'expression de NKCC1	Dépolarisation de l'E_{Cl-}	Deidda et al 2015
Ischémie cérébrale	Augmentation puis diminution de l'expression de KCC2	Non étudié	Papp et al 2008
	Diminution de l'expression de KCC2	Augmentation de $[Cl^-]_i$	Galeffi et al 2004
Trauma cérébral	Diminution de l'expression de KCC2	Réponses GABAergiques dépolarisantes	Shulga et al 2008
Stress chronique	Diminution de l'expression de KCC2	Dépolarisation de l'E_{GABA}	MacKenzie & Maguire 2015
Hypertension	Diminution de l'expression de KCC2	Dépolarisation de l'E_{GABA} et inversion de la polarité des réponses GABAergiques	Choe et al 2015
VIH	Diminution de l'expression de KCC2	Réduction de la force inhibitrice	Barbour et al 2020, 2021
Epilepsie	Diminution de l'expression de KCC2	Réponses GABAergiques dépolarisantes	Huberfeld et al 2007
		Dépolarisation de l'E_{GABA}	Barmashenko et al 2011

Tableau 1. Pathologies associées à une altération du ratio d'expression NKCC1/KCC2.

Une diminution de l'expression de KCC2 ou une altération du ratio d'expression NKCC1/KCC2 est observée dans de nombreuses pathologies. Ces altérations sont souvent associées à des perturbations de la polarité ou de la force de la transmission inhibitrice. Une liste non exhaustive des articles révélant ces altérations est incluse dans ce tableau.

Il est intéressant de noter qu'au-delà de modifications du nombre de $GABA_AR$ ou de la nature des sous-unités, la polarité des transmissions GABAergique et glycinergique semble évoluer dans le cas d'une lésion du nerf sciatique. Ainsi, même si elles sont excitatrices dans les phases initiales et de développement de la douleur neuropathique, elles redeviennent inhibitrices 3 jours après la lésion (Morita et al., 2008). Ces résultats seraient en faveur d'une diminution initiale d'expression de KCC2 et donc d'un rôle de la protéine dans l'initiation, et/ou le développement de la douleur neuropathique.

En accord avec cette hypothèse, la diminution d'expression de KCC2 induite par l'injection d'un petit ARN interférent conduit à de l'allodynie pendant un mois alors que le niveau d'expression de la protéine revient à la normale une semaine après l'injection (Kitayama et al., 2016).

Cette diminution d'expression de KCC2 serait dépendante de la voie BDNF/TrKB, présentée précédemment (Boulenguez et al., 2010b; Coull et al., 2005) (voir I.3.1). En complément de ces résultats, une étude a montré que la voie BNDF/TrKB serait régulée par les transporteurs au zinc de type 1 (ZnT1) présents dans les astrocytes (Kitayama et al., 2016). La lésion partielle du nerf sciatique conduirait à une diminution d'expression de ZnT1 et à l'augmentation de $[Zn^{2+}]_i$, ce qui favoriserait la production de BDNF, via une voie de signalisation impliquant la PKCα, NFκB (Nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells), IL-6 et la PKA.

Il est intéressant de noter que cette augmentation de $[Zn^{2+}]_i$ peut aussi augmenter l'expression de KCC2 indépendamment de la voie BDNF/TrKB (Chorin et al., 2011). Cette autre voie impliquerait les récepteurs métabotropiques du Zn^{2+}. Même si cela n'a pas été démontré, il est envisageable qu'il s'agisse de la voie présentée précédemment et impliquant les protéines SNAP23 et Syntaxine-1A (Asraf et al., 2022b) (voir I.3.3.3).

II.1.2- Maladies psychiatriques et neurodégénératives

Une altération de la transmission GABAergique et donc de la balance excitation/inhibition a également été observée dans de nombreuses maladies psychiatriques, telles que la schizophrénie, l'autisme, le syndrome de Rett, la maladie de Huntington et le syndrome de Down (Le Magueresse and Monyer, 2013; Serranilla and Woodin, 2021). Cette altération serait là encore liée à une perturbation du niveau d'expression de NKCC1 et KCC2.

Une augmentation du ratio d'expression NKCC1/KCC2 a ainsi été observée dans différentes régions cérébrales de patients schizophrènes (Hyde et al., 2011b; Kalkman, 2011; Sullivan et al., 2015), et plus récemment dans un modèle développemental de schizophrénie (Atefimanash et al., 2021). De plus, une telle augmentation semble être également impliquée dans les troubles du spectre autistique (Tyzio et al., 2014a).

Des variants rares de KCC2 qui affectent les sites CpG ont d'ailleurs été trouvés chez des patients autistiques, ce qui suggère un dérèglement épigénétique de KCC2 (Merner et al., 2015). En complément de ces études, des dérégulations des niveaux d'expression de ces deux transporteurs ont été observées dans un modèle souris du syndrome de microdélétion 22q11.2 (Amin et al., 2017), un syndrome associé avec des risques plus élevés de schizophrénie et d'autisme.

KCC2 est détecté dans le liquide cérébrospinal et de telles mesures ont révélé un niveau plus faible de détection chez des patientes atteintes du syndrome de Rett, par rapport à des sujets contrôles (Duarte et al., 2013b; Hinz et al., 2019). Ces résultats sont complémentaires de ceux montrant une diminution de l'expression de KCC2 dans des modèles souris de la pathologie (MeCP2-KO) (Banerjee et al., 2016a; El-Khoury et al., 2014; Lozovaya et al., 2019; Scaramuzza, 2021).

Cette diminution d'expression serait liée à des changements du niveau d'expression des récepteurs au facteur de croissance 1 ressemblant à l'insuline (IGF-1) et des OxTR (Gigliucci et al., 2021). De manière surprenante, une étude a montré que l'expression de KCC2 et sa fonction ne sont pas affectées chez des souris KO MeCP2, alors que le niveau de phosphorylation du transporteur est plus élevé (Belaïdouni et al., 2021). Cet apparent paradoxe pourrait s'expliquer par le fait que les auteurs ont étudié la fonction de KCC2 uniquement dans les neurones de CA3 alors que les niveaux d'expression et de phosphorylation du transporteur ont été observés sur l'hippocampe entier.

Des modifications du niveau d'expression de KCC2 et/ou de NKCC1 ont également été observées dans différentes maladies neurodégénératives, telles que la maladie de Huntington (Dargaei et al., 2018b) ou la maladie d'Alzheimer (Lagostena et al., 2010; Zhou et al., 2021). Cela n'est pas surprenant, étant donné qu'APP module l'expression et la fonction de KCC2 (Chen et al., 2017b; Shen et al., 2022b).

II.1.3- Autres pathologies

Bien que les maladies ci-dessus soient les plus fréquemment citées lorsqu'une diminution d'expression de KCC2 est évoquée, d'autres pathologies sont également associées à une modification des niveaux d'expression des CCCs et à une perturbation de la transmission inhibitrice.

Une étude a ainsi mis en évidence une augmentation d'expression de NKCC1, associée à une dépolarisation de E_{Cl}-, dans un modèle souris Ts65Dn du syndrome de Down (Deidda et al., 2015).

Une réduction de l'expression de KCC2 est observée dans le cas d'ischémies cérébrales (Galeffi et al., 2004; Papp et al., 2008). Il est intéressant de noter que Papp et al., 2008 ont tout d'abord observé une augmentation, puis une diminution de l'expression de KCC2, respectivement 6 h et 48 h après l'événement ischémique. Les auteurs suggèrent que l'augmentation d'expression de KCC2 pourrait être liée à l'augmentation d'expression du facteur de transcription Egr4 (Uvarov et al., 2006), tandis que la diminution pourrait s'expliquer par l'augmentation progressive de BDNF à la suite de l'évènement ischémique (Lindvall et al., 1992; Takeda et al., 1993).

Une diminution d'expression de KCC2 est également observée dans des modèles animaux de trauma cérébraux (Lizhnyak et al., 2019; Shulga et al., 2008), de stress chronique (MacKenzie and Maguire, 2015), d'hypertension (Choe et al., 2015), ainsi que dans des neurones primaires humains infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et dans un modèle souris de cette pathologie (Barbour et al., 2021, 2020).

Enfin, des altérations du niveau d'expression, de la fonction des CCCs, et de la polarité de la transmission GABAergique, sont observées dans différentes formes d'épilepsie (voir II.3.1). Parmi elles, les épilepsies du lobe temporal font l'objet de cette thèse. Avant d'explorer plus en détail ces observations, nous allons faire le point sur les différentes formes d'épilepsie et leur pathophysiologie.

II.2- Epilepsie(s)

II.2.1- Définitions et classification des crises et des épilepsies

L'épilepsie est l'une des maladies neurologiques parmi les plus courantes, touchant environ 65 millions de personnes dans le monde (Ngugi et al., 2010), et contribuant de façon significative à la charge mondiale de morbidité des troubles neurologiques (GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators, 2016). C'est une maladie chronique caractérisée par une prédisposition à des crises spontanées et récurrentes, et qui présente de nombreuses conséquences neurobiologiques, cognitives et psychosociales (Fisher et al., 2014).

Une crise d'épilepsie est associée à un changement de comportement transitoire, qui peut se traduire par des signes objectifs ou des symptômes subjectifs (tels qu'une perte de conscience, un raidissement, des convulsions, une sensation qui monte de l'abdomen à la poitrine, une odeur de caoutchouc brûlé ou du déjà vu) et qui est causé par une synchronisation et/ou une excitation anormale d'une population neuronale (Devinsky et al., 2018).

On distingue 3 types de crises : les crises d'origine généralisée, les crises d'origine focale et les crises d'origine inconnue (Figure 12) (Fisher et al., 2017). Comme leur nom l'indique, les crises généralisées sont liées à l'hyperactivité d'un réseau étendu de neurones corticaux ou sous-corticaux, tandis que les crises focales (ou partielles) vont concerner un réseau restreint de neurones. À noter que les crises généralisées affectent les deux hémisphères cérébraux, tandis que les crises focales sont unilatérales. De plus, il est intéressant de souligner que les crises d'origine focale peuvent se propager et évoluer vers une crise tonico-clonique bilatérale (et donc généralisée) (Fisher et al., 2017).

Les crises focales, généralisées et d'origine inconnues peuvent être associées à des manifestations motrices et non motrices (Figure 12) (Fisher et al., 2017). Parmi les formes motrices des crises généralisées, on retrouve les crises tonico-cloniques, cloniques, myocloniques, atoniques et des combinaisons de ces crises (myoclono-tonico-clonique, myoclono-atonique) (Fisher et al., 2017). Les crises cloniques sont caractérisées par des spasmes rythmés, contrairement aux crises myocloniques qui ne présentent que quelques spasmes sans rythme particulier (Liyanagedera and Williams, 2017). Les crises atoniques, quant à elles, sont caractérisées par une augmentation accrue du tonus musculaire ou une raideur musculaire (Liyanagedera and Williams, 2017).

Les crises généralisées tonico-cloniques (GTC, anciennement appelées « grand mal ») sont des crises généralisées qui consistent en des raidissements suivis de secousses de tous les membres, accompagnés de perte de conscience (Liyanagedera and Williams, 2017).

De manière plus précise, ces crises GTC se déroulent en trois phases successives chez l'homme ("Sémiologie des crises épileptiques," 2016) :

- La phase tonique (20 à 30 secondes) qui comporte une vocalisation, une perte de conscience, une contraction tonique soutenue axiale et des membres, une apnée avec cyanose, des troubles végétatifs importants (tachycardie, augmentation de la tension artérielle, mydriase, rougeur du visage, hypersécrétion bronchique et salivaire)
- La phase clonique (20 à 30 secondes) qui comporte des secousses bilatérales, synchrones, intenses, s'espaçant progressivement.
- La phase résolutive (ou post-critique) de quelques minutes qui comporte une altération profonde de la conscience, une hypotonie généralisée, une respiration qui reprend de façon ample et bruyante (stertor).

Les spasmes épileptiques sont une autre forme motrice de crise généralisée. Ils se manifestent par une extension ou une flexion soudaine des extrémités, maintenue pendant plusieurs secondes, puis se reproduisent par bouffées (Goldstein and Slomski, 2008). Les spasmes épileptiques peuvent survenir à tout âge ; lorsqu'ils commencent au cours de la première année de vie, ils constituent un syndrome appelé spasmes infantiles (syndrome de West) (Goldstein and Slomski, 2008).

Parmi les formes non-motrices de crises généralisées on retrouve les crises d'absence (anciennement appelées « petit mal ») qui sont marquées par une altération et/ou une atténuation de la conscience (Liyanagedera and Williams, 2017). Ces crises d'absence sont caractérisées chez les patients par un regard fixe et une absence de réaction aux stimuli verbaux externes, parfois accompagnés de clignements des yeux ou de hochements de tête (Liyanagedera and Williams, 2017). Il peut donc y avoir malgré tout une composante motrice (Liyanagedera and Williams, 2017). Cependant, il s'agit souvent d'automatismes ou de contractions peu intenses. Les crises d'absence sont classées en différents types selon les symptômes cliniques (Liyanagedera and Williams, 2017). Les crises d'absence atypiques présentent davantage de mouvements saccadés ou automatiques que la crise d'absence typique et durent plus longtemps (Liyanagedera and Williams, 2017).

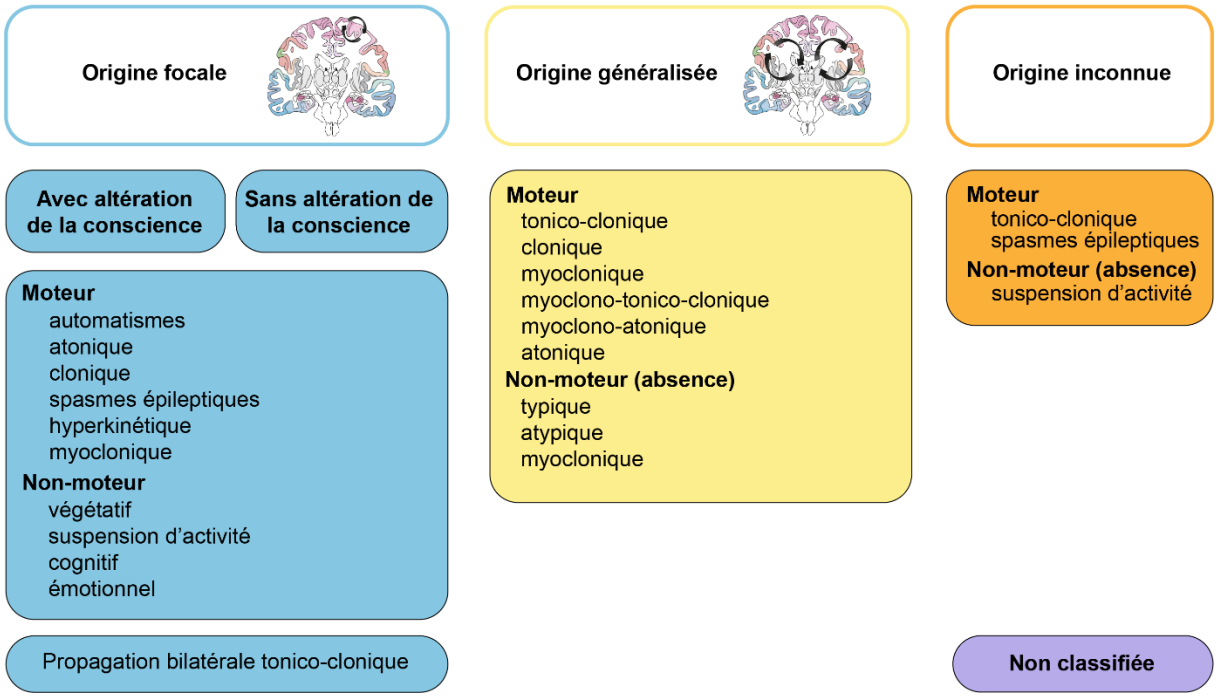


Figure 12. Classification des crises.

Schéma basé sur la classification de 2017 de la ligue internationale contre l'épilepsie (ILAE). Les crises épileptiques peuvent être classées en crises focales, généralisées ou d'origine inconnue. Les crises focales peuvent être divisées en crises avec altération de la conscience (anciennement crises partielles complexes) ou sans altération de la conscience (anciennement crises partielles simples). Les crises focales, généralisées et d'origine inconnue peuvent prendre des formes motrices et non motrices. Les catégories motrices et non motrices sont divisées en fonction des caractéristiques qui peuvent être présentes pendant les crises, comme les automatismes et les myoclonies. Les crises focales comprennent les crises qui évoluent vers des crises tonico-cloniques bilatérales (anciennement appelées crises tonico-cloniques secondairement généralisées). Adapté de Devinsky et al., 2018 ; illustrations de Carole Fumat.

Contrairement aux crises généralisées, les crises focales sont caractérisées par leur caractère paroxystique, leur brièveté et leur stéréotypie ("Sémiologie des crises épileptiques," 2016).

On distingue les crises focales avec altération de la conscience (le patient est incapable de répondre normalement à un stimulus verbal ou tactile) de celles sans altération de la conscience ("Sémiologie des crises épileptiques," 2016).

Les manifestations cliniques des crises focales sont quant à elles dépendantes de l'aire corticale impliquée (Stafstrom and Carmant, 2015). Par exemple, une crise focale ayant lieu dans le lobe occipital peut se manifester par des phénomènes visuels ; celle provenant du gyrus précentral par une activité motrice rythmique, clonique ou tonique ; et celle provenant du gyrus postcentral, par des symptômes sensoriels, tels que des paresthésies (Stafstrom and Carmant, 2015). Les crises ayant lieu dans le lobe temporal sont quant à elles souvent dyscognitives (Stafstrom and Carmant, 2015).

De plus, elles peuvent être précédées d'une *aura*, c'est-à-dire d'une crise focale au cours de laquelle le patient conserve sa conscience et décrit des symptômes moteurs, sensoriels, autonomes ou psychiques (Stafstrom and Carmant, 2015).

Au-delà du classement des crises, il existe une classification des épilepsies (syndromes épileptiques) (Stafstrom and Carmant, 2015). En effet, il n'existe pas « une » épilepsie mais « des » épilepsies. Celles-ci étaient auparavant classées selon leur site d'apparition (généralisé ou focal) et leur étiologie, à savoir selon que la cause était connue (symptomatique) ou non (idiopathique). Très récemment, une nouvelle classification des syndromes épileptiques a été mise en place (Wirrell et al., 2022). Un syndrome épileptique fait maintenant référence à un "un ensemble caractéristique de manifestations cliniques et EEG, souvent accompagné par des résultats étiologiques spécifiques (structurels, génétiques, métaboliques, immunitaires et infectieux)." (Wirrell et al., 2022).

L'épilepsie de deux patients différents peut ainsi être regroupée sous le même syndrome épileptique s'il y a en commun un type de crise, l'âge d'apparition, des résultats d'EEG, des facteurs de déclenchement, des caractéristiques génétiques, un pronostic, ou une réponse aux traitements anti-épileptiques (TAEs) (Wirrell et al., 2022). Les épilepsies réflexes sont par exemple un groupe de syndromes épileptiques pour lesquelles un certain événement déclencheur ou stimulus va provoquer une crise (Okudan and Özkara, 2018). Une forme courante d'épilepsie réflexe est l'épilepsie photosensible, pour laquelle les crises sont déclenchées par des flashs lumineux (Okudan and Özkara, 2018). Cependant, d'autres stimuli simple (toucher, mouvement) ou complexes (lecture, écriture,…) peuvent déclencher des crises (Okudan and Özkara, 2018).

La liste de syndromes épileptiques peut être longue mais à titre d'exemple il est possible de les classer selon 3 axes correspondant respectivement à l'étiologie, le type de crise et l'âge de début (Figure 13) ("Sémiologie des crises épileptiques," 2016).

Le syndrome de Lennox-Gastaut par exemple est une encéphalopathie épileptique sévère qui débute chez l'enfant généralement avant 8 ans. Celle-ci est caractérisée par une triade de déficience intellectuelle et de multiples types de crises convulsives (Arzimanoglou et al., 2009). Ce syndrome peut être causé par une lésion ou une malformation cérébrale (Arzimanoglou et al., 2009).

En comparaison, l'épilepsie primaire de la lecture commence habituellement chez l'adolescent ou le jeune adulte et les crises vont être provoquées par la lecture (Hanif and Musick, 2021). Ce syndrome épileptique suit un mode de transmission autosomique dominant avec une pénétration incomplète (Hanif and Musick, 2021).

L'avantage de la classification sous forme de syndromes épileptiques réside dans le fait qu'elle permet de faciliter le choix du traitement antiépileptique, de formuler un pronostic évolutif de l'épilepsie, et d'un éventuel handicap psychiatrique ou cognitif associé. De plus, elle permet avant toute chose d'orienter la recherche étiologique, c'est-à-dire de déterminer quelle peut être la cause de l'épilepsie.

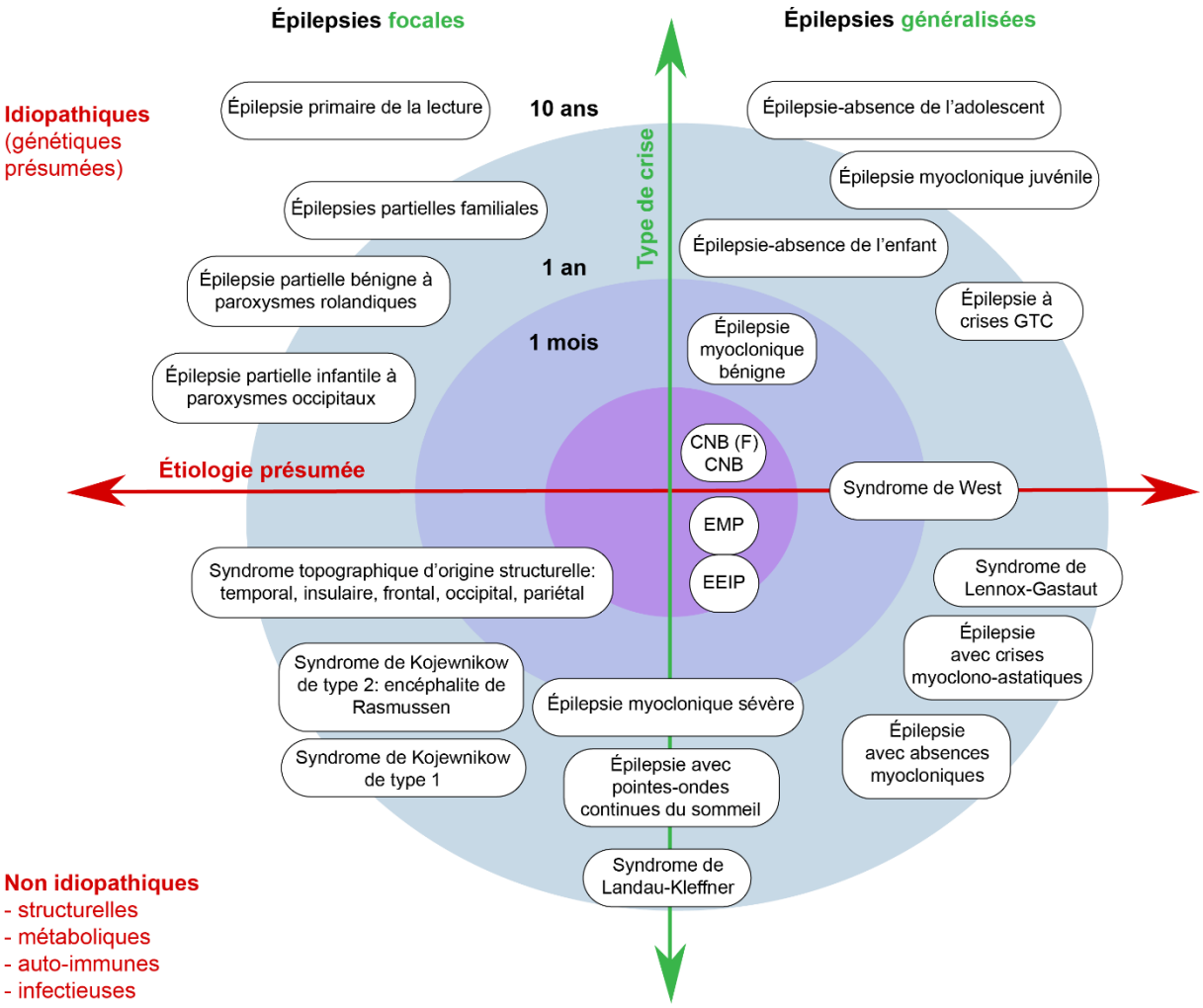


Figure 13. Classification des syndromes épileptiques.

Classification des syndromes épileptiques selon l'étiologie, le type de crise et l'âge de début. CNB(F) : convulsions néonatales bénignes (familiales) ; EMP : épilepsies myocloniques progressives ; EEIP : encéphalopathie épileptique infantile précoce, crises GTC : crises généralisées tonico-cloniques. D'après "Sémiologie des crises épileptiques," 2016.

II.2.2- Physiopathologie des épilepsies

Les causes d'épilepsie sont multiples, variables en fonction de l'âge, et inconnues pour la moitié des personnes atteintes d'épilepsie (idiopathique).

L'épilepsie peut être liée à un défaut d'origine structurelle, c'est-à-dire une lésion cérébrale. Cette dernière peut être la conséquence de différents évènements traumatiques tels qu'un accident vasculaire cérébral, un traumatisme crânien, une crise fébrile ou liée à la présence d'une tumeur cérébrale. Elle peut aussi être liée à des malformations lors du développement (Devinsky et al., 2018). C'est le cas par exemple des malformations du développement cortical (MCD), qui sont des anomalies du cortex cérébral résultant d'une formation anormale de la plaque corticale (Kuzniecky, 2015). Parmi les formes les plus courantes de MCD, on distingue la dysplasie corticale focale (FCD), qui est caractérisée par une désorganisation de l'architecture corticale avec cytomégalie des neurones et des cellules gliales et qui se manifeste par une épilepsie focale sévère (Kabat and Król, 2012).

Au sein d'une cohorte de patients épileptiques atteints de FCD, des chercheurs de l'équipe de Stéphanie Baulac, à l'Institut du Cerveau, ont montré qu'un tiers de ces patients présentent une mutation dans le gène codant pour la cible de la rapamycine chez les mammifères (MTOR), au niveau de l'acide désoxyribonucléique (ADN) des cellules de la lésion cérébrale. De manière intéressante, ces mutations sont somatiques, c'est-à-dire qu'elles sont détectées uniquement dans certaines cellules du cerveau et sont absentes du sang, et du reste de l'organisme (la mutation n'a pas été héritée et ne sera pas transmise). En collaboration avec d'autres chercheurs Européens, l'équipe a également identifié des mutations germinales dans MTOR (présentes dans toutes les cellules de l'organisme), chez des patients avec épilepsie focale avec ou sans malformation cérébrale (Møller et al., 2016). De plus, des mutations dans des gènes contrôlant la voie MTOR, telle que Depdc5, avaient également été identifiées au préalable dans une famille avec une épilepsie focale (Ishida et al., 2013).

Cette étude nous amène à un point important qui est que l'épilepsie semble avoir une composante génétique dans certains cas (Helbig et al., 2016). Des études ont ainsi révélé que les traumatismes, l'hypoxie et les lésions vasculaires peuvent altérer la fonction des canaux ioniques et entraîner une modification de la transcription, provoquant ainsi des canalopathies acquises (Berkovic et al., 2006; Bernard et al., 2004). Les mutations héritées et acquises sont toutes deux importantes pour la génétique de l'épilepsie.

Des études de jumeaux suggèrent ainsi que l'héritabilité de l'épilepsie est comprise entre 25% et 70% (Miller et al., 1998). Une étude plus récente a rapporté que l'héritabilité est de 32% pour toutes les épilepsies, de 23% pour les épilepsies focales et de 36% pour les épilepsies non focales (Speed et al., 2014).

Les analyses de liaison génétique et du génome entier ont permis d'identifier, sur les chromosomes, des régions (loci) de susceptibilité à l'épilepsie (Abou-Khalil et al., 2018) et des variantes génétiques communes. Ces analyses ont également permis de dépister des variantes du nombre de copies (CNV) associées aux épilepsies. Ces CNV sont des délétions ou des duplications >1 kb *de novo* ou héritées, qui sont de plus en plus reconnues comme sources de mutations génétiques chez les patients épileptiques (Mullen et al., 2013; Olson et al., 2014). Les recherches récentes en génétique ont aussi permis d'identifier un nombre important de gènes impliqués dans les formes aussi bien monogéniques que polygéniques d'épilepsie (Poduri and Lowenstein, 2011). Cependant, d'autres gènes impliqués dans une proportion considérable d'épilepsies familiales doivent être identifiés pour élucider complètement l'étiologie de l'épilepsie. Une revue essaye d'ailleurs de regrouper l'ensemble des connaissances sur ce sujet (Chen et al., 2017). Ces travaux liant épilepsie et génétique sont d'un intérêt tout particulier et des recherches supplémentaires sont encore nécessaires, afin d'imaginer, dans un futur proche, des interventions spécifiques par thérapie génique (Thomas and Berkovic, 2014).

Enfin, il est important de noter que l'épilepsie peut aussi avoir une origine infectieuse (infection cérébrale bactérienne, virale, ou parasitaire, telle que la neurocysticercose), métabolique (hyperammoniémie, hypoglycémie, déficience en transporteur GLUT1), immune (sclérose en plaques et encéphalite auto-immune) ou inconnue (Scheffer et al., 2017).

II.2.3- Mécanismes d'épileptogenèse

À la suite de la lésion cérébrale, une phase d'épileptogenèse va se mettre en place. L'épileptogenèse décrit le processus par lequel un cerveau sain se transforme en cerveau épileptique, capable de générer des crises spontanées. Ce processus ainsi que la fréquence et la gravité des crises spontanées peuvent évoluer sur plusieurs semaines dans les modèles animaux et pendant des années chez l'homme (Dudek and Staley, 2011; Pitkänen et al., 2015). Les mécanismes de l'épileptogenèse comprennent des altérations complexes au niveau cellulaire, structurel, moléculaire, génétique et épigénétique, qui vont conduire à un dysfonctionnement des circuits neuronaux.

Ces mécanismes vont affecter l'apparition, la sévérité ou la progression des crises spontanées, les modifications histopathologiques ou les comorbidités. De plus, il est important de noter que l'épileptogenèse peut continuer et progresser après la première crise spontanée (Dudek and Staley, 2011; Pitkänen et al., 2015). Un certain nombre de ces mécanismes ont été observés dans des modèles animaux d'ELT (voir MM.4.1.4) et validés dans le tissu réséqué de patients atteints d'ELT. Ces mécanismes sont résumés en Figure 14 et certains d'entre eux sont développés ci-dessous.

II.2.3.1- Changements morphologiques et cellulaires

Parmi ces changements morphologiques et cellulaires, la sclérose de l'hippocampe est fréquemment observée (Blümcke et al., 2012). Elle se caractérise par une perte neuronale sélective, affectant principalement les cellules pyramidales dans CA1 et CA3, et les cellules moussues dans le hilus (Blümcke et al., 2000). D'autres régions, telles que CA2 et la couche des cellules granulaires (CCG), sont épargnées (Blümcke et al., 2013; Schmeiser et al., 2017a, 2017b). Cependant, cette dernière présente deux changements pathologiques distincts. Premièrement, une dispersion de la CCG est observée (de 70-100 µm en conditions physiologiques à 200 µm dans le cas de l'épilepsie) (Houser, 1990). Cette dispersion de la CCG est en partie due à une perte d'expression de la reeline, une protéine de la matrice extracellulaire (Orcinha et al., 2016). Deuxièmement, les axones des cellules granulaires, également appelés fibres moussues (FM), n'innervent plus les cellules moussues dans le hile, en raison de la mort de ces dernières (Buckmaster, 2012). En revanche, les fibres moussues projettent vers l'arrière, à travers leur propre couche cellulaire d'origine, et forment des connexions synaptiques excitatrices avec les cellules granulaires et différents interneurones inhibiteurs dans la couche moléculaire interne (Puhahn-Schmeiser et al., 2021).

L'effet de ce bourgeonnement des fibres moussues sur l'excitabilité du réseau est encore débattu. Certaines études suggèrent que les connexions des FM sur les cellules granulaires, constituant les cellules prédominantes du gyrus denté, conduisent à un effet net excitateur (Buckmaster, 2012; Franck et al., 1995; Isokawa et al., 1993; Represa et al., 1993; Scharfman, 1995; Sundstrom et al., 1993). Cependant, l'activation des interneurones inhibiteurs par les FM est suffisante pour aller à l'encontre de l'excitation des cellules granulaires (Bischofberger et al., 2006). De plus, 10 fois plus de connexions inhibitrices sont observées dans la couche granulaire en comparaison aux synapses excitatrices (Puhahn-Schmeiser et al., 2021).

Cela renforce l'idée de différentes études qui suggèrent plutôt un effet inhibiteur net des FM (Colder et al., 1996; Khazipov and Holmes, 2003; Puhahn-Schmeiser et al., 2021; Sloviter et al., 2006).

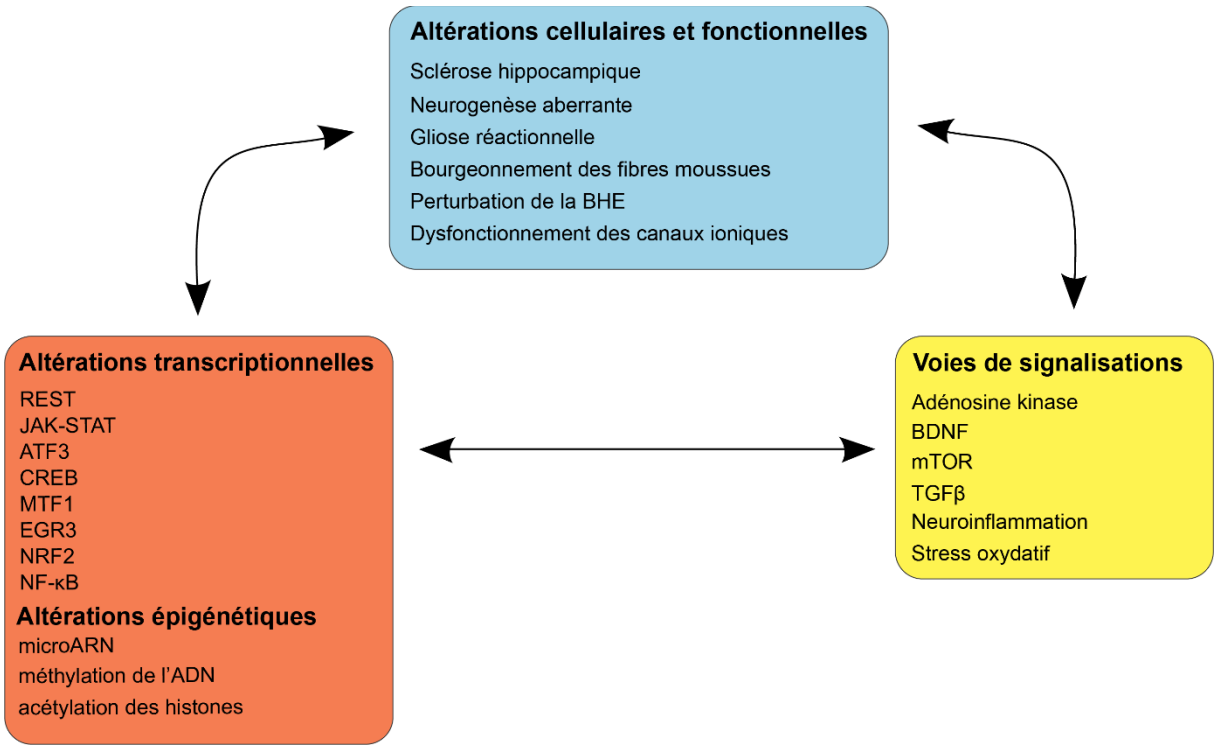


Figure 14. Mécanismes d'épileptogenèse.

Représentation schématique des altérations qui se produisent dans le cerveau au cours de l'épileptogenèse. Ces données sont issues de différents modèles animaux d'épilepsie acquise ou génétique. Les altérations cellulaires comprennent des modifications phénotypiques et fonctionnelles des neurones, de la glie, et des vaisseaux sanguins, ces derniers pouvant entraîner une dérégulation de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Les macrophages circulants passent ainsi dans le parenchyme cérébral, contribuant à l'inflammation et à la perte de cellules neuronales. En parallèle, les changements transcriptomiques et épigénétiques, ainsi que les voies moléculaires associées, contribuent à modifier les canaux ioniques et les récepteurs, ce qui favorise l'hyperexcitabilité neuronale. Ces changements diminuent le seuil de crise, contribuant ainsi à l'apparition et à la progression de l'épilepsie. BDNF, facteur neurotrophique dérivé du cerveau ; CREB, protéine de liaison à l'élément sensible à l'AMPc ; EGR3, protéine de réponse à la croissance précoce 3 ; JAK, Janus kinase ; MTF1, facteur de transcription régulateur des métaux 1 ; MTOR, cible de la rapamycine chez les mammifères ; NF-κB, facteur nucléaire-κB ; NRF2, facteur nucléaire 2 lié aux érythroïdes ; REST, facteur de transcription silencieux RE1 ; STAT, transducteur de signal et activateur de transcription ; TGFβ, facteur de croissance transformant-β. D'après Devinsky et al., 2018.

Le bourgeonnement des FM est probablement favorisé par des altérations de l'expression de différentes protéines, telles que la neuromoduline, le BDNF, les protéines de la matrice extracellulaire (Heck et al., 2004) ; et par une perturbation de la voie MTOR (Hester and Danzer, 2014).

La rapamycine (un inhibiteur de MTOR) permet d'ailleurs de supprimer le bourgeonnement des fibres moussues dans différents modèles d'épilepsie (Buckmaster and Lew, 2011; Zeng et al., 2009). Ce bourgeonnement est également lié à la neurogenèse des cellules granulaires. En effet, le stade de développement des cellules granulaires nouvellement formées détermine leur contribution au bourgeonnement des fibres moussues après une lésion épileptogène (Parent and Kron, 2012; Ribak et al., 2012).

Cette neurogenèse est altérée dans l'ELT. Elle est ainsi favorisée à la suite de l'induction d'épilepsie, revient à la normale 3 à 4 semaines après, et diminue en phase chronique (Parent and Kron, 2012). L'importance de la neurogenèse dans le développement de l'épilepsie a été confirmée par plusieurs études, dont une qui montre que l'ablation de la neurogenèse adulte pendant l'épileptogenèse entraîne une réduction de la fréquence des crises en phase chronique (Cho et al., 2015). Cette neurogenèse, en plus de jouer un rôle sur le bourgeonnement des fibres moussues, est également associée à d'autres altérations cellulaires. Des neurones granulaires nouvellement formés migrent ainsi de façon aberrante dans le hilus ou dans la couche moléculaire (Dashtipour et al., 2001; Hattiangady et al., 2004; Parent et al., 2006, 1997; Scharfman et al., 2000). Ces cellules ectopiques sont trouvées dans des modèles d'épilepsie chez les rongeurs (Dashtipour et al., 2001; Parent et al., 1997; Scharfman et al., 2000) et dans l'hippocampe humain épileptique (Houser, 1990; Parent et al., 2006). Ces cellules ont été montrées comme étant hyperexcitables (Scharfman et al., 2000) car elles sont connectées par les FM et ont moins d'entrées inhibitrices sur leur soma et leurs dendrites proximaux que les cellules granulaires (Dashtipour et al., 2001; Pierce et al., 2005).

De manière similaire à la dispersion des cellules en grains du gyrus, l'une des causes proposées de la migration aberrante est la perte de la Reelin, qui est exprimé dans l'hippocampe des rongeurs adultes (Gong et al., 2007). Les neurones nouvellement formés développent également des dendrites basales dans l'hilus, qui forment des synapses asymétriques avec les FM, créant potentiellement des circuits récurrents excitateurs (Spigelman et al., 1998). Ces cellules, dotées de longues dendrites basales et recevant des entrées excitatrices excessives, pourraient être des cellules centrales hub ou superhubs impliquées dans la genèse et la propagation de l'activité épileptiforme (Hadjiabadi et al., 2021; Morgan and Soltesz, 2008).

Une gliose réactive se produit également dans la zone épileptogène du tissu cérébral de patients épileptiques et dans des modèles d'épilepsie génétiques et lésionnels (Devinsky et al., 2013). Les modifications du phénotype des cellules gliales qui en découlent semblent liées à l'épileptogenèse (Ortinski et al., 2010; Robel et al., 2015). Les astrocytes présentent ainsi plusieurs altérations moléculaires susceptibles de favoriser l'hyperexcitabilité du réseau neuronal. Une régulation à la baisse de l'expression des connexines, des transporteurs au glutamate, des canaux potassiques (par exemple, Kir4.1), des CCCs et de certaines aquaporines est par exemple observée (Devinsky et al., 2013; Robel et al., 2015).

De plus, une diminution de l'activité de la glutamine synthétase (qui convertit le glutamate en glutamine) et une augmentation de l'activité de l'adénosine kinase (AK) dans les astrocytes soutiendraient l'émergence de crises spontanées (Boison, 2016; Robel et al., 2015). Enfin, les astrocytes activés libèrent des gliotransmetteurs et des cytokines, qui augmentent la synchronisation du réseau neuronal (Steinhäuser et al., 2016).

L'activation de la microglie est l'un des événements cellulaires les plus précoces de l'épileptogenèse et est détectée dans les minutes qui suivent le début de l'état épileptique (Eyo et al., 2017). Elle a ainsi été impliquée dans la neurodégénérescence induite par les crises (Eyo et al., 2017) et peut également activer les astrocytes et moduler l'activité neuronale dans l'épilepsie (Eyo et al., 2017). La microglie et les astrocytes activés libèrent par exemple des cytokines, des chimiokines et des signaux de danger qui entraînent une hyperexcitabilité neuronale (Aronica and Mühlebner, 2017; Vezzani et al., 2011), contribuant à l'épileptogenèse.

Il est intéressant de noter que malgré cette implication de la microglie dans l'épileptogenèse, l'administration de minocycline (un puissant inhibiteur de la microglie) n'a aucun effet antiépileptogène chez des rats dont l'épilepsie a été induite électriquement, mais présente des effets bénéfiques dans un modèle pilocarpine d'épilepsie (Russmann et al., 2016; N. Wang et al., 2015). Etant donné que la microglie a des fonctions aussi bien pathogènes que réparatrices (Benson et al., 2015), le blocage sélectif des fonctions microgliale néfastes est essentiel pour tenter d'arrêter l'épileptogenèse.

Un dysfonctionnement de la barrière hématoencéphalique (BHE) est également observé et fréquent chez des modèles animaux et des patients atteints d'épilepsies acquises ou structurelles et est associé au développement de l'épilepsie chez des modèles animaux (Bar-Klein et al., 2017; Weissberg et al., 2015).

II.2.3.2- Modifications transcriptomiques et épigénétiques

Les gènes sont exprimés de manière différentielle au cours de l'épileptogenèse, et des enregistrements électrophysiologiques de tissus épileptogènes provenant de modèles animaux ont révélé des voies moléculaires communes (Dingledine et al., 2017; Pitkänen et al., 2015). Des mécanismes transcriptionnels et épigénétiques contribuent aux altérations de certains récepteurs et canaux ioniques dépendant du voltage.

Par exemple, une augmentation de la transcription des canaux calciques de type T à faible seuil (tels que les canaux Cav3.2), au cours de l'épileptogenèse, augmente la décharge en bouffée des neurones pyramidaux et favorise les crises. En revanche, la délétion génétique du gène codant pour ce canal calcique réduit les crises spontanées, et atténue la neuropathologie chez des souris épileptiques (van Loo et al., 2015). Dans ce sens, l'inhibition pharmacologique des canaux calciques de type T par l'éthosuximide avant le début des crises d'absence chez le rat réduit les décharges en pointes-ondes (Dezsi et al., 2013) et réduit les comportements de type dépressif (Russo et al., 2011).

Deux autres altérations touchant les canaux voltages-dépendants contribuent également aux crises. Les mutations des canaux sodiques voltages-dépendants (tels que Nav1.1 et Nav1.6) sont ainsi responsables de divers syndromes épileptiques génétiques (Catterall, 2012). De plus, la réduction de la fonction des canaux activés par l'hyperpolarisation entraîne des perturbations de l'excitabilité dendritique dans l'épilepsie (Benarroch, 2013).

Le facteur de transcription REST est, lui aussi, induit pendant l'épileptogenèse et affecte l'expression des gènes codant pour les canaux ioniques, les récepteurs, et d'autres protéines neuronales, comme les CCCs. Ainsi, le blocage de la fonction de REST atténue l'épileptogenèse (McClelland et al., 2014).

La voie de transcription impliquant les kinases Janus (JAK) et les transducteurs de signaux et activateurs de transcription (STAT) est également activée pendant l'épileptogenèse et modifie l'expression des gènes impliqués dans le cycle cellulaire et la survie neuronale. L'inhibition de la voie JAK-STAT diminue la sévérité de l'épilepsie chez le rat (Grabenstatter et al., 2014).

Les mécanismes épigénétiques affectent également l'expression des gènes durant l'épileptogenèse et comprennent la méthylation de l'ADN, la modification des histones et l'expression des microARN (miARN) (Henshall et al., 2016; Henshall and Kobow, 2015).

L'hypométhylation de l'ADN (conduisant à l'activation des gènes) se produit dans le jour qui suit l'induction de l'épilepsie, tandis que l'hyperméthylation de l'ADN (extinction des gènes) se produit dans les modèles d'épilepsie chronique et chez les patients atteints d'ELT (Henshall and Kobow, 2015). Dans ce sens, les inhibiteurs à large spectre de la méthylation de l'ADN, et l'hypométhylation de l'ADN induite par l'adénosine, réduisent l'activité épileptique dans des tranches de cerveau de rongeurs, et atténuent la progression des crises *in vivo* (Machnes et al., 2013; Williams-Karnesky et al., 2013). L'acétylation et la phosphorylation des histones affectent également l'expression des gènes qui jouent un rôle dans l'épileptogenèse. En effet, les inhibiteurs de l'histone désacétylase (comme le valproate) (Göttlicher et al., 2001) réduisent la neurogenèse aberrante dans le gyrus denté et la neurodégénérescence dans des modèles d'épilepsie, mais leur rôle dans la génération des crises est controversé (Henshall and Kobow, 2015).

Enfin, plus de 100 miARN, y compris des miARN ciblant les épines dendritiques, les récepteurs de neurotransmetteurs, les régulateurs de transcription et la signalisation inflammatoire, sont modifiés au cours de l'épileptogenèse chez les rongeurs et dans les hippocampes des patients atteints d'ELT (Henshall et al., 2016; Iori et al., 2017). Dans ce sens, l'utilisation de molécules inhibitrices des miARN, ou d'oligonculéotides qui imitent l'action des miARN, inhibe fortement l'épileptogenèse (Iori et al., 2017; Reschke et al., 2017).

II.2.3.3- Voies de signalisation

De nombreuses voies de signalisation sont impliquées au cours de l'épileptogenèse. J'en présente seulement quelques-unes ici.

Paradoxalement, la même voie moléculaire peut avoir un effet pro-épileptogène ou antiépileptogène, en fonction du moment de l'activation de la voie et des modifications du microenvironnement tissulaire (Pitkänen et al., 2015; Varvel et al., 2015).

La signalisation du BDNF par le récepteur TrkB est par exemple impliquée dans les mécanismes d'épileptogenèse chez les rongeurs. La liaison BDNF-TrkB potentialise la neurotransmission glutamatergique et altère la fonction des synapses inhibitrices (McNamara and Scharfman, 2012). L'effet sur les synapses inhibitrices passe notamment par une modulation de la transcription des sous-unités des récepteurs $GABA_A$ dans les cellules granulaires du gyrus denté (Scharfman and Brooks-Kayal, 2014).

Le mimétisme pharmacologique ou chémogénétique de la signalisation BDNF-TrkB augmente ainsi le nombre de crises, tandis que l'inhibition de cette voie prévient les crises spontanées, évite la neurodégénérescence, corrige les déficits cognitifs, et les comportements de type anxieux, dans des modèles d'épilepsie rongeurs (McNamara and Scharfman, 2012).

Comme mentionné précédemment (voir II.2.2), la signalisation MTOR joue aussi un rôle dans l'épileptogenèse. Une hyperactivation de MTOR a été démontrée chez des patients atteints de sclérose tubéreuse complexe (STC), dans des modèles génétiques de STC, et dans des modèles d'épilepsie acquise. Dans plusieurs modèles d'épilepsie, la suppression de l'activité du complexe 1 de MTOR, à l'aide de la rapamycine, perturbe l'épileptogenèse et réduit la fréquence des crises (Way et al., 2012).

Les neurones et les astrocytes sont des sources majeures d'adénosine et les niveaux cellulaires d'adénosine sont régulés par l'adénosine kinase (Boison, 2013). L'adénosine a des propriétés anticonvulsivantes qui sont médiées par les récepteurs A1 de l'adénosine. En effet, les souris dépourvues de récepteurs A1 de l'adénosine meurent lors de l'induction de l'épilepsie (T. Li et al., 2008). Il est d'ailleurs intéressant de noter que l'expression des récepteurs A1 de l'adénosine est réduite au niveau des foyers épileptiques dans les modèles rongeurs d'épilepsie, suggérant qu'ils pourraient contribuer à l'épileptogenèse (T. Li et al., 2007). Chez la souris, l'administration transitoire d'adénosine dans le cerveau après l'apparition de l'épilepsie inhibe la progression de la maladie (Williams-Karnesky et al., 2013). Enfin, l'administration focale d'inhibiteurs des AK dans la zone épileptogène ou les interventions diététiques qui réduisent l'expression des AK (comme le régime cétogène) réduisent les crises dans les modèles animaux d'épilepsie (Boison, 2016; Masino et al., 2011).

Le dysfonctionnement de la BHE semble également impliqué dans l'épileptogenèse. En effet, ce dysfonctionnement et l'entrée de l'albumine dans le SNC, déclenche la signalisation du TGFβ dans les astrocytes. Cela provoque l'induction de médiateurs inflammatoires et la régulation négative de Kir4.1, de l'aquaporine 4 et de GLT1, un transporteur du glutamate (Cacheaux et al., 2009). Les astrocytes corticaux qui ont été exposés à l'albumine ou au TGFβ médient la synaptogenèse excitatrice (Weissberg et al., 2015) et affectent les neurones inhibiteurs en libérant des glycoprotéines, qui interagissent avec la matrice extracellulaire. Ces deux effets pourraient conduire à un état d'hyperexcitabilité (Kim et al., 2017). Dans ce sens, la réduction de la signalisation TGFβ réduit la génération de crises spontanées dans des modèles d'épilepsie acquise (Bar-Klein et al., 2014).

Une activité neuronale accrue ou une lésion cérébrale active également des réponses immunitaires innées du SNC qui favorisent la production et la libération de médiateurs inflammatoires (Aronica and Mühlebner, 2017; Xanthos and Sandkühler, 2014). Au cours de l'épileptogenèse post-lésionnelle et dans certains modèles génétiques d'épilepsie (Okuneva et al., 2015), cette neuroinflammation est associée au stress oxydatif (Rowley and Patel, 2013). En effet, les espèces réactives de l'oxygène et l'augmentation de l'activité de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase, et de la xanthine oxydase, induisent la transcription de gènes inflammatoires. De plus, elles favorisent la libération d'IL-1β et de la protéine HMGB1 par la microglie et les astrocytes (Pauletti et al., 2019). Ces molécules activent ensuite le récepteur neuronal IL-1 de type 1 et le récepteur Toll-like 4, ce qui entraîne une hyperexcitabilité (Vezzani, 2015). La neuroinflammation et le stress oxydatif ont ainsi été impliqués dans la mort neuronale, les crises, l'épileptogenèse et les comorbidités de l'épilepsie (Aronica and Mühlebner, 2017; Mazarati et al., 2017). Dans ce sens, les thérapies anti-inflammatoires ou antioxydantes ont démontré leur efficacité antiépileptique dans des études cliniques préliminaires (Ben-Menachem et al., 2000; Kenney-Jung et al., 2016).

II.2.4- Ictogenèse et activités épileptiformes

À la suite de la période d'épileptogenèse va débuter une phase chronique, caractérisée par l'émergence de crises spontanées et récurrentes. Des activités épileptiformes caractéristiques peuvent aussi être enregistrées entre les crises (activités intericales). Ces oscillations intericales ne sont associées à aucun symptôme comportemental détectable, mais des données suggèrent qu'elles peuvent altérer la mémoire (Binnie and Marston, 1992; Gelinas et al., 2016; Holmes and Lenck-Santini, 2006; Kleen et al., 2010). Les deux principaux événements intericaux observés dans l'épilepsie focale sont les pointes intericales et les oscillations à haute fréquence (HFOs) (de Curtis et al., 2012).

De nombreuses revues, dont celle de Lévesque et al., 2018 discutent des mécanismes à l'origine de la genèse de ces événements et de leur lien avec les crises. Pour ma part, j'ai choisi de discuter des événements enregistrés spécifiquement sur le tissu réséqué de patients épileptiques. Cela permet ainsi de faire le lien avec la partie MM.3 et les résultats obtenus au cours de ma thèse.

II.2.4.1- Décharges de type interictal (*interictal-like discharges*, IILDs)

Chez des patients épileptiques, des enregistrements EEG intracrâniens des structures hippocampiques révèlent généralement, entre les crises, des pointes intericales d'une durée de 50 à 300 ms (Staley and Dudek, 2006). Bien que le rôle fonctionnel de ces pointes et leur impact sur l'épileptogenèse ne soient pas parfaitement compris (de Curtis and Avanzini, 2001), elles sont fortement corrélées à l'épilepsie et constituent donc des biomarqueurs de la pathologie (Staley and Dudek, 2006).

Ces activités peuvent être enregistrées *in vitro* sur des tranches de tissu épileptique. Des décharges spontanées de type interictal sont par exemple observées dans le subiculum d'hippocampe réséqué de patients atteints d'ELT (Cohen et al., 2002a; Huberfeld et al., 2007a; Wozny et al., 2005). Cette activité correspond à une déflection du potentiel de champ d'une durée de 20-50 ms avec une amplitude allant de 20 à 200 µV. La fréquence moyenne des évènements est de 1.2 Hz, ce qui est proche de la fréquence des pics interictaux détectés en EEG de surface (1.1 Hz) ou des enregistrements EEG intracraniaux (1.3 Hz) effectués sur les mêmes patients (Cohen et al., 2002a) (Figure 15).

Ces activités sont supprimées par des bloqueurs de la transmission excitatrice glutamatergique (NBQX + APV ou CNQX + APV) et inhibitrices GABAergiques (bicuculline, gabazine ou picrotoxine) (Cohen et al., 2002a). Des enregistrements intracellulaires ont révélé que ces activités sont probablement liées à l'activité conjointe d'interneurones et d'une sous-population de cellules pyramidales du subiculum. Ces dernières n'expriment pas KCC2, présentent une altération de l'homéostasie neuronale des ions Cl^-, et donc des réponses GABAergiques dépolarisantes pendant les IILDs (Huberfeld et al., 2007a) (voir II.3.1).

L'implication d'une transmission glutamatergique et d'une transmission GABAergique dépolarisante pour la genèse des IILDs a également été observée dans le tissu péri-tumoral (Pallud et al., 2014), et dans le cortex de patients atteints de FCD (Blauwblomme et al., 2019).

Des IILDs spontanées sont aussi enregistrées dans CA2 (Wittner et al., 2009). Cependant, les mécanismes de génération de ces activités dans CA2 sont différents de ceux impliqués dans le subiculum. Bien que 2/3 des cellules de CA2 présentent des réponses GABAergiques dépolarisantes lors des IILDs, il semblerait que la genèse de ces activités dans CA2 soit davantage liée aux connections excitatrices aberrantes des fibres moussues sur les cellules pyramidales et à la perte de parvalbumine des interneurones.

En effet, cette dernière est connue pour changer les propriétés fonctionnelles des interneurones (Schwaller, 2009) et faciliterait donc l'émergence de réponses GABAergiques dépolarisantes.

Il est important de noter que les activités intericales ne sont pas exclusives aux patients épileptiques et peuvent être présentes chez un faible pourcentage de patients sans antécédents d'épilepsie (Okubo et al., 1993).

De plus, bien que l'apparition des pointes intericales dans l'EEG puisse être utilisée à des fins diagnostiques, des études menées chez des patients en pré-chirurgie souffrant de crises focales médicalement réfractaires montrent que les sites générant ces activités ne coïncident pas toujours avec la lésion épileptogène. De plus, la fréquence de ces événements ne permet souvent pas de prédire le début des crises ni leur fréquence (Gotman, 1991; Gotman and Marciani, 1985).

Ces résultats suggèrent que les activités intericales, bien que constituant des marqueurs de l'épilepsie, ne sont pas des biomarqueurs fiables de la sévérité ou de la fréquence des crises focales.

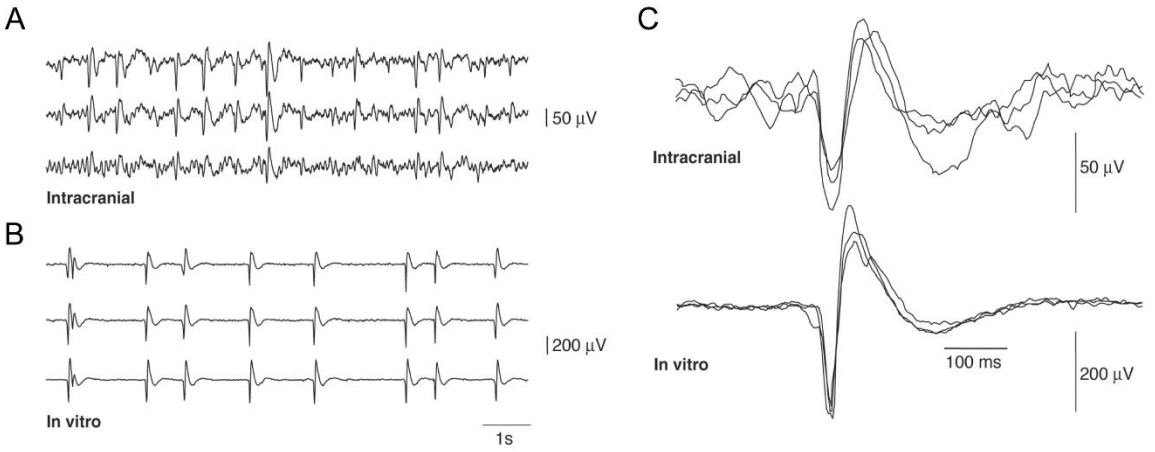


Figure 15. Similitudes entre les décharges intericales (IIDs) enregistrées *in vivo* et les décharges de type interical (IILDs) enregistrées *in vitro*.

A. IIDs enregistrées à partir de trois électrodes EEG intracrâniennes localisées dans le lobe temporal médian d'un patient atteint d'ELT. **B**. IILDs enregistrées *in vitro* sur une tranche de tissu épileptique réséqué du même patient qu'en A). La forme et la fréquence des événements est similaire à celle des IIDs en A). **C**. Superposition des événements enregistrés en intracranial ou ceux enregistrés in vitro. La forme de l'événement est similaire dans les deux cas, avec une amplitude légèrement supérieure pour les IILDs, et une durée plus importante pour les IIDs. Adapté de Cohen et al., 2002a.

II.2.4.2- Décharges de type préictal (PILDs) et ictal (ILDs)

Contrairement aux IILDs spontanées, des activités spontanées de type ictal n'ont jamais été enregistrées dans le tissu humain postopératoire. Cela est probablement lié au fait que le tissu isolé du reste du cerveau ne présente pas les neuromodulations dynamiques nécessaires à la genèse d'activités ictales. Il est cependant possible de générer ces activités en combinant les conditions suivantes (Huberfeld et al., 2011) :

1) en augmentant $[K^+]_e$ (de 4 à 6-8 mM) et en réduisant $[Mg^{2+}]_e$ (de 2 à 0.25 mM)

2) en augmentant $[K^+]_e$ (de 4 à 6-8 mM) et en augmentant $[HCO_3^-]_e$ (de 25 à 65-85 mM), tout en réduisant $[NaCl]_e$ (de 124 à 85-65 mM).

3) en réduisant $[Ca^{2+}]_e$ et $[Mg^{2+}]_e$ (de 2 à 0.5 mM) et en augmentant $[HCO_3^-]_e$ (de 25 à 65-85 mM), tout en réduisant $[NaCl]_e$ (de 124 à 85-65 mM).

$[K^+]_e$ est critique pour le maintien de l'activité neuronale. Une élévation de $[K^+]_e$ augmente l'excitabilité neuronale et affecte la plasticité, la synchronisation, ainsi que l'équilibre entre excitation et inhibition (Durand et al., 2010; Shin et al., 2010), favorisant ainsi l'émergence d'activités épileptiformes (Borck and Jefferys, 1999). Cependant, il est important de noter que des $[K^+]_e$ trop élevées (supérieures à 9 mM) ont un effet opposé en supprimant les activités de type ictal (Wang et al., 2016). Cela s'explique par l'atteinte d'un état appelé « bloc de dépolarisation », un état « silencieux » induit par l'inactivation par dépolarisation des canaux sodiques sensibles au potentiel. $[Ca^{2+}]_e$ et $[Mg^{2+}]_e$ régulent également l'excitabilité neuronale en impactant entre autres et respectivement les courants Na^+ de fuite (Lu et al., 2010), la libération de neurotransmetteur et l'activation des NMDAR (Billard, 2011).

L'utilisation de ces solutions pro-convulsivantes génère après 20-30 min des ILDs dans le subiculum, qui se propagent ensuite du subiculum vers CA1, et vers le présubiculum (Huberfeld et al., 2011) (Figure 16). Les ILDs induites dans ce tissu sont similaires aux crises observées en EEG chez des patients atteints d'ELT (Bartolomei et al., 2004; Spencer et al., 1992) ou chez des modèles animaux d'épilepsie (Bragin et al., 2005).

Il est intéressant de noter que l'activité de type ictal n'est pas enregistrée dans le gyrus denté, CA3 ou le cortex entorhinal, même si l'activité multi-unitaire est augmentée dans ces régions. Cela renforce l'idée selon laquelle le subiculum est une région particulièrement sensible à la genèse d'activités épileptiformes.

Des enregistrements intracellulaires mettent en évidence que les ILDs impliquent les signalisations GABAergiques et glutamatergiques étant donné qu'elles sont supprimées par des bloquants $GABA_AR$, AMPAR et NMDAR (Huberfeld et al., 2011). En revanche, les PILDs, précédant ces ILDs impliquent uniquement la signalisation glutamatergique. Il a ainsi été montré que les NMDAR sont nécessaires pour l'émergence des PILDs et les AMPAR pour leur maintenance (Huberfeld et al., 2011).

Il est intéressant de noter que les solutions pro-convulsivantes peuvent aussi être utilisées pour mimer la pharmacorésistance *in vitro*. Il a ainsi été montré que des tranches de tissu reséqué de patients atteints d'ELT deviennent résistantes aux anticonvulsivants utilisés en clinique, après une exposition prolongée à l'aCSF sans Mg^{2+} (Li Zhang et al., 1995).

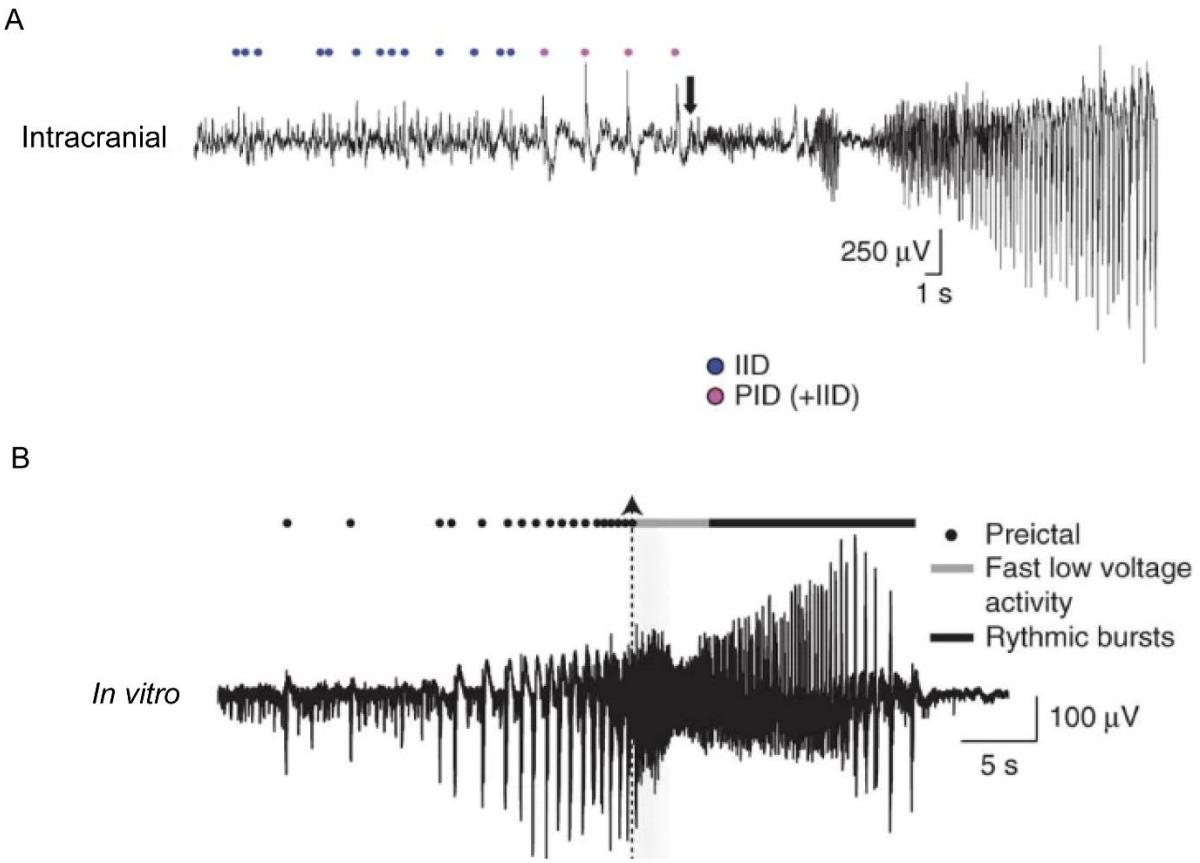


Figure 16. Similitudes entres les décharges préictales/ictales enregistrées *in vivo* et de type préictal/ictal (PILDs/ILDs) induites *in vitro*.

A. Crise enregistrée chez un patient atteint d'ELT via un enregistrement intracrânien. L'activité ictale est précédée d'activités intericales puis préictales. **B**. Activités de type préictal et ictal induites *in vitro* par application d'une solution proconvulsivante (65 mM $HCO3^-$ et 8 mM K^+) depuis une tranche d'hippocampe épileptique réséquée chez le même patient qu'en A). Adapté de Huberfeld et al., 2011.

II.2.4.3- Oscillations à haute fréquence (HFOs)

D'autres activités ont été particulièrement étudiées ces dernières années dans le contexte de l'épilepsie : les oscillations à haute fréquence (HFOs).

Les HFOs sont des potentiels de champ qui reflètent la synchronisation à court terme de l'activité neuronale. Les HFOs peuvent être divisées en plusieurs catégories : les « ripples » (80–250 Hz), les « fast ripples » (FRs, 250–600 Hz), les « very fast ripples » (VFR; 600–1000 Hz) et les "ultra-fast ripples" (UFR; 1–2 kHz). Ces activités ont été largement étudiées chez l'humain dans des conditions physiologiques et pathologiques (Bagshaw et al., 2009; Anatol Bragin et al., 1999; Brázdil et al., 2010, 2017; Engel et al., 2009; Jacobs et al., 2012; Urrestarazu et al., 2007; Usui et al., 2015; Worrell and Gotman, 2011; Worrell et al., 2004). La fréquence des HFOs est ainsi plus élevée dans les tissus épileptiques ce qui suggèrent que ces événements constituent de potentiels biomarqueurs d'épilepsie (Worrell et al., 2004).

De plus, l'intérêt de l'étude des HFOs dans le contexte de l'épilepsie est lié au fait que ces évènements sont bien plus restreints à la zone épileptogène que les activités interictales (Jacobs et al., 2008). Enfin, ces événements se produisent non seulement en période interictale, mais aussi au début des événements ictaux chez les rongeurs, suggérant que ces évènements sont associés aux mécanismes de génération des crises et ne sont pas simplement une conséquence de l'épilepsie (A. Bragin et al., 1999a; Bragin et al., 2005).

Les HFOs physiologiques sont des potentiels de champ correspondant à une sommation d'IPSPs. Ils sont générés par des sous-populations d'interneurones et régulent l'activité des cellules principales (Buzsáki and da Silva, 2012). En revanche, les HFOs épileptiques représentent le potentiel de champ formé par l'activité de cellules pyramidales anormalement synchrones (Engel et al., 2009) et d'interneurones GABAergiques (Cepeda et al., 2020; Le Van Quyen et al., 2008)

Les HFOs physiologiques et pathologiques ne peuvent malheureusement pas être différenciées en se basant sur leur taux d'occurrence étant donné que certaines régions, comme l'hippocampe, sont des générateurs d'HFOs physiologiques (Roehri et al., 2018). De plus, un problème significatif réside dans le fait que la gamme de fréquence des HFOs pathologiques se superpose à celle des HFOs physiologiques (Bragin et al., 2004).

Distinguer ces deux types d'activités reste pour le moment compliqué (Engel et al., 2009), étant donné que des analyses de fréquence et d'amplitude ne sont pas suffisantes pour permettre leur séparation (Matsumoto et al., 2013; Pail et al., 2017). Ainsi, même 20 ans après leur découverte, la question de l'utilisation des HFOs en tant que biomarqueurs de l'épilepsie, et dans la pratique clinique, reste en suspens (Roehri et al., 2018; Zijlmans et al., 2017).

Jusqu'à présent, diverses approches analytiques ont été recherchées pour distinguer les HFOs pathologiques et physiologiques. Les méthodes les plus couramment utilisées sont basées, par exemple, sur l'association des HFOs avec des décharges épileptiformes (Crépon et al., 2010; Urrestarazu et al., 2007), des ondes lentes (von Ellenrieder et al., 2017), des spindles (Bruder et al., 2017), ou encore sur la différence entre les HFOs spontanées et celles induites par une tâche cognitive (Matsumoto et al., 2013; Nagasawa et al., 2012).

II.2.5- Diagnostic et examens

Après un ou plusieurs événements paroxystiques évocateurs d'une crise épileptique, les patients subissent une évaluation clinique approfondie et un processus de diagnostic en plusieurs étapes (Figure 17) (Devinsky et al., 2018). Celui-ci comprend entre autre une évaluation des antécédents médicaux, un examen physique et neurologique, un EEG, une neuro-imagerie et d'autres examens complémentaires si nécessaires.

La première étape du diagnostic de l'épilepsie consiste à établir si l'évènement était une crise épileptique ou une crise ressemblant à une crise épileptique. En effet, de nombreuses maladies peuvent mimer les crises épileptiques et peuvent être à tort diagnostiquées comme une épilepsie (Crompton and Berkovic, 2009). On peut par exemple citer le vertige positionnel paroxystique bénin, les crises de rétention du souffle, les parasomnies (telles que le trouble du comportement en sommeil paradoxal), la narcolepsie et/ou cataplexie, les attaques de panique ou encore les crises psychogènes non-épileptiques (voir Crompton and Berkovic, 2009 pour une liste non exhaustive).

Distinguer une crise épileptique d'une « fausse » crise peut être compliqué, car cela dépend des observations des témoins, en plus d'être dépendant du contexte, des signes et de la durée de l'évènement.

La seconde étape du diagnostic va ensuite permettre de déterminer si la crise épileptique était non provoquée, réflexe (déclenchée par des facteurs environnementaux) ou symptomatique aigüe (crise qui survient à l'occasion ou à proximité d'une agression systémique ou cérébrale (Beghi et al., 2010)).

Les crises symptomatiques aiguës sont provoquées et/ou situationnelles et ne permettent pas d'émettre un diagnostic positif d'épilepsie. De plus, elles présentent un risque plus faible de crises ultérieures non provoquées qu'une crise initiale non provoquée (18.7% contre 64.8% ; (Hesdorffer et al., 2009)).

La troisième étape consiste à vérifier si les patients présentant une « première » crise sont épileptiques. Pour cela, il est important de déterminer si ces patients ont eu une ou des crises précédant cette apparente « première » crise. Une étude chez des patients ayant eu une crise épileptique montre que 11.3% d'entre eux ont eu une crise antérieure et 29.5% deux ou plusieurs crises (Firkin et al., 2015). Ces événements peuvent avoir eu lieu dans certains cas des semaines voir des années avant le diagnostic (Firkin et al., 2015; Jallon et al., 2001). Ces évènements antérieurs peuvent être des *déjà-vus* épileptiques, des hallucinations olfactives ou des crises myocloniques.

Un patient va ainsi être considéré comme épileptique s'il a eu au minimum 2 crises non provoquées ou crises réflexes séparées de plus de 24 h (Fisher et al., 2014). Cependant, il peut aussi être diagnostiqué comme épileptique s'il a eu une crise non provoquée, ou crise réflexe, et qu'il présente un risque supérieur à 60% d'avoir d'autres crises dans les 10 prochaines années (par exemple, un patient avec une lésion structurelle connue telle qu'un accident vasculaire cérébral, une lésion cérébrale traumatique grave ou une infection cérébrale (Hauser et al., 1998)). Enfin, un patient avec une crise ou plus dans un contexte bien défini de syndrome épileptique va aussi être diagnostiqué comme épileptique.

Une fois le diagnostic d'épilepsie posé, la quatrième et dernière étape consiste à classer les crises selon le ou les types de crises (Fisher et al., 2017), à définir le type d'épilepsie, et si possible, le syndrome épileptique. De plus, une estimation de l'étiologie de l'épilepsie peut être effectuée à partir de ces résultats et d'examens complémentaires.

Les examens réalisés au cours du diagnostic sont nombreux et impliquent différentes approches (Figure 17). J'en présente ici une liste non exhaustive.

J’ai déjà évoqué l’évaluation des antécédents médicaux. Le récit des patients et de témoins peut ainsi permettre d’évaluer la présence ou non de crises antérieures à la première crise.

Un autre examen est un examen physique et neurologique. Certaines caractéristiques, comme la morsure latérale de la langue, permettent de distinguer les crises épileptiques des événements non-épileptiques. En effet, la morsure latérale de la langue a été observée chez 22 individus sur 100 après des crises tonico-cloniques, mais chez 0 individu sur 47 après des crises psychogènes non-épileptiques (Brigo et al., 2012).

En parallèle, des caractéristiques dysmorphiques peuvent suggérer des syndromes génétiques. Le syndrome de Down, par exemple, est associé à des spasmes infantiles. L'asymétrie de la taille des membres ou des ongles peut suggérer, quant à elle, un accident vasculaire cérébral périnatal associé à des crises focales (Ahmed and Spencer, 2004). Des stigmates neurocutanés peuvent aussi être observés. Des « taches de vin » sont par exemple présentes sur le visage de patients atteints du syndrome de Sturge-Weber, un syndrome neurocutané congénital rare qui peut être associé à une épilepsie pharmacorésistante.

En plus de l’examen physique, tous les patients épileptiques doivent faire l'objet d'un dépistage des déficits cognitifs potentiels (tels que les problèmes de mémoire) et des troubles de l'humeur ou du comportement (tels que la dépression) et doivent faire l'objet d'une évaluation plus approfondie et d'un traitement si cela est indiqué.

Un autre examen important dans le diagnostic de l’épilepsie est l’EEG. Un EEG de routine est par exemple réalisé chez les patients présentant une première crise non provoquée ou une suspicion d'épilepsie. Il peut aider à différencier les crises épileptiques des événements non-épileptiques, à classer les types de crises et les syndromes épileptiques, et à prédire le risque de récurrence des crises (Hirtz et al., 2000; Krumholz et al., 2007). Cependant, il est important de noter que le bilan de l’EEG ne permet pas à lui seul de poser le diagnostic d’épilepsie.

Chez les adultes présentant une première crise non provoquée, l'EEG initial montre des décharges épileptiformes dans 29 % des cas (Krumholz et al., 2007). La probabilité de détecter des anomalies épileptiformes et non épileptiformes atteint 71 % lorsque l'EEG est réalisé dans les 48 heures suivant la première crise (Schreiner and Pohlmann-Eden, 2003).

Si l'EEG initial de routine est négatif, un EEG avec privation de sommeil permet de détecter des décharges épileptiformes dans un nombre de cas additionnels de 13 à 35 % (King et al., 1998; Schreiner and Pohlmann-Eden, 2003). Si l'incertitude diagnostique persiste, une surveillance EEG ambulatoire à long terme ou une surveillance vidéo-EEG en milieu hospitalier est possible.

L'interprétation des données EEG à long terme peut être facilitée par des algorithmes automatisés pour la détection des décharges épileptiformes (Ramgopal et al., 2014).

Une neuro-imagerie est aussi réalisée chez tous les patients ayant eu des crises récentes, à l'exception des personnes atteintes d'épilepsies généralisées génétiques (idiopathiques), telles que l'épilepsie d'absence infantile et l'épilepsie myoclonique juvénile (King et al., 1998; Scheffer et al., 2017). La neuro-imagerie peut aider au diagnostic et affecter les stratégies de prise en charge (Berg et al., 2009; Hakami et al., 2013). Elle peut également être utilisée pour identifier des lésions épileptogènes telles que les lésions cérébrales prénatales ou périnatales, les malformations du développement cortical, les tumeurs (Berg et al., 2009), les encéphalomalacies post-traumatique, les anomalies vasculaires et les scléroses de l'hippocampe (Hakami et al., 2013). Le scanner reste la technique de neuro-imagerie la plus utilisée en raison de sa facilité d'accès. Cependant, elle ne permet pas de bien détecter les anomalies épileptogènes, contrairement à l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Cette dernière permet de détecter une lésion épileptogène chez 14 à 35% des patients présentant des crises non provoquées nouvellement diagnostiquées (Hakami et al., 2013), alors que 57% des lésions identifiées avec l'IRM sont manquées avec le scanner (King et al., 1998). De plus le scanner présente de nombreux risques, et notamment chez les enfants, avec l'exposition prolongée aux radiations (Pearce et al., 2012).

Des examens complémentaires en laboratoire peuvent aussi être demandés, après une première crise qui semble non provoquée. Une numération formule sanguine, une évaluation de la glycémie et des taux d'électrolytes, une ponction lombaire et un dépistage toxicologique peuvent ainsi être indiqués dans certains cas (Hirtz et al., 2000; Krumholz et al., 2007).

Une recherche d'auto-anticorps peut aussi être effectuée dans de rares cas. En effet, les étiologies auto-immunes de l'épilepsie sont de plus en plus connues (Bien and Holtkamp, 2017).

Ainsi, il est connu que 11 à 35 % des patients épileptiques présentent des auto-anticorps neurologiques sériques détectables, tels que des anticorps anti-canaux potassiques dépendant du voltage, anti-récepteurs NMDA (Brenner et al., 2013; Dubey et al., 2017) ou anti-LGl1 (Baudin et al., 2022). Cependant, le lien causal entre la présence de ces auto-anticorps et la pathologie reste à établir et des études futures sont nécessaires pour déterminer si le dépistage des auto-anticorps doit être réalisé systématiquement ou pas.

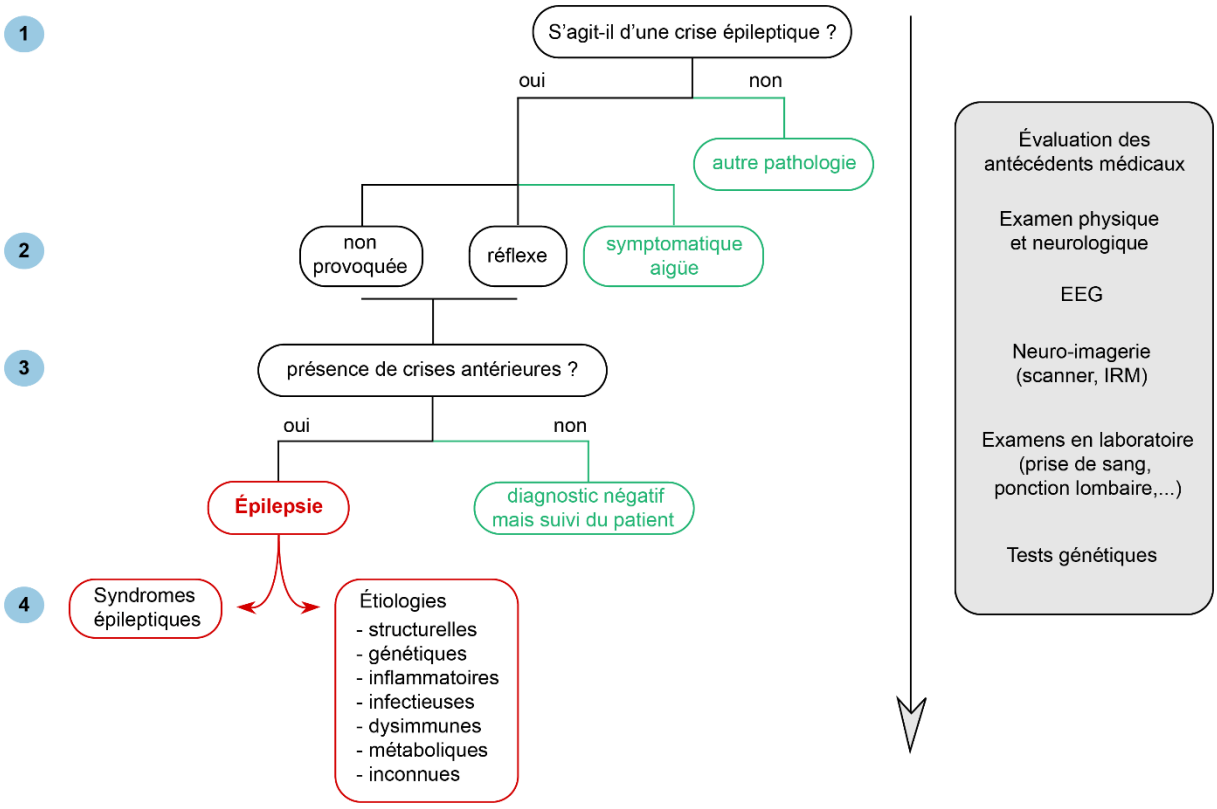


Figure 17. Étapes nécessaires au diagnostic positif d'une épilepsie.

La première étape du diagnostic de l'épilepsie vise à établir si l'évènement était une crise épileptique ou une crise ressemblant à une crise épileptique. La seconde étape permet ensuite de déterminer si cette crise était non provoquée, réflexe ou symptomatique aigüe. Les crises symptomatiques aiguës sont provoquées et/ou situationnelles et ne permettent de pas d'émettre un diagnostic positif d'épilepsie. La troisième étape consiste à vérifier si les patients présentant une première crise ont eu des crises antérieures et par conséquent s'ils sont épileptiques. La quatrième et dernière étape consiste à classer les crises selon le ou les types de crises, à définir le syndrome épileptique du patient, et à évaluer l'étiologie possible. Différents examens vont être nécessaires tout au long de ces étapes de diagnostic. Une évaluation des antécédents médicaux est ainsi réalisée en plus d'examens physique et neurologique, d'examens EEG et d'examens par neuro-imagerie. Des examens complémentaires en laboratoire ou des tests génétiques sont également possibles. D'après Devinsky et al., 2018

Enfin, grâce aux avancées dans les technologies de séquençage, de plus en plus de tests génétiques sont effectués chez les patients dans le but d'identifier des mutations associées à l'épilepsie (Poduri, 2017).

De nombreux tests sont disponibles et le choix de l'un d'entre eux va dépendre du phénotype du patient, de la disponibilité du test et de son coût (Mefford, 2015; Poduri, 2017).

Les tests génétiques sont notamment utilisés pour les encéphalopathies développementales et épileptiques, qui sont associées à de nombreux gènes causaux (McTague et al., 2016), ou pour détecter des variants génétiques (Perucca et al., 2017).

La détection de ces derniers peut affecter de manière très importante la prise en charge. Par exemple, la détection d'une mutation du gène SCN1A chez un patient souffrant d'une épilepsie du lobe temporal résistante aux traitements a conduit à l'arrêt d'un traitement de longue date à la carbamazépine (qui peut aggraver les crises dans les épilepsies liées aux mutations du gène SCN1A), ce qui a permis au patient d'être libéré de ses crises (Perucca et al., 2017).

II.2.6- Traitements antiépileptiques (TAEs) : mécanismes d'action et effets secondaires

Les TAEs visent à prévenir l'émergence, la propagation et à réduire la sévérité des crises épileptiques. Ces traitements sont souvent pris entre une et quatre fois par jour et peuvent être pris pendant des années, voire toute la vie du patient. Le choix du traitement va dépendre entre autre du syndrome épileptique, du type de crises, du profil pharmacocinétique, des effets indésirables, de l'âge du patient et de son coût (Glauser et al., 2013). Un traitement efficace peut réduire la mortalité (Faught et al., 2008; Ryvlin et al., 2018) tandis qu'un traitement inapproprié peut au contraire conduire à une augmentation de la fréquence des crises et ainsi être associé à une augmentation du taux de blessures et de mortalité (Faught et al., 2008). Une bonne connaissance des mécanismes d'action des différents TAEs et de leurs effets secondaires est donc essentielle.

II.2.6.1- Mécanismes d'action des TAEs

Les TAEs actuels ont pour but de réduire de manière générale l'hyperexcitabilité neuronale observée dans l'épilepsie. Pour cela, différentes cibles sont possibles (Rogawski and Löscher, 2004) (Figure 18).

Plusieurs TAEs agissent ainsi en bloquant les canaux sodiques voltage dépendants (Figure 18). En effet, ces derniers jouent un rôle essentiel dans la genèse et la propagation des potentiels d'action et par conséquent ont une place centrale dans la régulation de l'excitabilité neuronale.

De façon intéressante, l'inhibition des courants sodiques par ces composés va être plus forte lorsque le potentiel de membrane va être plus dépolarisé. Cela est lié à un changement de conformation des canaux lors de la dépolarisation, qui va révéler de nouveaux sites de liaison accessibles aux TAEs (Hondeghem, 1987). Ce blocage sélectif des canaux dans les neurones actifs permet de prévenir les crises en empêchant la genèse de salves de potentiels d'action à haute fréquence (McNamara, 1994).

La plupart de ces composés, tels que le lacosamide, le cénobamate ou le rufinamide, sont utilisés et fonctionnent bien pour traiter les crises focales. Cependant, des résultats cliniques suggèrent que certains d'entre eux comme la carbamazépine ou la phénytoine présentent un risque de précipiter ou d'aggraver d'autres types de crises, comme les crises absences ou myocloniques (Genton, 2000; Snead and Hosey, 1985; Thomas and Petrou, 2013).

D'autres composés agissent sur une famille complémentaire de canaux voltages dépendants : les canaux calciques. Ces canaux sont tout aussi importants que les canaux sodiques. En effet, ils ont un impact essentiel sur l'excitabilité cellulaire, sur la régulation des voies de signalisation intracellulaires et sur les mécanismes biochimiques nécessaires aux fonctions physiologiques, telles que la libération de neurotransmetteurs. Parmi les TAEs ciblant ces canaux, on trouve la gabapentine, la prégabaline et l'éthosuximide (Figure 18). Les deux premiers ciblent spécifiquement certains canaux calciques présynaptiques contenant une sous-unité α2δ-1 (Figure 19). Ces canaux sont situés aussi bien au niveau des neurones excitateurs (Bikbaev et al., 2020) que des interneurones (Poncer et al., 1997) et favorisent donc la libération de neurotransmetteurs excitateurs et de GABA. La gabapentine et la prégabaline, en bloquant ces canaux, réduiraient ainsi la libération de neurotransmetteur dans la fente synaptique. Cet effet est observé pour la libération de nombreux neurotransmetteurs excitateurs tels que le glutamate (Taylor et al., 2007).

Cependant, contrairement à l'effet attendu, la gabapentine semble élever les taux de GABA dans le cerveau humain, probablement via l'inhibition compétitive d'un transporteur d'acides aminés ou par l'inversion du transporteur de capture du GABA (Errante et al., 2002). De plus, la gabapentine est également connu pour augmenter la synthèse et le renouvellement du GABA (Löscher et al., 1991). Dans deux études indépendantes utilisant des doses différentes, la gabapentine a eu un effet GABAergique net (Rizzo et al., 2001; Ziemann et al., 1996).

Il a donc été proposé que ce ne soit pas l'inactivation des canaux calciques, mais plutôt l'action de la gabapentine sur la synthèse du GABA, qui pourrait être responsable de son efficacité clinique, par exemple comme anticonvulsivant ou comme médicament antinociceptif (Ziemann et al., 2015).

Dans une autre étude, l'effet de la prégabaline a été testé et celle-ci semble aussi avoir un effet net inhibiteur (Lang et al., 2006). L'ensemble des résultats mettant en évidence un effet de ces composés sur d'autres cibles que les canaux Ca^{2+} restent cependant à confirmer.

En comparaison à l'effet de la gabapentine et de la prégabaline sur les canaux calciques contenant une sous-unité α2δ-1, l'éthosuximide inhibe plus spécifiquement les canaux calciques de type T (Figure 19). Ces derniers sont fortement exprimés dans les neurones thalamiques, qui contribuent à la genèse de crises de type absence (Huguenard, 2002). L'éthosuximide est donc utilisé pour agir spécifiquement sur ces crises tandis que la gabapentine et la prégabaline sont surtout utilisés pour traiter les crises focales.

De nombreux TAEs ciblent également directement la transmission synaptique, pour inhiber la transmission glutamatergique ou potentialiser la transmission GABAergique (Figure 18).

Cibler les récepteurs ionotropiques au glutamate est par exemple particulièrement intéressant dans l'épilepsie. En effet, il est maintenant connu que des agonistes des récepteurs NMDA ou AMPA ont des propriétés convulsivantes chez l'animal ou chez l'homme, tandis que des antagonistes sont capables d'inhiber les crises dans différents modèles animaux (Hanada, 2020). Ainsi, le pérampanel réduit les crises focales en bloquant de manière non compétitive les récepteurs ionotropiques au glutamate de type AMPA (Di Bonaventura et al., 2017), tandis que le felbamate agit, quant à lui, sur les récepteurs NMDA (Harty and Rogawski, 2000) (Figure 19).

À l'opposé, la signalisation GABAergique est potentialisée de manière directe par les benzodiazépines et les barbituriques, ou de manière indirecte par des TAEs plus récents comme la tiagabine et la vigabatrine (Treiman, 2001) (Figure 19). Les benzodiazépines sont des modulateurs allostériques positifs des récepteurs $GABA_A$ et agissent donc en potentialisant les réponses GABAergiques. Les barbituriques modulent, eux aussi, positivement les récepteurs $GABA_A$ mais agissent sur un site différent de celui ciblé par les benzodiazépines (Sancar and Czajkowski, 2011).

Ils augmentent ainsi la durée d'ouverture des canaux associés aux récepteurs $GABA_A$ et peuvent même activer directement les récepteurs (Rho et al., 1996). De manière plus indirecte, des composés augmentant la concentration synaptique de GABA sont également de puissants anticonvulsivants.

La tiagabine inhibe ainsi la recapture de GABA en inhibant spécifiquement le transporteur au GABA de type 1 (GAT-1) (Braestrup et al., 1990; Nielsen et al., 1991) tandis que la vigabatrine agit directement sur le catabolisme du GABA en inhibant l'acide gamma-aminobutyrique transaminase (GABA-T) (French, 1999; Guberman, 1996; Richens, 1991). Dans les deux cas, ces composés augmentent les concentrations de GABA dans le cerveau (Gram et al., 1989; Manor et al., 1996; Petroff et al., 2000).

De par leur effet général sur la transmission GABAergique tous ces composés ont un spectre d'action relativement large et agissent sur la plupart des types de crises.

Plus récemment, des TAEs ayant des mécanismes d'action différents ont été développés (Figure 18). Le lévétiracétam ou le brivaracétam agissent par exemple en modulant la glycoprotéine 2A de la vésicule synaptique (SV2A). La SV2A n'est pas essentielle à la transmission synaptique, mais les souris knockout SV2A présentent des crises (Crowder et al., 1999). Ainsi, les ligands de SV2A pourraient protéger contre les crises en agissant sur les mécanismes de libération synaptique.

Le lévétiracétam va également moduler la libération de neurotransmetteurs via d'autres mécanismes. Il a ainsi été démontré qu'il affecte le renouvellement du GABA dans le striatum et diminue les niveaux de l'acide aminé taurine (un agoniste de faible affinité pour les $GABA_AR$) dans l'hippocampe, sans effet sur les autres acides aminés (Tong and Patsalos, 2001). Le lévétiracétam inhibe aussi la transmission excitatrice synaptique en ayant un impact sur la modulation présynaptique médiée par le GABA (Wakita et al., 2014).

De plus, il joue un rôle important dans la libération de neurotransmetteurs en modulant les canaux calciques voltage-dépendant présynaptique de type P/Q (Lee et al., 2009), ou en inhibant les canaux Ca^{2+} présynaptiques (Vogl et al., 2012). Enfin, le lévétiracétam réduit les niveaux intra-neuronaux de Ca^{2+} en inhibant la libération de Ca^{2+} du réticulum endoplasmique (Nagarkatti et al., 2008).

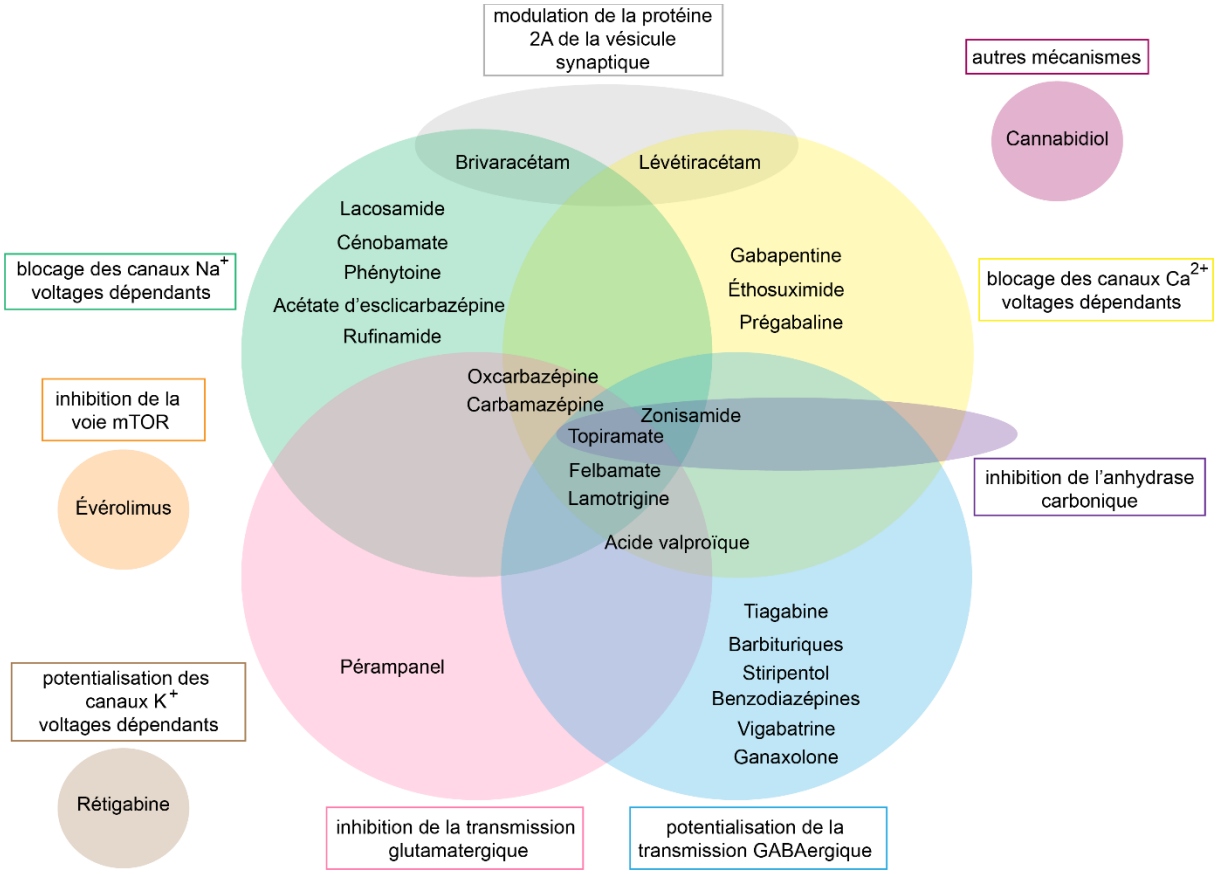


Figure 18. Mécanismes d'action des traitements antiépileptiques.

Répartition des médicaments antiépileptiques en fonction de leurs mécanismes d'action. Certains d'entre eux ont un mécanisme d'action précis tandis que d'autres agissent sur plusieurs cibles distinctes. À noter que les médicaments n'ont pas été catégorisés lorsque l'effet reste débattu ou inconnu D'après Devinsky et al., 2018.

Bien que le brivaracétam et le lévétiracétam se lient de manière similaire à la protéine 2A de la vésicule synaptique, ils se différencient pour d'autres effets pharmacologiques ; en effet, le brivaracétam n'inhibe pas les canaux Ca^{2+} et les récepteurs AMPA comme le lévétiracétam. En revanche, le brivaracétam semble inhiber les canaux sodiques dépendant du voltage (Mumoli et al., 2015).

Cibler les canaux potassiques neuronaux de la famille Kv7, codés par les gènes KCNQ2-5, est aussi particulièrement intéressant dans le contexte de l'épilepsie. En effet, ces canaux sont principalement exprimés dans les neurones et sont actifs au potentiel de repos (Greene and Hoshi, 2017) ce qui leur permet d'avoir une influence hyperpolarisante, et de réduire l'excitabilité cellulaire (Gunthorpe et al., 2012). Ainsi, la rétigabine, qui agit en favorisant l'ouverture des canaux Kv7.2-5, montre un effet antiépileptique et est particulièrement utilisée dans les épilepsies avec crises partielles réfractaires.

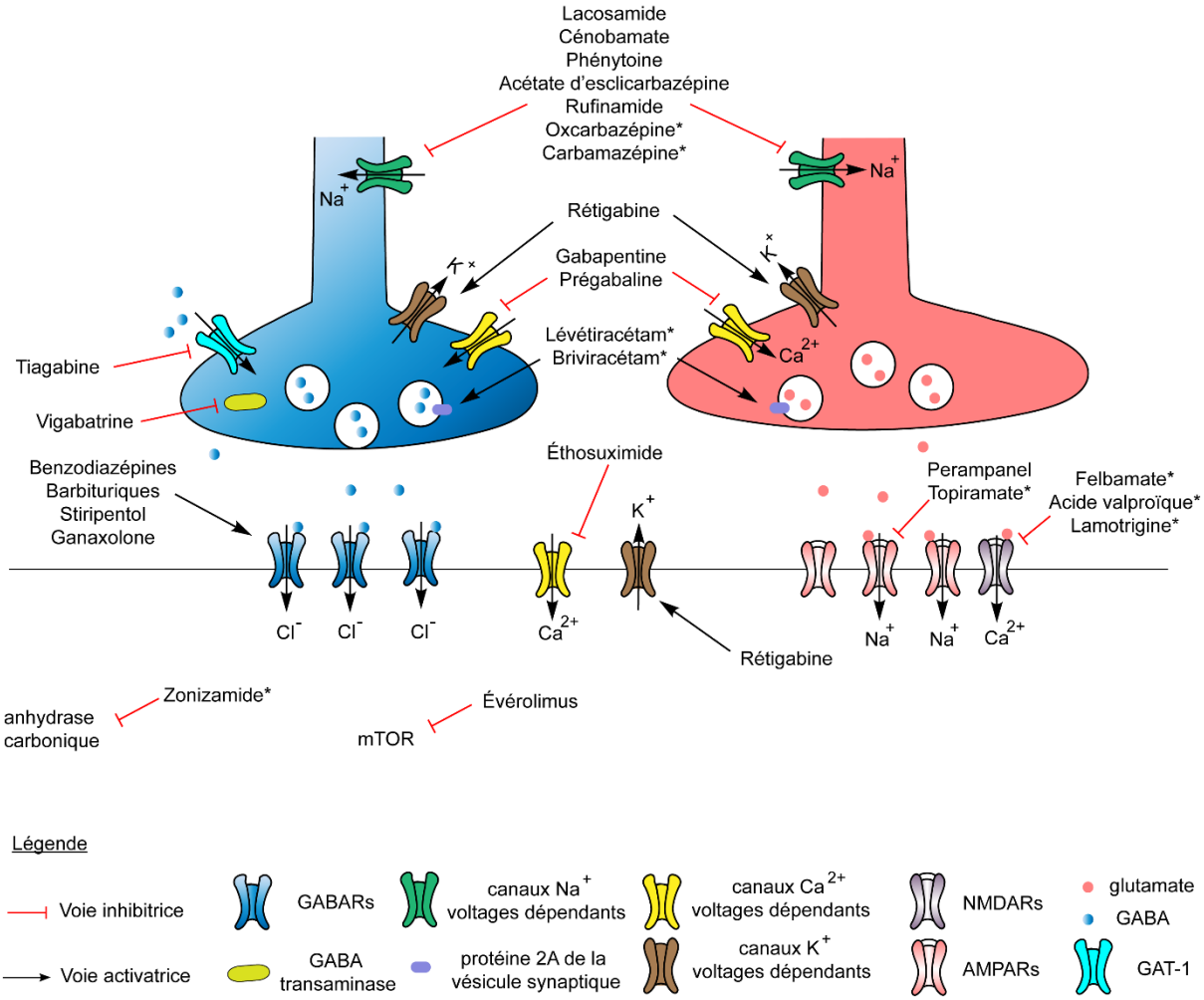


Figure 19. Cibles moléculaires des traitements antiépileptiques.

Schéma représentant les cibles de certains traitements antiépileptiques. Les composés marqués avec un astérisque ont plusieurs mécanismes d'action confirmés (en plus de celui schématisé ici). GAT-1 : transporteur au gaba de type 1. D'après Devinsky et al., 2018.

Comme mentionné précédemment, la voie MTOR est impliquée dans certaines formes d'épilepsie, notamment d'origine neurodéveloppementale. L'hyperactivation de cette voie serait ainsi à l'origine de certaines formes de FCD et de l'épilepsie réfractaire dans les scléroses tubéreuses complexes (STC) (Franz and Capal, 2017; Marsan and Baulac, 2018). L'évérolimus, un inhibiteur de cette voie, s'est ainsi avéré bénéfique pour les patients atteints de STC, à la fois pour réduire la croissance tumorale et en tant que traitement de l'épilepsie réfractaire (Overwater et al., 2019).

Enfin, le zonisamide est un TAE efficace pour le traitement des crises partielles réfractaires. Il agit en inhibant l'anhydrase carbonique, une métallo-enzyme à expression ubiquitaire qui catalyse l'hydratation/déshydratation réversible du CO_2/HCO_3 et qui semble impliquée dans l'épilepsie (Velišek et al., 1993). Cependant, le zonisamide n'inhibe que faiblement cette enzyme et cet effet n'est pas considéré comme un mécanisme d'action primaire dans son activité antiépileptique (Wilfong and Willmore, 2006). L'avantage de ce TAE moderne réside plutôt dans son large profil mécanistique. Il agit ainsi en parallèle sur les canaux sodiques dépendant du voltage, les canaux calciques de type T et en potentialisant la transmission GABAergique (Figure 18).

La plupart des TAEs modernes montre d'ailleurs un tel effet combiné sur plusieurs mécanismes (Figure 18) et permettent ainsi de cibler la plupart des types de crises.

C'est le cas notamment du valproate qui est l'un des TAEs les plus utilisés. Il est connu pour augmenter le recyclage du GABA et par conséquent pour potentialiser les fonctions GABAergique impliquées dans le contrôle de la génération et de la propagation des crises (Löscher, 2002). Le valproate a également un effet inhibiteur sur les NMDAR (Löscher, 2002). Ce mécanisme d'action à la fois sur la transmission excitatrice et inhibitrice constitue clairement un avantage et contribue probablement à son champ d'action très large au niveau clinique (Löscher, 2002). Ce composé a ainsi un rôle anticonvulsivant à la fois sur les crises généralisées et focales. Cependant, l'effet du valproate sur les crises absences (Löscher, 2002) passe probablement par son effet modulateur de la libération de γ-hydroxybutyrate (GHB). D'autres mécanismes d'actions supposés du valproate, tels que ses effets sur les canaux potassiques, calciques et sodiques sont présentés dans (Löscher, 2002) mais ces modes d'action du composé restent débattus (Löscher, 2002).

Les TAEs sont capables de réduire la fréquence et la sévérité des crises chez de nombreux patients. Néanmoins, de par leur effet dépresseur sur l'ensemble du SNC et les multiples mécanismes impliqués, les effets secondaires liés à ces traitements sont très fréquents.

II.2.6.2- Effets indésirables des TAEs

80 % des patients ayant commencé à prendre des TAEs ont ainsi des effets indésirables, et 30 à 40 % d'entre eux des effets altérant considérablement leur qualité de vie et/ou conduisant à l'arrêt du traitement (Marson et al., 2005). Les effets secondaires peuvent être minimisés en commençant ces médicaments à faible dose et en augmentant lentement la dose.

De plus, il est possible de réduire la dose ou d'essayer un autre médicament si des effets indésirables apparaissent (Hakami, 2021). Il est aussi intéressant de noter que les effets indésirables et l'efficacité des TAEs sont très variables d'un patient à l'autre.

Tous les TAEs entrainent des effets secondaires liés à la dose, principalement des effets neurologiques comme de la sédation, des étourdissements, une vision trouble et des tremblements, en plus des symptômes neurocognitifs et psychiatriques (Hakami, 2021; Löscher and Schmidt, 2011).

Certains médicaments sont malgré tout mieux tolérés que d'autres. Par exemple, la lamotrigine et le lévétiracétam sont mieux tolérés que la carbamazépine chez les patients âgés (Werhahn et al., 2015).

Les effets indésirables psychiatriques comprennent la dépression, l'anxiété, l'irritabilité, les troubles de la concentration, les changements d'humeur, l'hyperactivité et, dans de rares cas, la psychose.

Bien que les nouveaux TAEs soient présentés comme mieux tolérés que les anciens médicaments, les effets indésirables psychiatriques sont fréquents avec le lévétiracétam, le topiramate, le zonisamide, la vigabatrine et le perampanel (Ettinger, 2006). Seuls la lamotrigine, la carbamazépine, le valproate, la gabapentine et la prégabaline ont des effets stabilisateurs de l'humeur chez certains patients et provoquent moins fréquemment des effets comportementaux ou psychiatriques (Ettinger, 2006). À noter que le risque d'effets indésirables psychiatriques est accru chez les patients ayant des antécédents personnels ou familiaux de troubles psychiatriques (Perucca and Tomson, 2011).

Les taux de suicide sont aussi augmentés par les TAEs (Raju Sagiraju et al., 2018) alors que ces taux sont déjà significativement plus élevés chez les patients épileptiques en comparaison avec la population générale (Christensen et al., 2007). Ce sujet est relativement débattu et ces études critiquées, car d'autres travaux et examens n'ont signalé aucune association entre TAEs et taux de suicide (Hesdorffer and Kanner, 2009). Cependant, une étude a démontré que les TAEs les plus récents étaient associés à un risque trois fois plus élevé d'automutilation ou de comportement suicidaire chez les patients épileptiques (Andersohn et al., 2010), renforçant le fait qu'il y a bien un lien entre TAEs et augmentation des taux de suicide.

De nombreux TAEs vont aussi avoir des effets tératogènes, c'est-à-dire qu'ils sont susceptibles de provoquer des malformations fœtales. Le valproate en particulier présente des risques élevés (Jentink et al., 2010; Tomson et al., 2011; Vajda et al., 2013). Enfin, les TAEs peuvent aussi présenter des effets indésirables à long terme. Ces effets se manifestent après des années de traitement et peuvent affecter entre autres les systèmes métaboliques, neurologiques, hématologiques, dermatologiques et immunologiques. Par exemple, les patients prenant des TAEs ont un risque de fractures osseuses deux à trois fois plus élevé (Ahmad et al., 2012).

Le risque d'obésité et de maladie cardiovasculaire est aussi accru après un traitement avec certains composés comme le valproate, la carbamazépine, la gabapentine, la prégabaline, la vigabatrine et le perampanel (Chukwu et al., 2014). Cependant, certains TAEs (tels que le topiramate, le zonisamide, le felbamate, le stiripentol et le rufinamide) peuvent entraîner une perte de poids, et certains n'ont aucun effet sur le poids.

Les effets secondaires sont donc fréquents avec les TAEs et peuvent drastiquement impacter la qualité de vie des patients. Malgré le fait que les nouveaux médicaments présentent des profils pharmacocinétiques et une meilleure tolérance en comparaison aux TAEs de première génération, les effets secondaires restent importants. De plus, les nouveaux médicaments n'ont pas permis d'augmenter le pourcentage de patients exempts de crises (30%) (Chen et al., 2018; Löscher and Schmidt, 2011) et l'introduction de médicaments avec de nouveaux mécanismes d'action n'a pas non plus permis de réduire la fréquence des épilepsies pharmacorésistantes (Chen et al., 2018; Löscher and Schmidt, 2011).

II.2.7- Épilepsies pharmacorésistantes : quelles solutions et avec quels risques ?

Chez les patients épileptiques qui commencent un traitement, environ 50% parviennent à contrôler leurs crises avec un premier TAE et 13% supplémentaires avec un second. Cependant, moins de 4% des patients pourront contrôler leurs crises avec des TAEs supplémentaires si deux TAEs n'ont pas eu d'effet. Ainsi, on estime qu'environ 36% des patients ont des crises non contrôlées quel que soit le nombre de TAEs testés (Kwan and Brodie, 2000). Ces patients sont dits *pharmacorésistants*, c'est-à-dire qu'ils ne répondent pas à au moins deux TAEs appropriés (qu'ils soient administrés en monothérapie ou en association) (Kwan et al., 2011, 2010). La forme la plus fréquente d'épilepsie pharmacorésistante est l'épilepsie du lobe temporal, pour laquelle 50 à 70 % des patients sont pharmacorésistants (Berg, 2008, 2004; Pittau et al., 2009b; Sànchez et al., 2014b).

Des patients qui présentent des crises multiples (plus de cinq) avant le traitement et pour lesquels l'épilepsie est restée la plus longtemps sans traitement sont aussi plus à risque d'être pharmacorésistants. De même pour les patients qui présentent une IRM anormale, des décharges épileptiformes sur l'EEG, des crises focales ou des déficits neurocognitifs (Sillanpää and Schmidt, 2009). L'épilepsie pharmacorésistante est associée à un risque accru de blessures et de décès, à une charge médicamenteuse et à des effets indésirables plus importants, à une augmentation des comorbidités psychiatriques et neurocognitives, ainsi qu'à un désavantage socio-économique et à une diminution de la qualité de vie (Kwan et al., 2011).

Il existe différentes solutions pour les patients pharmacorésistants, telle que la résection par chirurgie du foyer épileptique, la neurostimulation et les thérapies diététiques. Comme nous allons le voir, la chirurgie de l'épilepsie offre les meilleures chances d'obtenir un contrôle des crises à long terme, mais seule une minorité de patients sont de bons candidats.

Les patients pharmacorésistants sont orientés vers un service d'épileptologie pour confirmer le diagnostic et évaluer s'ils sont aptes à subir une résection chirurgicale (Kwan et al., 2011). Cette évaluation comprend idéalement une surveillance vidéo EEG à long terme. Cette dernière est particulièrement importante car elle permet d'identifier si les crises sont bien des crises épileptiques (Ghougassian et al., 2004). En effet, jusqu'à 30 % des patients souffrant d'épilepsie pharmacorésistante ont en fait des crises non épileptiques, telles que des crises psychogéniques.

Cela signifie que dans de nombreux cas le diagnostic de pharmacorésistance est annoncé à tort et les crises non contrôlées peuvent être liées à un médicament inadapté au syndrome épileptique, à une posologie inadéquate, ou à des facteurs liés au mode de vie (tels que le manque de sommeil, l'abus de drogues ou d'alcool) (Kwan et al., 2011).

II.2.7.1- Résection du foyer épileptique par chirurgie

Une fois la pharmacorésistance confirmée, la chirurgie de résection va être possible pour environ 50% des patients (Nowell et al., 2014). En effet, seuls ceux ayant un foyer épileptique ou une lésion bien définie, et donc résécable sans conséquences majeures, pourront envisager cette option. C'est le cas des lésions IRM, telles que les scléroses temporales médianes, les dysplasies focales corticales, les masses néocorticales ou encore les gliomes et les cavernomes. À l'inverse, la chirurgie n'est pas une option pour les patients avec des épilepsies du lobe temporal bilatérales et est beaucoup plus compliquée pour les patients dont le foyer n'est pas clairement défini.

De nouvelles techniques d'imagerie telles que la tomographie par émission de positons (PET), celle à émission monophotonique ou la magnétoencéphalographie peuvent malgré tout être utilisées dans ces cas précis pour identifier la zone épileptogène. Cependant, l'implantation d'électrodes EEG intracrâniennes reste nécessaire pour identifier clairement le foyer, ce qui augmente les risques de morbidité et de mortalité (Liubinas et al., 2009). Cette identification peut ainsi permettre d'améliorer le contrôle des crises postopératoires à long terme (O'Brien et al., 2008), même si les résultats resteront moins bons que pour les patients avec un foyer épileptique bien défini (Téllez-Zenteno et al., 2005b).

Pour les patients présentant des lésions résécables, 80% d'entre eux seront libres de crises pendant plus d'un an à la suite de la chirurgie (Lowe et al., 2004b; Téllez-Zenteno et al., 2005b). Une amélioration de leur qualité de vie est ainsi observée (Wiebe et al., 2001).

Celle-ci est notamment marquée par une réduction de la charge médicamenteuse (Téllez-Zenteno et al., 2005b), des hospitalisations, du taux de décès (Bell et al., 2010), ainsi que par une réduction de la morbidité psychiatrique (Devinsky et al., 2005) et des coûts directs des soins (Schiltz et al., 2016). Cependant, il est important de noter que le pourcentage de patients sans crises diminue avec le temps, atteignant moins de 50% 10 ans après la chirurgie (de Tisi et al., 2011b).

De plus, cette dernière est une stratégie de traitement non réversible qui manque de spécificité temporelle et cellulaire, et qui n'est donc pas exempte d'effets secondaires négatifs majeurs, tels que des déficits de mémoire ou de langage (Duchowny and Bhatia, 2014b). L'histoire du patient HM (Henry Molaison) constitue peut-être l'exemple le plus frappant et le plus connu (Corkin, 2002). Ce patient, souffrant d'épilepsie pharmacorésistante, est devenu amnésique à l'âge de 27 ans, à la suite d'une opération chirurgicale visant à retirer son foyer épileptique. Il a été le sujet de nombreuses études sur la mémoire menées par les neuropsychologues Brenda Milner et Suzanne Corkin, et son cas a ainsi contribué à une meilleure compréhension des différentes formes de la mémoire, dont la mémoire déclarative (Corkin, 2002). L'identification par IRM des régions corticales impliquées dans les fonctions cognitives et sensorimotrices est donc essentielle pour guider la résection et ainsi limiter la perte de fonctions critiques pendant la chirurgie. En partie à cause de ces considérations et des pratiques d'orientation, les patients ayant cette possibilité attendent en moyenne 10 à 20 ans avant de tenter une telle opération (de Tisi et al., 2011b).

Cette chirurgie n'en reste pas moins une solution thérapeutique pour certains patients pharmacorésistants. De plus, elle offre une opportunité unique pour les chercheurs d'accéder à du tissu humain épileptique, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives pour mieux comprendre la pathophysiologie de l'épilepsie ou tester de nouveaux candidats TAEs (voir MM.3.4).

II.2.7.2- Neurostimulation

L'implantation d'un dispositif de neurostimulation est une alternative possible dans le cas où la chirurgie de résection n'est pas envisageable. Différents systèmes existent et sont très bien résumés dans Lin and Wang, 2017. Parmi eux, on trouve notamment la stimulation cérébrale profonde (DBS), le stimulateur du nerf vague (SNV) et les systèmes de neurostimulation réactive (RNS). Ces deux derniers ont d'ailleurs été approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) pour le traitement de l'épilepsie.

Le SNV consiste en une prothèse neurocybernétique implantée sous la peau de la poitrine. Les électrodes de stimulation délivrent des courants électriques intermittents au nerf vague, selon des réglages préprogrammés. Une étude récente sur l'utilisation du SNV chez des enfants souffrant d'épilepsie réfractaire a montré une réduction de plus de 50 % de la fréquence des crises chez 62,5 % des patients après 5 ans de traitement (Serdaroglu et al., 2016). Une autre étude a examiné 5 554 patients et a constaté que 49 % des patients présentaient une réduction de >50 % de la fréquence des crises 4 mois après l'implantation, tandis que 63 % des patients avaient une réduction de >50 % de la fréquence des crises entre 24 et 48 mois après l'implantation (Englot et al., 2016).

De la même manière que pour la chirurgie de résection, le SNV est associé à une amélioration de la qualité de vie, à une diminution des hospitalisations liées à l'état épileptique et à une réduction de la mortalité (Milby et al., 2009; Ryvlin et al., 2018). D'autres techniques dérivées du SNV existent telles que le SNV transcutané qui est l'équivalent non invasif du SNV (Aihua et al., 2014). Ce dispositif est moins cher que le dispositif implanté, peut fournir une stimulation bilatérale, et permet une réduction de la fréquence des crises de 47,7% après 24 semaines de traitement (Rong et al., 2014). Les mécanismes exacts expliquant l'effet du SNV sur l'épilepsie n'ont pas été clairement identifiés, mais différentes suggestions sont faites dans la revue de Vonck and Larsen, 2018.

Contrairement au SNV, la DBS peut viser des cibles anatomiques spécifiques du cerveau. La DBS, qui cible en particulier le noyau antérieur du thalamus a été approuvée en Europe pour le traitement de l'épilepsie focale chez les patients adultes âgés de 18 à 65 ans et est en attente d'approbation aux États-Unis par la FDA.

Des données intéressantes ont notamment été obtenues dans un essai mené sur 110 patients souffrant d'épilepsie focale réfractaire (Fisher et al., 2010). Une réduction de la fréquence des crises de 40,4 % a ainsi été obtenue.

La fréquence médiane des crises a même diminué de 56% par rapport à la ligne de base au bout de 2 ans et de 69% au bout de 5 ans (Krishna et al., 2016). D'autres régions peuvent également être ciblées. La DBS de l'hippocampe est par exemple une option intéressante pour les patients souffrant d'épilepsie d'ELT résistante aux médicaments et pour lesquels la chirurgie est contre-indiquée. Trois études en double aveugle ont montré une réduction des crises de 15 à 33 % et un taux de réponse de 55 % (McLachlan et al., 2010; Tellez-Zenteno et al., 2006; Velasco et al., 2007).

Contrairement à ces deux systèmes qui fonctionnent en boucle ouverte et qui contrôlent les crises en modulant en permanence l'activité de certains neurones centraux (ou « hubs ») du réseau épileptique, le système RNS est le premier système qui fonctionne en boucle fermée, délivrant des impulsions électriques lorsqu'une crise est détectée. Dans un essai thérapeutique, 191 patients souffrant de crises focales ont reçu un système RNS (Heck et al., 2014; Morrell and RNS System in Epilepsy Study Group, 2011).

À la fin d'une phase en aveugle de 12 semaines, la fréquence des crises a été réduite de 37,9 % et un effet sur le long terme a été observé avec une réduction de la fréquence des crises de 44% après 1 an et de 53% après 2 ans. Les effets de la stimulation électrique ne sont pas clairement identifiés, mais pourraient être attribués au blocage de la dépolarisation, à l'inhibition synaptique ou à la modulation du réseau pathologique (Thomas and Jobst, 2015).

Enfin, d'autres approches comme la stimulation magnétique transcrânienne répétitive et la stimulation transcrânienne à courant continu sont également en cours de développement et présentent des résultats encourageants (Lin and Wang, 2017).

Malgré les résultats intéressants de ces systèmes de neurostimulation, peu de patients sont complétement libérés de leurs crises grâce à la neurostimulation (Lin and Wang, 2017).

Ces dispositifs ne sont donc pas une alternative à la chirurgie épileptique pour les patients présentant des foyers de crises bien définis.

II.2.7.3- Thérapies diététiques

Une autre possibilité thérapeutique pour ces patients pharmacorésistants est la mise en place d'un régime cétogène, qui repose sur une réduction drastique de l'apport en glucides. Ces régimes étaient principalement utilisés depuis les années 1920 chez les enfants atteints d'épilepsies sévères. Plus récemment, des options diététiques plus larges ont été mises en place (régime Atkins modifié, régime faiblement glycémique) et l'utilisation des thérapies diététiques a été étendue à différentes populations de patients, dont les adultes (Cervenka et al., 2016; Lefevre and Aronson, 2000). L'efficacité de ce régime est plutôt bonne avec une réduction des crises de plus de 50 % chez plus de 50% des patients traités, une réduction de plus de 90% chez un tiers de ces patients, et l'absence complète de crises chez d'autres (Lefevre and Aronson, 2000).

De plus, le régime cétogène est un traitement de choix pour certains troubles métaboliques pouvant provoquer une épilepsie (comme le déficit en GLUT1 et le déficit en pyruvate déshydrogénase) et pourrait être efficace pour l'état de mal épileptique réfractaire (Cervenka et al., 2017). Cependant, ce régime présente une mauvaise tolérance et des effets indésirables, tels qu'une constipation ou des vomissements, limitant l'adhésion chez les adultes. De plus, les complications à long terme des thérapies diététiques sont nombreuses et comprennent une carence nutritionnelle, un trouble de la croissance chez les enfants, un profil lipidique anormal, une ostéopénie et des calculs rénaux (Kang et al., 2004). Des essais cliniques rigoureux sur des adultes sont encore nécessaires pour établir l'efficacité et la sécurité à long terme de ces thérapies diététiques.

Malgré la diversité de traitements antiépileptiques et l'introduction de médicaments avec de nouveaux mécanismes d'action, un pourcentage trop important de patients épileptiques est encore pharmacorésistant. Bien que certaines solutions existent pour ces patients, la plupart d'entre elles restent peu efficaces, et d'autres, comme la chirurgie de résection, sont non exempts d'effets secondaires, difficiles à mettre en œuvre, coûteuses et limitées à des types bien précis de lésions épileptiques.

Le traitement des épilepsies pharmacorésistantes et notamment des épilepsies du lobe temporal reste donc un problème de santé majeur et il apparaît essentiel d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Parmi celles-ci, et comme mentionné précédemment, KCC2, dont l'expression et la fonction sont fortement altérées dans l'épilepsie, revêt évidemment un intérêt particulier.

II.3- KCC2 et épilepsie

II.3.1- Expression de KCC2 et épilepsie

Une réduction d'expression de KCC2 a été observée pour la première fois dans un modèle souris à la suite d'un protocole de *kindling* hippocampique (Rivera et al., 2002b). À partir de cette étude, l'idée d'une régulation négative de la protéine dans le cerveau épileptique est apparue comme un consensus. En effet, une diminution similaire de l'expression de KCC2 a été rapportée dans l'hippocampe (Barmashenko et al., 2011; Kourdougli et al., 2017a; X. Li et al., 2008; Pathak et al., 2007; Stamboulian-Platel et al., 2016) ou le cortex entorhinal (Bragin et al., 2009) de différents modèles rongeurs d'épilepsie.

Cette diminution d'expression de KCC2 est associée à une dépolarisation d'E_{GABA} (Barmashenko et al., 2011; Bragin et al., 2009; Pathak et al., 2007), et dans certains cas à une augmentation de l'excitabilité cellulaire (Pathak et al., 2007), suggérant que la diminution d'expression de KCC2 pourrait favoriser l'émergence d'activités épileptiformes (Kourdougli et al., 2017a). En parallèle de ces travaux sur les modèles animaux, plusieurs études ont également montré une diminution d'expression de KCC2 au niveau de l'ARNm (Palma et al., 2006) et de la protéine (Blauwblomme et al., 2019; Cohen et al., 2002b; Huberfeld et al., 2011, 2007b; Munakata et al., 2007; Muñoz et al., 2007b; Pallud et al., 2014) dans le tissu postopératoire provenant de patients souffrant d'épilepsie pharmacorésistante.

Parmi celles-ci, des études menées par l'équipe de Richard Miles ont permis d'étudier le lien entre la diminution d'expression de KCC2 et l'émergence d'activités épileptiformes. Des enregistrements *in vitro*, réalisés depuis des tranches de tissu hippocampique postopératoire, prélevé chez des patients souffrant d'épilepsie du lobe temporal, ont permis d'explorer la pharmacologie sous-jacente à la génération d'activités intericales spontanées détectées notamment dans le subiculum (Cohen et al., 2002b) (voir II.2.4.1).

Les auteurs ont montré que ces activités épileptiformes peuvent être abolies non seulement par des bloqueurs de la transmission glutamatergique mais également, de façon paradoxale, par des bloqueurs de la transmission GABAergique.

De plus, ils ont mis en évidence que certaines cellules présentent des réponses GABAergiques dépolarisantes lors d'évènements interictaux, suggérant qu'une signalisation GABAergique paradoxalement excitatrice pourrait contribuer à l'activité épileptiforme.

Ils ont ensuite révélé une corrélation partielle entre les courants dépolarisants médiés par les récepteurs $GABA_A$ et l'absence d'expression de KCC2 dans environ 30 % des cellules principales du subiculum épileptique (Huberfeld et al., 2007b) (Figure 20A). Enfin, une restauration de l'homéostasie neuronale des ions Cl^- par l'application d'un inhibiteur de NKCC1, le bumétanide, permet de supprimer l'activité interictale. Il semble donc exister un lien entre diminution d'expression de KCC2, altération de l'homéostasie des ions chlorure, polarité de la transmission GABAergique, et activités interictales. De plus, il a été montré que ce lien n'est pas limité aux patients atteints d'ELT. En effet, une observation similaire a été faite dans le néocortex humain péri-tumoral (Pallud et al., 2014) ou dans le cortex de patients atteints de dysplasie corticale focale (Blauwblomme et al., 2019) (Figure 20B).

L'ensemble de ces résultats sur les modèles animaux et le tissu humain révèlent une corrélation intéressante entre la perte d'expression de KCC2 et l'apparition d'activités interictales dans le cerveau épileptique. Cependant, contrairement à ces résultats, une augmentation des transcrits de KCC2 a été observée dans le colliculus inférieur d'un modèle murin de crises audiogènes post-ischémiques (Reid et al., 2001). Plus frappant encore, une étude a également décrit une régulation à la hausse du niveau d'expression de KCC2 dans l'hippocampe de patients épileptiques et d'un modèle murin d'épilepsie chronique (Karlócai et al., 2016).

Pour mieux comprendre ces différences, il est important de prendre en compte deux points. Tout d'abord, la plupart des études réalisées sur des modèles animaux et montrant une diminution d'expression de KCC2 ont en réalité détecté ces niveaux d'expression juste après l'induction de l'épilepsie (par exemple un état de mal pharmacologique, ou un kindling) et non pas pendant la phase chronique de la pathologie. Ainsi, l'activité excitatrice intense qui se produit au cours d'un état de mal pharmacologique va induire une dérégulation rapide de KCC2 mais un retour à la normale de l'expression de KCC2 semble se faire pendant la phase chronique de l'épilepsie (Pathak et al., 2007).

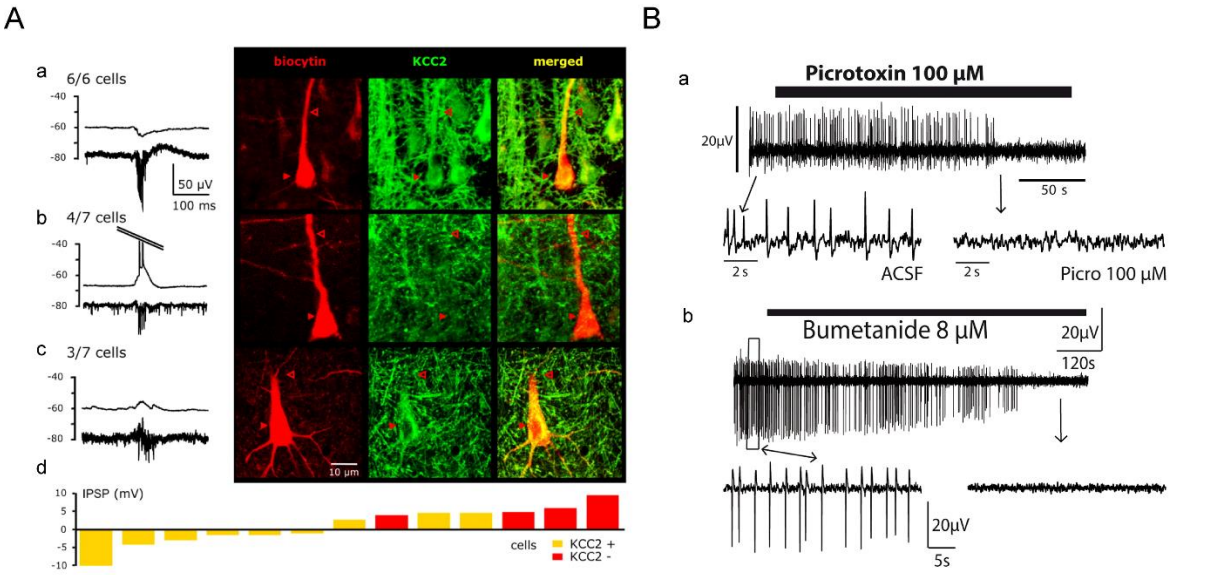


Figure 20. Corrélation entre l'expression de KCC2, la polarité de la transmission GABAergique et les activités intericales dans le tissu humain postopératoire *in vitro*.

A. (a-c gauche) Enregistrements intracellulaires (en haut, traces fines) et extracellulaires (en bas, traces épaisses), lors d'une activité de type interictal, dans le subiculum réséqué chez un patient atteint d'épilepsie du lobe temporal. (a-c droite) L'immunomarquage révèle l'absence de KCC2 dans 4 des 7 cellules enregistrées présentant une transmission GABAergique dépolarisante. (d) Corrélation partielle entre l'expression de KCC2 et la polarité de la transmission GABAergique (Huberfeld et al., 2007b). **B**. (a) L'activité intericale enregistrée sur des tranches de dysplasie corticale focale est supprimée par l'ajout de picrotoxine, un antagoniste des récepteurs $GABA_A$, indiquant un rôle pro-épileptogène de la transmission GABAergique. (b) Des résultats similaires sont obtenus avec l'ajout de bumétanide, un antagoniste de NKCC1 (adapté de Blauwblomme et al., 2019.

D'autre part, toutes les études indiquant une régulation négative de KCC2 dans le cerveau épileptique humain se sont en fait concentrées sur les régions épileptogènes (par exemple, le subiculum et la région péri-tumorale). En particulier, la diminution des niveaux d'ARNm de KCC2 dans le subiculum a été observée par rapport au niveau mesuré dans le reste de l'hippocampe chez les mêmes patients (Palma et al., 2006), tandis que l'absence de KCC2 dans environ 30 % des cellules principales a été observée uniquement dans le subiculum et CA1 sclérosé mais pas dans CA3 ou le gyrus denté (Muñoz et al., 2007b). La régulation négative de KCC2 dans ces régions pourrait donc favoriser l'activité épileptique ou, à l'inverse, elle pourrait être la conséquence de l'activité excitatrice soutenue de cette région. Ainsi, même si une diminution d'expression de KCC2 est observée dans de nombreux modèles animaux d'épilepsie et dans du tissu réséqué de patients atteints d'épilepsie pharmacorésistante, la question de la relation de causalité entre altération de l'expression de KCC2 et émergence d'activités épileptiques reste en suspens.

Une possibilité pour mieux comprendre le rôle physiologique d'une protéine et son implication dans la pathologie consiste à déléter le gène codant pour cette protéine.

II.3.2- Mutations de KCC2 dans l'épilepsie

Des hypothèses de causalité entre dysfonctionnements de KCC2, déséquilibre excitation/inhibition et épilepsie sont ainsi apparues lors de l'étude des lignées KO de KCC2 ou des mutations de KCC2 présentes chez l'homme.

II.3.2.1- Phénotype des modèles animaux KO pour KCC2

J'ai déjà mentionné précédemment un modèle souris KO de KCC2b. Ces souris survivent seulement quelques semaines après la naissance et présentent une spasticité, une hyperexcitabilité de l'hippocampe ainsi que des crises généralisées spontanées (Woo et al., 2002b). De plus, elles ont une susceptibilité accrue pour le convulsivant pentylènetétrazole (PTZ). Des observations similaires de létalité et d'augmentation de la gravité des crises ont aussi été réalisées chez la drosophile avec la perturbation du gène *kcc*, qui code pour le co-transporteur K^+-Cl^- (Hekmat-Scafe et al., 2006b). En comparaison, des effets plus subtils ont été observés avec des souris hypomorphes pour KCC2. Ces souris, qui présentent seulement 15 à 20% d'expression protéique de KCC2 dans le cerveau, montrent des comportements de type anxieux et une sensibilité accrue aux crises induites par le PTZ à l'âge adulte, mais ne présentent pas de crises spontanées (Tornberg et al., 2005c).

De la même manière, la suppression de KCC2 uniquement dans les interneurones à parvalbumine induit des réponses GABAergiques dépolarisantes *in vitro* et augmente la susceptibilité aux crises *in vivo* sans toutefois conduire à leur émergence spontanée (Herrmann et al., 2022b). Ces données suggèrent, comme précédemment, un lien entre altération de l'expression de KCC2, changement de polarité de la transmission GABAergique et émergence d'activités épileptiformes. Cependant, une diminution d'expression de KCC2 ou une suppression localisée de son expression ne semble pas suffisante pour générer des crises, questionnant là encore la relation de causalité (voir II.3.3). De plus, il convient de noter que les phénotypes observés dans ces souches de souris ne sont peut-être pas entièrement dû à des modifications de la transmission GABAergique. En effet, comme mentionné précédemment (voir I.2.4.3), la suppression de KCC2 au cours du développement cortical altère également la maturation des épines dendritiques et la survie des neurones pyramidaux en migration, ce qui pourrait participer aux déficits rapportés.

II.3.2.2- Mutations de KCC2 dans l'épilepsie chez l'homme

Deux études génétiques indépendantes et concomitantes conduites sur des cohortes de patients épileptiques ont fourni des preuves que des mutations affectant KCC2 perturbent la fonction du transporteur et prédisposent à l'épilepsie. Un variant génétique de KCC2 (SLC12A5) : KCC2-R952H a ainsi été découvert dans une famille australienne présentant des crises fébriles (Puskarjov et al., 2014b). Ce variant présente une expression membranaire réduite dans des cellules hétérologues et une réduction de la capacité d'extrusion des ions Cl^- lorsqu'il est surexprimé dans des neurones corticaux immatures. Ce variant a été identifié presque au même moment chez des patients canadiens souffrant d'épilepsie généralisée idiopathique (Kahle et al., 2014) (Figure 21).

Cette famille présentait aussi un second variant de KCC2 : KCC2-R1049C (Figure 21). Ce dernier induit aussi une perturbation de l'homéostasie des ions Cl^- mais n'impacte pas l'expression membranaire du transporteur. Il est intéressant de noter que les deux sites mutés se trouvent au niveau de l'extrémité C-terminale de KCC2 et à proximité de sites essentiels pour la régulation de sa fonction (voir I.3.2.5 et Figure 8). Ainsi, le site R952 est à proximité de la S940 et au niveau du site PEST-1 tandis que le site R1049 est situé entre le domaine ISO et le domaine de liaison à PAM. Ces deux variants réduisent d'ailleurs la phosphorylation de la S940. Il est possible que les mutations induisent un changement de conformation du transporteur, limitant l'accès de la PKC.

Ces deux études ont ainsi mis en évidence que des mutations codantes de KCC2 peuvent constituer un facteur de risque pour le développement de l'épilepsie, mais cela ne démontre pas de relation de causalité.

Trois autres mutations récessives induisant une perte de fonction dans le gène SLC12A5 ont été identifiées ultérieurement chez des patients souffrant d'épilepsie infantile avec des crises focales migrantes (EIMFS) (Stödberg et al., 2015) (Figure 21). Ces mutations (L426P, G551D et L311H ; respectivement L403P, G528D et L288H sur le KCC2b humain) sont liées à une diminution de l'expression membranaire de KCC2, une réduction de la glycosylation et une altération de la fonction du transporteur. Cela n'est pas surprenant pour le résidu L288 étant donné sa position à proximité des sites de glycosylation et le rôle de ces derniers (voir I.3.2.5 et Figure 8).

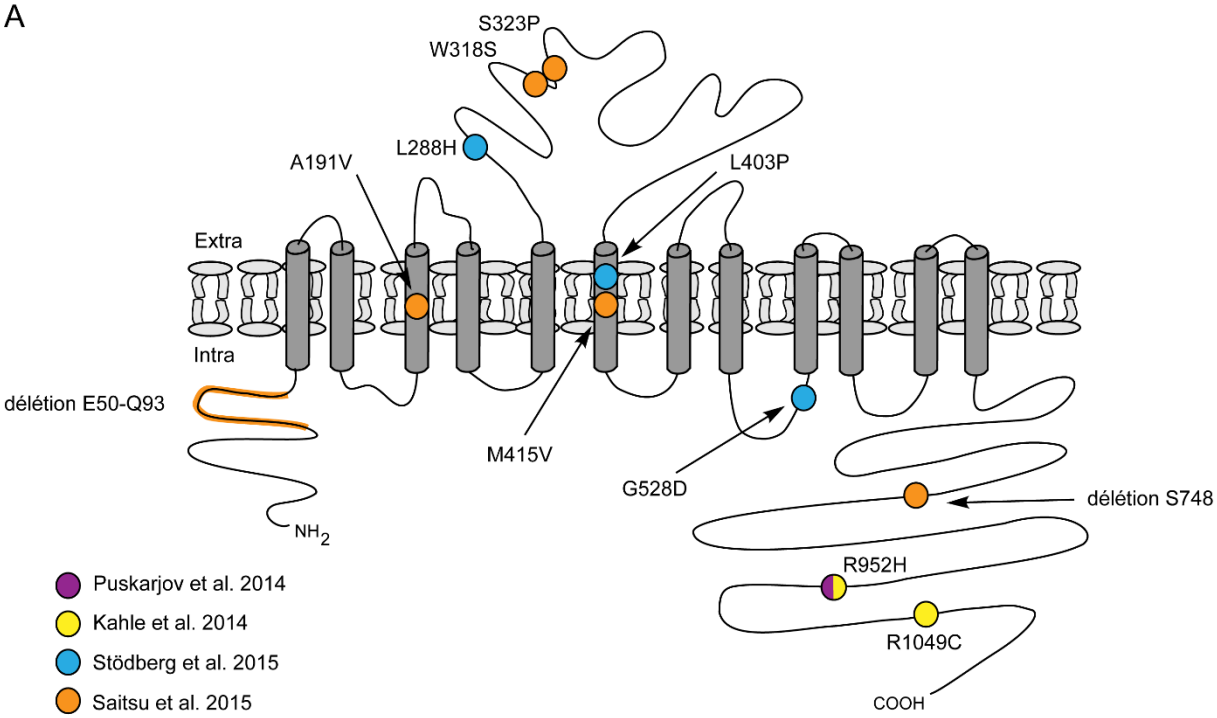
Les régions entourant la position des autres sites sont moins connues pour jouer un rôle dans la fonction et l'expression membranaire de KCC2. Une caractérisation plus poussée de ces mutants permettraient d'obtenir plus d'informations.

Une autre étude a découvert quatre mutations supplémentaires de KCC2 comme cause de l'EIMFS : deux dans les domaines transmembranaires (A191V, M415V), une dans la grande boucle extracellulaire (S323P), et une dans l'extrémité N-terminale (entraînant la délétion de l'exon 3 codant pour les résidus E50-Q93) (Saitsu et al., 2016) (Figure 21). La mutation des résidus A191 et S323 n'a pas d'effet sur la fonction ou l'expression de KCC2. En revanche, les autres mutations entraînent systématiquement une perte de fonction de KCC2 associée ou non à une réduction de son expression membranaire. Il est intéressant de noter que la mutation dans l'extrémité N-terminale conduit à la délétion d'une région proche de la région auto-inhibitrice (voir I.1.2), expliquant l'effet spécifique sur la fonction du transporteur. Enfin, deux mutations supplémentaires (W318S et délétion de S748) ont été trouvées chez un patient présentant une épilepsie intraitable non classée, mais l'impact de ces mutations de KCC2 doit être déterminé (Saito et al., 2017; Saitsu et al., 2016).

Plusieurs conclusions peuvent être tirées de l'identification de ces mutations humaines. Tout d'abord, et contrairement aux phénotypes drastiques rapportés chez les souris KO, la pénétrance de ces mutations est incomplète chez l'humain. Ainsi, dans la dernière étude, les membres de la famille exprimant une seule mutation ne souffrent pas d'épilepsie tandis que des mutations bi-alléliques de KCC2 semblent nécessaires pour l'expression du phénotype épileptique (Saitsu et al., 2016).

De plus, certains de ces variants ont également été signalés chez des témoins sains (Kahle et al., 2014). Ces observations atténuent l'hypothèse d'un lien de causalité direct entre le dysfonctionnement de KCC2 et l'épilepsie. En revanche, comme souvent dans le cas des mutations liées à l'épilepsie, elles suggèrent que les mutations peuvent représenter des facteurs de susceptibilité agissant conjointement avec d'autres facteurs environnementaux ou génétiques pour favoriser l'épileptogenèse.

A



B

Mutation	Fonction de transport	Expression membranaire
délétion E50-Q93	Réduction	Inchangée
A191V	Pas de changement	Inchangée
L288H	Réduction	Diminution
W318S	A déterminer	A déterminer
S323P	Pas de changement	Inchangée
L403P	Réduction	Diminution
M415V	Réduction	Inchangée
G528D	Réduction	Diminution
délétion S748	A déterminer	A déterminer
R952H	Réduction	Diminution
R1049C	Réduction	Inchangée

Figure 21. Mutations de KCC2 dans l'épilepsie.

A. Localisation des mutations de KCC2 décrites dans le contexte de l'épilepsie. La numérotation correspond à celle de la séquence de l'isoforme KCC2b humaine. **B**. Résumé de l'impact de ces mutations sur l'expression et la fonction de KCC2. Presque toutes les mutations modifient la fonction de KCC2 alors que seulement certaines d'entre elles sont associées à une diminution du niveau d'expression membranaire du transporteur. Les effets de deux mutations restent à déterminer. Adapté de Moore et al., 2017.

II.3.3- Existe-t-il un lien causal entre diminution d'expression de KCC2 et épilepsie ?

La nature de la relation entre la diminution d'expression de KCC2 et l'épilepsie est plus complexe que ce que l'on pouvait imaginer. On vient de voir qu'une corrélation intéressante existe entre la diminution d'expression KCC2, l'altération de la polarité des réponses GABAergiques et l'émergence d'activités épileptiformes dans différents modèles animaux d'épilepsie et dans les tissus postopératoires de patients épileptiques réfractaires. Cependant, cela ne veut pas dire pour autant que la diminution d'expression de KCC2 est la cause de l'émergence d'activités épileptiformes.

Comme on vient de le voir, seules certaines données provenant des KO de KCC2 dans l'ensemble du SNC peuvent suggérer une relation de cause à effet. D'autre part, un modèle computationnel récent, basé sur les observations réalisées par l'équipe de Richard Miles depuis le tissu postopératoire humain, suggère que la suppression de KCC2 dans environ 30 % des cellules principales est suffisante pour déclencher une activité ictale dans un réseau subiculaire modélisé (Buchin et al., 2016). Ce modèle prend en compte les changements possibles sur la transmission GABAergique ainsi que sur le potassium extracellulaire et l'excitabilité neuronale. Néanmoins, l'affirmation d'une relation de cause à effet entre la suppression de KCC2 et l'activité ictale doit être prise avec précaution en raison de la concentration basale élevée de potassium extracellulaire (8 mM) utilisée par les auteurs dans leur modèle.

Cette concentration n'est pas physiologique et entraîne une augmentation de l'excitabilité des neurones, ce qui peut favoriser l'émergence d'activité ictale dans le réseau. De plus, un autre problème majeur du modèle réside dans le fait qu'il manque l'inhibition périsomatique - toutes les synapses GABAergiques étant formées sur les dendrites apicales des cellules principales - ainsi que l'inhibition GABAergique des interneurones. Il est donc difficile d'extrapoler les prédictions de ce modèle au comportement réel du réseau neuronal subiculaire (ou de tout autre réseau).

En parallèle de ce modèle, l'expression d'un KCC2 tronqué d'une région de son domaine C-terminal (911-1096) et non fonctionnel dans les neurones principaux de l'hippocampe adulte est suffisante pour perturber l'inhibition GABAergique, favoriser l'émergence de crises spontanées et récurrentes et induire une sclérose hippocampique (Kelley et al., 2018).

Cette étude est intéressante mais présente plusieurs limites. D'une part, la réduction de l'expression KCC2 soit disant restreinte à une sous-population de neurones pyramidaux de l'hippocampe est massive, conduisant à une réduction de plus de 70% ou 60% de l'expression de KCC2 21 jours après l'injection du virus dans CA1 ou dans le gyrus denté respectivement. De plus, l'expression d'un KCC2 tronqué d'une partie importante de son domaine C-terminal ne reflète pas forcément ce qui est observé dans la pathologie.

De manière intéressante et contrairement à ces études, le blocage pharmacologique complet de KCC2 avec un antagoniste (VU0463271) n'est pas suffisant pour induire des crises dans différents modèles. C'est le cas *in vitro* dans des tranches d'hippocampe et de subiculum (Anstötz et al., 2021; Kelley et al., 2016) et *in vivo* chez la souris (Sivakumaran et al., 2015). Seules des activités épileptiformes de type interictal sont générées à la suite du blocage de KCC2. De la même manière, la charge massive en Cl^- des neurones pyramidaux à l'aide d'outils optogénétiques induit une dépolarisation de l'E_{GABA}, une hyperexcitabilité du réseau et l'apparition d'oscillations à haute fréquence (HFOs), ressemblant fortement à celles observées dans le cerveau épileptique. Cependant, cela ne permet pas de générer d'activité ictale complète (Alfonsa et al., 2015).

Dans l'ensemble, ces données tempèrent sérieusement l'hypothèse d'une relation causale entre diminution d'expression de KCC2 et émergence d'activités épileptiformes. De plus, elles attirent l'attention sur un rôle différent de KCC2 dans la genèse des événements interictaux et ictaux. Cela est intéressant étant donné que des sous-populations différentes de cellules participent à l'activité préictale et interictale. Ainsi, les activités préictales dépendent des neurones pyramidaux et de la transmission glutamatergique tandis que les activités interictales impliquent à la fois les transmissions glutamatergique et GABAergique (Huberfeld et al., 2011). Des différences subtiles dans la fonction de KCC2 existeraient donc entre ces deux sous populations.

Une dernière possibilité pour étudier directement les conséquences de la perte de KCC2, en s'affranchissant des effets développementaux, consiste à supprimer de manière chronique le transporteur, *in vivo* dans le SNC adulte.

Cela est rendu possible par le développement de vecteurs viraux à fort tropisme neuronal permettant de réduire (par interférence ARN) ou abolir (par recombinaison d'allèles floxés) l'expression d'un gène de façon localisée et temporellement contrôlée.

Dans une publication récente, Chen et al., 2017 ont affirmé que la suppression de KCC2 dans le gyrus denté par interférence ARN chez le rat est suffisante pour provoquer des crises spontanées. Cependant, cette conclusion doit être prise avec précaution car elle n'est basée que sur 3 animaux contre 2 témoins. De plus, les auteurs évoquent un comportement de stade III sur l'échelle modifiée de Racine (défini par un clonus unilatéral des membres antérieurs) mais ne fournissent pas de film soutenant cette observation. Au lieu de cela, ils basent leur affirmation sur une courte (< 1 seconde) activité anormale observée dans les enregistrements EEG. Pourtant, les crises classiques de stade III durent généralement plusieurs secondes, tant au niveau comportemental qu'électrophysiologique, comme les auteurs eux-mêmes l'ont décrit dans la première figure de la publication et dans la vidéo supplémentaire. Par conséquent, la contribution de la régulation de KCC2 dans le contexte de l'épilepsie doit clairement faire l'objet d'un examen attentif et impartial.

Contrairement à cette étude, nous avons récemment montré dans l'équipe que la suppression de KCC2 dans le gyrus denté dorsal chez le rat adulte a peu d'effet sur la signalisation GABAergique au repos et n'induit pas de crises. En revanche, elle augmente l'excitabilité des cellules via une réduction de l'expression membranaire des canaux potassiques Task-3 (Goutierre et al., 2019b).

De plus, la suppression chronique de KCC2 dans tout l'hippocampe dorsal de la souris altère la rythmogenèse hippocampique et induit une hyperexcitabilité neuronale, conduisant à une altération de la mémoire spatiale et contextuelle chez ces animaux, mais ne déclenche pas d'activité épileptiforme ni des crises (Simonnet et al., 2022). Ces résultats sont en contraste complet avec ceux obtenus chez les modèles KO de KCC2 et présentés précédemment, qui montrent des crises épileptiques spontanées chez ces animaux.

Cependant, ils vont dans le sens des résultats obtenus avec des souris hypomorphes déficientes en KCC2 ou des souris KO pour KCC2 uniquement dans les interneurones PV, qui ne présentent pas de crises spontanées. Cela suggère donc que la perte complète de l'expression de KCC2 ou l'expression d'un transporteur tronqué, probablement dysfonctionnel, peut induire un phénotype plus sévère que celui induit par la diminution d'expression de KCC2 telle qu'observée dans la pathologie.

Ainsi, même s'il semble n'y avoir aucun lien causal direct entre diminution d'expression de KCC2 et épilepsie, il existe une forte corrélation entre diminution de l'expression du transporteur, altération de l'homéostasie neuronale des ions Cl^-, changement de la polarité de la transmission GABAergique, et émergence d'activités épileptiformes.

Par conséquent, une stratégie possible pour réduire l'émergence d'activités épileptiformes dans la pathologie consisterait à rétablir l'homéostasie neuronale des ions Cl^- en ciblant les CCCs.

III- Pharmacologie des CCCs

L'altération de l'expression relative des transporteurs NKCC1 et KCC2 observée dans la pathologie est associée à une élévation de la concentration intracellulaire de Cl^- et une perturbation de la transmission GABAergique. Deux possibilités sont alors envisageables afin de rétablir l'homéostasie neuronale des ions Cl^- et la polarité de la transmission GABAergique. La première consiste à bloquer le transporteur NKCC1 afin de limiter l'influx de Cl^- dans les neurones. La seconde vise à augmenter l'expression ou la fonction de KCC2 (Figure 22).

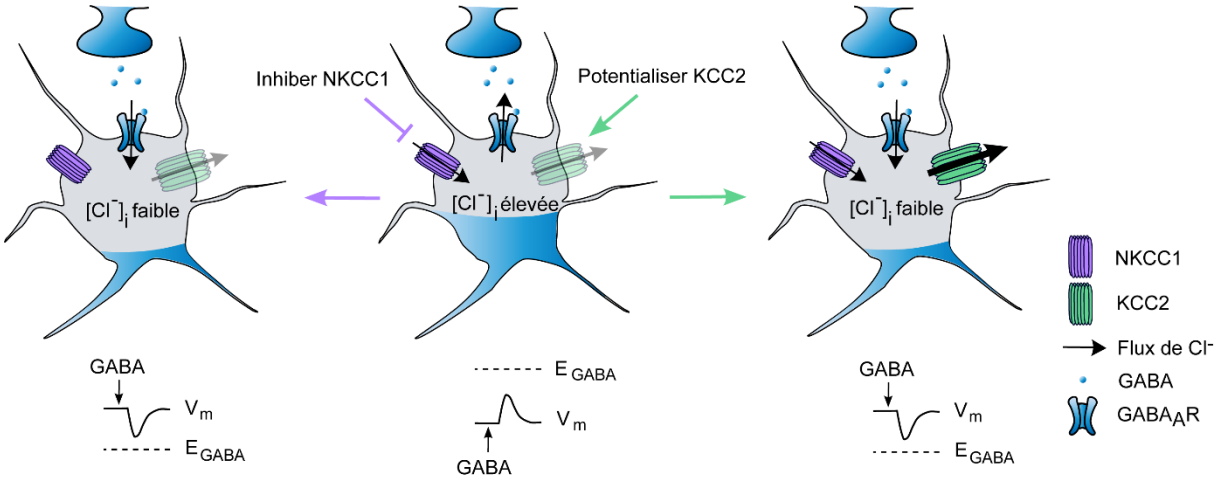


Figure 22. Stratégies pour restaurer l'homéostasie neuronale des ions Cl^- dans la pathologie.

L'altération du rapport d'expression NKCC1/KCC2 dans la pathologie (centre) conduit à une concentration intracellulaire élevée en ions Cl^-, pouvant conduire à des réponses GABAergiques dépolarisantes. Deux stratégies sont envisageables pour rétablir l'homéostasie neuronale des ions Cl^- et la polarité des réponses GABAergiques : inhiber NKCC1 (gauche) ou potentialiser l'expression ou la fonction de KCC2 (droite).

III.1- NKCC1 vs KCC2

La pharmacologie des co-transporteurs cation-chlorure a débuté avec le besoin clinique de diurétiques, et ce bien avant que leurs cibles moléculaires ne soient identifiées. En cas de diminution de la fonction cardiaque, comme dans l'insuffisance cardiaque congestive, le volume sanguin s'accumule, provoquant un œdème périphérique ou une accumulation anormale de liquide dans les espaces tissulaires. Ce problème est généralement traité dans un premier temps par des bêtabloquants, des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, ou des bloqueurs des récepteurs de l'angiotensine II. Des diurétiques sont ensuite utilisés dans un second temps pour éliminer le volume supplémentaire.

Le premier agent utilisé pour induire une diurèse a été le mercure (Stringham, 1807), un élément qui servait dès l'Antiquité de remède pour traiter les œdèmes. Des formes moins toxiques de mercure, comme le mersalyl, ont ensuite été utilisées (Barber, 1938). Le mercure agit probablement sur les co-transporteurs NKCC et NCC du tubule distal (Wilkinson et al., 1993), qui ont deux résidus cystéine voisins hautement conservés dans la boucle extracellulaire reliant TM7 et TM8. L'étude par cryo-EM du NKCC1 chez le poisson-zèbre a révélé que ces deux résidus forment un pont disulfure, qui stabilise probablement la structure du co-transporteur.

Les composés mercuriels pourraient donc interférer avec ce pont et inhiber la fonction du co-transporteur. Par la suite, les thiazides ont été les premiers composés non mercuriels utilisés en clinique pour induire une diurèse (Novello and Sprague, 1957). Ils ont été suivis de peu par l'utilisation d'une autre classe de diurétiques, les diurétiques de l'anse. Parmi eux, le frusémide (Ingram, 1964), maintenant appelé furosémide, présente une certaine similitude chimique avec la chlorothiazide et permet une excrétion de sodium plus de deux fois supérieure à celle des benzothiadiazines.

Ces diurétiques étant très efficaces, il n'y a eu que peu d'intérêt à développer leur pharmacologie. Cependant, on s'est rapidement rendu compte que ces composés peuvent cibler plusieurs CCCs, qui sont exprimés dans différents tissus de l'organisme et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques clés. Il a ainsi été observé que, contrairement aux diurétiques thiazidiques qui inhibent le co-transporteur NCC exprimé dans le tubule contourné distal du rein, le furosémide cible à la fois les co-transporteurs NKCC (Delpire et al., 1996; Hebert and Gullans, 1995) et KCC (Dunham et al., 1980; Lauf and Theg, 1980).

Le furosémide a ainsi joué un rôle clé dans la découverte du co-transporteur KCC dans les globules rouges ovins et humains (Dunham et al., 1980; Lauf and Theg, 1980). Ce transporteur a d'ailleurs été initialement défini comme un transporteur activable par le gonflement cellulaire et sensible au furosémide.

Cependant, ce diurétique a un effet beaucoup plus faible sur le co-transporteur KCC, puisqu'il agit de 2 à 3 ordres de grandeur moins efficacement que pour l'inhibition du co-transporteur NKCC. Néanmoins, la concentration résultante de furosémide dans le liquide tubulaire et l'absence de liaison à l'albumine dans le liquide tubulaire favorisent grandement l'inhibition de NKCC2 par rapport au NKCC1 systémique.

Le furosémide n'est donc pas un composé de choix si l'on souhaite inhiber spécifiquement NKCC1 ou potentialiser KCC2. Le bumétanide (acide 3-(butylamino)-4-phénoxy-5-sulfamoylbenzoïque) est un autre diurétique de l'anse, apparu en médecine clinique en 1972, comme un diurétique 40 fois plus puissant que le furosémide (Asbury et al., 1972). Il a été largement utilisé chez l'homme et dans différents modèles de pathologies dans le but de bloquer NKCC1. Cependant, comme on va le voir, ce composé n'est pas spécifique de NKCC1 et son utilisation en clinique présente plusieurs inconvénients (voir III.1.1.1.2). D'autres études se sont donc intéressées à identifier par le biais de criblages de banques de composés des composés augmentant l'expression et/ou la fonction de KCC2 (voir III.2).

III.1.1- Pharmacologie des inhibiteurs de NKCC1

III.1.1.1- Le bumétanide

Divers composés existent pour bloquer NKCC1. Parmi eux, le bumétanide, présente un potentiel thérapeutique dans la pathologie.

III.1.1.1.1- Potentiel thérapeutique du bumétanide

Le bumétanide est un diurétique très puissant, approuvé par la FDA, et largement utilisé dans le monde. Ce composé est dérivé de l'acide sulfamoylbenzoïque et a été synthétisé pour la première fois par Peter W. Feit en 1969 (Feit, 1971). Bien que les cibles exactes du bumétanide dans le rein au début de son développement ne fussent pas connues, il a par la suite été montré que ce composé cible relativement spécifiquement NKCC1 (Flatman and Creanor, 1999) et NKCC2 (Lykke et al., 2015) dans des érythrocytes aviaires ou des ovocytes de xénope.

Plusieurs études ont identifié le mode d'action du bumétanide sur NKCC1. Celui-ci empêche la liaison des ions Cl^- et bloque le transporteur en se fixant dans la partie interne du pore de translocation (Forbush and Palfrey, 1983; Somasekharan et al., 2012; Zhang et al., 2021b).

Il est intéressant de noter que malgré le fait que, théoriquement, NKCC1 puisse transporter des ions Cl^- dans les deux sens, seule l'application extracellulaire de bumétanide bloque NKCC1 (Brandt et al., 2018). Cela est probablement lié au fait que le bumétanide se lie à NKCC1 lorsque celui-ci adopte une conformation ouverte vers l'extérieur (Zhang et al., 2021b).

Étant donné le mode d'action du bumétanide, celui-ci a tout de suite représenté un composé à fort potentiel pour rétablir l'homéostasie neuronale des ions Cl^- dans la pathologie. Cette idée a été renforcée par le fait que ce composé abolit l'effet dépolarisant du GABA *in vitro* (Ben-Ari et al., 2007).

Le bumétanide a ainsi été testé dans de nombreuses maladies neurologiques et psychiatriques, telles que l'épilepsie, l'autisme ou la schizophrénie.

III.1.1.1.1.1- Épilepsie

L'efficacité anticonvulsivante du bumétanide, seul ou en complément, a par exemple été évaluée dans plusieurs modèles de crises néonatales.

Ce composé hyperpolarise E_{Cl-} dans les neurones immatures, supprime l'activité épileptiforme dans des tranches d'hippocampe *in vitro* et atténue les crises induites par l'acide kaïnique chez des rats nouveau-nés (Dzhala et al., 2005b). D'autres modèles *in vivo* ont aussi montré des effets anticonvulsivants du bumétanide. Ainsi, il réduit considérablement la susceptibilité aux crises induites par le PTZ dans un modèle rats nouveau-nés de lésion hypoxique-ischémique (Hu et al., 2017) ou dans un modèle de crises induites par « kindling » (Mazarati et al., 2009).

Le bumétanide a montré des effets intéressants en combinaison avec d'autres TAEs. *In vitro,* le bumétanide sert d'adjuvant efficace au phénobarbital, un barbiturique, pour supprimer l'activité de type ictale induite par un protocole en bas Mg^{2+} dans l'hippocampe immature (Dzhala et al., 2008). Cet effet positif est observé uniquement lors de la combinaison des deux composés mais pas avec le phénobarbital seul. Il s'explique par une hyperpolarisation de E_{GABA} et donc à un retour de l'action inhibitrice du GABA. Ces résultats ont par la suite été confirmés *in vivo,* dans un modèle de crises néonatales induites par l'hypoxie (Cleary et al., 2013).

Contrairement à ces résultats, une étude a mis en évidence que l'injection de bumétanide seul ou avec du phénobarbital n'a pas d'effet significatif sur la fréquence des crises néonatales chez le rat dans un modèle non invasif d'asphyxie à la naissance (Johne et al., 2021b). En comparaison, deux TAEs, le midazolam et le phénobarbital, montrent un effet antiépileptique dans ce modèle (Johne et al., 2021b). Ces différences observées entre les deux études ne peuvent pas s'expliquer par le mode d'injection (i.p. dans les deux cas) ni par la dose de bumétanide utilisée (0.15-0.30mg/kg dans (Cleary et al., 2013) et 0.30mg/kg dans (Johne et al., 2021b)).

En revanche, dans Johne et al., 2021b, un nouveau modèle d'induction de crise néonatale par asphyxie est utilisé (Ala-Kurikka et al., 2021). Dans ce modèle, les crises apparaissent pendant la phase de récupération à la suite de l'asphyxie et sont associées à une augmentation du pH sanguin et cérébral (Ala-Kurikka et al., 2021; Helmy et al., 2011; Pospelov et al., 2020), comme observé dans la pathologie chez l'homme (Pressler et al., 2021). Les effets du bumétanide obtenus sur ce modèle sont donc plus proches de ce qui pourrait être obtenu chez l'homme, en comparaison aux résultats obtenus sur d'autres modèles dans lesquels les crises sont induites par l'hypoxie/ischémie (Cleary et al., 2013) ou le kaïnate (Dzhala et al., 2005b; S. Wang et al., 2015).

Dans le même sens que les résultats obtenus dans l'étude de Johne et al., 2021b, le bumétanide seul échoue à traiter les crises néonatales induites par le pentylènetétrazole (PTZ) chez la souris (Kharod et al., 2018). L'effet peut être dose-dépendant comme âge-dépendant (Mares, 2009; Mazarati et al., 2009) et il ne fonctionne pas non plus en tant qu'adjuvant au phénobarbital dans un modèle de crises ischémiques (Kang et al., 2015). Il est intéressant de noter qu'une étude a observé un effet de l'injection chronique de bumétanide sur la fréquence des crises néonatales dans un modèle d'hypoxie. Toutefois, les auteurs suggèrent que l'injection systémique de bumétanide ne permet pas d'atteindre des concentrations de bumétanide suffisantes pour bloquer NKCC1 dans le cerveau (voir III.1.1.1.2) (S. Wang et al., 2015). Le bumétanide agit donc probablement sur une cible, autre que NKCC1, en dehors de la BHE (S. Wang et al., 2015) (voir III.1.1.1.3).

Bien que les effets du bumétanide soient variables entre les différentes études, deux essais thérapeutiques ont été effectués chez des nouveau-nés présentant des crises néonatales. Dans ces essais, le bumétanide a été utilisé comme adjuvant au phénobarbital, mais n'a montré aucune efficacité convaincante (Pressler et al., 2015; Soul et al., 2021).

De plus, l'un de ces essais, l'essai NEMO (Pressler et al., 2015), a été arrêté prématurément en raison de la perte d'audition observée chez 3 des 11 bébés survivants.

La perte auditive peut être attribuée aux effets synergiques de plusieurs facteurs, tels que l'immaturité des cellules ciliées, les différences entre les rôles de NKCC1 et KCC2 dans la régulation de $[Cl^-]i$ dans les cellules ciliées cochléaires immatures et adultes, et les effets des lésions hypoxiques et de la toxicité des aminoglycosides qui sont aggravés par le bumétanide (Abbas and Whitfield, 2009; Brummett et al., 1981; Lu et al., 1999; Milenković and Rübsamen, 2011; Witte et al., 2014; Wong et al., 2013; Zhang et al., 2007b).

Ces résultats peu probants du bumétanide sur les crises néonatales ont conduit à de vifs débats dans la communauté scientifique entre des chercheurs estimant que le bumétanide présente un intérêt thérapeutique dans le traitement des crises néonatales, et d'autres considérant que ce composé n'est pas une solution thérapeutique viable. Plusieurs échanges ont ainsi eu lieu entre K.Kaïla, K.Staley et Y.Ben-Ari sur ce sujet.

Ben Ari et Delpire (Ben-Ari and Delpire, 2021) ont par exemple commenté les résultats obtenus par Johne et al., 2021b. Surpris des différences observés entre l'étude de Johne et al., 2021b et Cleary et al., 2013, malgré les « différences mineures dans les conditions expérimentales », ils suggèrent que l'absence d'effet du bumétanide dans Johne et al., 2021b, serait lié au fait qu'il est nécessaire de faire des injections chroniques de bumétanide comme dans S. Wang et al., 2015. Cela rejoint l'observation selon laquelle l'effet du bumétanide n'est pas immédiat chez des enfants avec troubles du spectre autistique (Lemonnier et al., 2017). Cependant, cet argument n'est pas très pertinent ici, étant donné que Cleary et al., 2013 observent un effet du bumétanide malgré une injection unique.

Ben Ari et Delpire suggèrent également de faire un traitement préventif avec du bumétanide plutôt que de le faire dans des conditions où il y a déjà eu de nombreuses crises. En effet, l'action du bumétanide peut être entravée par l'augmentation des niveaux de $[Cl^-]_i$ neuronaux, et le changement de polarité du GABA, produits par les crises récurrentes (Ben-Ari et al., 2012b). L'efficacité de l'action du bumétanide dépendrait donc fortement de la sévérité et de la fréquence des crises, qui ont lieu avant son administration.

Cet argument, bien qu'intéressant, n'est pas applicable à l'étude de Johne et al., 2021b, qui montre que ni un traitement préventif avec du bumétanide avant la période d'asphyxie, ni un traitement avant l'émergence de crise après la phase d'asphyxie n'a d'effet sur les crises néonatales (Johne et al., 2021b).

Enfin, Ben Ari et Delpire suggèrent que les effets ototoxiques observés dans l'essai NEMO sont probablement liés au fait que les bébés ont également reçu de manière concomitante de fortes doses d'aminoglycosides, connus pour leur action ototoxique (Brummett et al., 1981). L'ototoxicité pourrait aussi être liée au fait que le bumétanide a été injecté par voie intraveineuse à des doses très élevées (0,05, 0,1, 0,2 et 0,3 mg/kg), pouvant être toxiques.

En réponse, Lösher et Kaila (Löscher and Kaila, 2021), ont souligné le fait que le protocole utilisé dans Johne et al., 2021b, n'est pas un protocole d'hypoxie comme dans Cleary et al., 2013, mais un protocole d'asphyxie qui reproduit bien mieux la pathologie humaine, comme je l'ai précisé précédemment. Il n'y a donc pas de « différences mineures dans les conditions expérimentales », et la variabilité d'effet du bumétanide sur les crises s'expliquerait probablement par le protocole utilisé.

Lösher et Kaila, remettent également en question l'argument selon lequel le bumétanide a été injecté par voie intraveineuse à des doses très élevées et toxiques dans l'essai NEMO. En effet, ils expliquent que les doses de bumétanide administrées par voie intraveineuse dans l'essai NEMO se situent dans l'intervalle des doses utilisées (et approuvées) pour l'induction de la diurèse chez les nouveau-nés et sont généralement considérées comme sûres (Pacifici, 2012). Löscher and Kaila, 2021, mettent aussi en lumière les nombreuses limites à l'utilisation du bumétanide, que je détaille plus loin (voir III.1.1.1.2).

Staley (Staley, 2022), a ensuite critiqué le modèle utilisé dans Johne et al., 2021b, en expliquant que ce modèle est relativement proche d'un modèle utilisé dans une autre équipe (Woodbury et al., 1958a, 1958b; Woodbury and Karler, 1960), et qui selon lui présente de nombreuses limites. Parmi celles-ci, Staley, met en évidence que le modèle ne permet pas de prédire l'efficacité des anti-convulsivants dans les crises humaines. Il cite notamment l'étude de Woodbury et al. qui ont constaté que les crises sont aggravées par des doses thérapeutiques de phénytoïne (Woodbury et al., 1958a), tandis que le contraire se produit dans les crises néonatales humaines (Painter et al., 1999). Un autre argument de Staley, est que l'hypoxie et l'ischémie ne sont pas nécessaires pour induire des crises dans ce modèle (Yoshioka et al., 1996).

Enfin, Staley, défend aussi l'ototoxicité observée dans l'essai NEMO, suggérant qu'elle serait liée au fait qu'une incidence de 10 % de la perte auditive est observée dans des patients atteints de crises néonatales (Smit et al., 2013). De plus, comme Ben Ari et Delpire, il explique que l'ototoxicité du bumétanide n'a pas été démontrée expérimentalement et que cet effet est lié au fait que le bumétanide et d'autres diurétiques de l'anse augmentent l'ototoxicité des aminoglycosides (Brummett et al., 1981; Taylor et al., 2008).

Kaila et Lösher (Kaila and Löscher, 2022), ont répondu à cette critique en expliquant à nouveau que l'objectif principal du modèle de Johne et al., 2021b, est de ne pas induire de crises néonatales par hypoxie ou ischémie, et que leur modèle est différent du modèle de Woodbury et al. Kaila et Lösher, soulignent à nouveau le fait que l'utilisation du bumétanide *in vivo* présente plusieurs limites marquées entre autre par une faible perméabilité de la BHE au bumétanide ainsi que par l'expression ubiquitaire de NKCC1 dans différents organes et types cellulaires (voir III.1.1.1.2).

De manière surprenante, et après de nombreux arguments visant à défendre l'effet du bumétanide, Ben-Ari and Delpire, 2021 parviennent à la conclusion que le bumétanide n'est probablement pas un médicament adéquat pour traiter les crises néonatales. Néanmoins, cela n'exclut pas son utilité dans d'autres troubles, y compris d'autres types d'épilepsies.

En dehors des crises néonatales, le bumétanide a ainsi été testé dans d'autres formes d'épilepsie. Le potentiel antiépileptique du composé a ainsi été mis en évidence dans un modèle génétique d'épilepsie chez la souris (Marguet et al., 2015), et dans différents modèles d'induction d'épilepsie chez la souris (Kourdougli et al., 2017b; Sivakumaran and Maguire, 2016).

Le bumétanide réduit l'activité ictale et les évènements épileptiformes induits par le kaïnate *in vivo* et *in vitro* (Sivakumaran and Maguire, 2016) ainsi que les crises spontanées et les activités épileptiformes chez des souris ayant une épilepsie chronique (Kourdougli et al., 2017b).

Des effets intéressants sont également observés directement sur du tissu humain épileptique. Il supprime ainsi les activités de type interictal sur du tissu réséqué de patients atteints de FCD (Blauwblomme et al., 2019) ou d'ELT (Huberfeld et al., 2007b). En continuité avec ces résultats, le bumétanide réduit la fréquence des crises chez deux patients sur trois atteints d'ELT (Eftekhari et al., 2013).

Enfin, une étude a aussi testé l'effet du bumétanide dans un petit groupe de patients atteints de STC, une maladie fortement associée à de l'épilepsie (van Andel et al., 2020). Le bumétanide n'a eu aucun effet sur la fréquence des crises tout en ayant des effets significatifs sur le comportement irritable, social et hyperactif. De plus, l'absence de groupe placebo dans cette étude questionne sérieusement la rigueur de ces travaux.

III.1.1.1.1.2- Autisme et schizophrénie

L'épilepsie est environ 20% plus fréquente chez les patients atteints de troubles autistiques (Besag, 2017). Les crises des patients autistes sont souvent résistantes aux TAEs classiques (Sansa et al., 2011). Comme on a pu le voir précédemment (voir II.1.2), cela serait lié à une $[Cl^-]_i$ élevée et à une transmission GABAergique excitatrice, ce qui expliquerait l'effet paradoxal du phénobarbital (Lemonnier et al., 2012).

Sur la base de ces hypothèses, la réduction du $[Cl^-]_i$ à l'aide de bumétanide s'est avérée efficace dans un modèle murin d'autisme (Tyzio et al., 2014b).

Afin de tester l'effet du bumétanide directement sur les troubles autistiques, une série d'essais cliniques a été menée par l'équipe de Yehezkel Ben-Ari chez des patients atteints de troubles du spectre de l'autisme.

Après une étude pilote (Lemonnier and Ben-Ari, 2010), deux essais cliniques ont été effectués. Le bumétanide a été administré à la posologie de 1 mg/jour pendant trois mois chez 60 et 88 patients, allant respectivement de l'enfance à l'âge adulte (Lemonnier et al., 2017, 2012). Les deux essais ont suggéré que le traitement par bumétanide améliore significativement les scores de l'échelle d'évaluation de l'autisme infantile (CARS), et atténue la gravité du trouble dans son ensemble, sans effets secondaires majeurs autres que la diurèse (Lemonnier et al., 2017, 2012). Deux autres essais thérapeutiques ont également montré un effet bénéfique du bumétanide sur les troubles autistiques chez les enfants (Du et al., 2015; L. Zhang et al., 2020).

Contrairement à ces études, un essai plus récent, testant l'effet du bumétanide sur les principaux symptômes des troubles autistiques, a montré des résultats négatifs (Sprengers et al., 2021). Les auteurs ont ainsi conclu que "la prescription aléatoire de bumétanide pour des enfants atteints de troubles autistiques n'est pas recommandée."

Cependant, l'équipe de Ben Ari a souligné le fait que dans cette étude, les auteurs ont négligé l'effet significatif du bumétanide sur les comportements répétitifs, qui sont un symptôme central des troubles du spectre autistique (Lemonnier et al., 2021).

De plus, des travaux, menés par la même équipe que Sprengers et al., 2021, avaient précédemment montré que le bumétanide est capable d'atténuer de manière significative les caractéristiques comportementales des patients atteints de sclérose tubéreuse (van Andel et al., 2020).

Malgré les effets bénéfiques du bumétanide mis en avant par Y. Ben Ari, une méta-analyse, combinant les résultats d'études sur le sujet, a dressé le même constat que Sprengers et al., 2021, à savoir que le bumétanide n'a, au mieux, qu'un avantage modeste pour le traitement des troubles autistiques. Enfin, les résultats de deux vastes essais cliniques, menés notamment par la société NeuroChlore, fondée par Y.Ben-Ari, et évaluant l'effet du bumétanide chez plusieurs centaines d'enfants et d'adolescents atteints de troubles autistiques modérés à sévères, n'ont montrés eux aussi aucune efficacité.

Cela a conduit à l'arrêt précoce des essais et à la fermeture de NeuroChlore (https://servier.com/fr/communique/servier-et-neurochlore-annoncent-les-principaux-resultats-des-deux-etudes-cliniques-de-phase-3-evaluant-la-bumetanide-dans-le-traitement-des-troubles-du-spectre-autistique-chez-lenfant-et-l/).

Etant donné l'expression accrue de l'ARNm de NKCC1 chez des patients atteints de schizophrénie (Dean et al., 2007) le bumétanide présente également un potentiel thérapeutique dans cette pathologie.

Dans une étude de cas (Lemonnier et al., 2016) et une petite étude pilote (Rahmanzadeh et al., 2017a), le bumétanide a réduit les hallucinations chez les patients schizophrènes. Cependant, il n'a pas eu d'effet dans des tests supplémentaires, dans lesquels une autre échelle d'évaluation a été utilisée (Rahmanzadeh et al., 2017b).

III.1.1.1.2- Limites à l'utilisation du bumétanide

Le bumétanide présente donc des résultats encourageants dans différents modèles *in vitro* et *in vivo* de pathologie. Néanmoins, les résultats semblent être très variables d'une étude à l'autre et les essais cliniques réalisés chez les patients sont à ce jour non concluant, révélant même parfois l'apparition d'effets secondaires importants. Comment expliquer ces disparités et ce manque d'effet évident ?

Tout d'abord, il faut comprendre que ces études se sont basées sur l'hypothèse que ce médicament délivré par voie systémique aurait une action efficace et spécifique sur la signalisation GABAergique centrale *in vivo*. Or, à ce jour, aucune étude n'a démontré que c'était le cas.

De plus, l'utilisation du bumétanide, pour des affections du SNC, soulève plusieurs problèmes. Le premier réside dans les propriétés même du composé, qui limitent son passage à travers la BHE (Figure 23). Le bumétanide est un acide carboxylique relativement fort (pKa = 3.6) avec, par conséquent, un taux d'ionisation au pH physiologique très élevé (>99%) (Song et al., 2011). De plus, il s'associe étroitement aux protéines plasmatiques telles que l'albumine. Etant donné que le bumétanide inhibe NKCC1 à partir d'un site extracellulaire, son ionisation élevée ne pose pas de problème pour une utilisation *in vitro*, ou pour agir sur des cibles du SNC qui ne sont pas protégées par la BHE (telle que la membrane luminale de l'endothélium vasculaire cérébral) (Puskarjov et al., 2014a). Cependant, ces deux aspects limitent considérablement sa distribution tissulaire et son passage à travers la BHE *in vivo*, car seules les formes non liées et non ionisées du bumétanide sont capables de diffuser à travers les membranes.

Dans plusieurs études, le bumétanide a été administré par voie systémique, puis les niveaux cérébraux de bumétanide *in vitro* ont été mesurés après sacrifice des animaux (Puskarjov et al., 2014a). Selon ces études, il serait nécessaire d'injecter des doses ≥2 mg/kg par voie systémique si l'on souhaite atteindre des niveaux cérébraux de bumétanide dans la plage de concentration minimale inhibitrice de NKCC1 (0.1-0.3 µM ; (Puskarjov et al., 2014a)). Cependant, il est important de noter que la majorité de ces études n'ont pas pris en compte la liaison non spécifique du bumétanide aux protéines plasmatiques. Or, cette liaison réduit les niveaux libres du composé de 83% et 77% dans des homogénats de cerveaux de souris ou de rats respectivement (Brandt et al., 2018; Donovan et al., 2016), et seul le médicament libre (non lié) peut interagir avec NKCC1.

Cette réduction est encore plus importante *in vivo*. Donovan et al., 2015, ont mesuré les concentrations de bumétanide par microdialyse du liquide extracellulaire de l'hippocampe après un bolus de bumétanide (10 mg/kg) et une perfusion intraveineuse (i.v.) continue (6 mg/kg/h) chez le rat. Ils observent que seulement 9.6% des niveaux initiaux de bumétanide sont présents dans les dialysats (Donovan et al., 2015).

Cela signifie que la concentration extracellulaire (fonctionnellement pertinente) de bumétanide dans le cerveau est largement inférieure à celle obtenue dans les études *in vitro*, et qu'il faudrait injecter des doses nettement supérieures à 2 mg/kg par voie systémique si l'on souhaite avoir un effet inhibiteur de NKCC1 par le bumétanide.

D'autre part, il existerait, au niveau de la BHE, un transport actif de bumétanide. Suite à une injection i.v., le bumétanide pénètre rapidement dans le cerveau (2min) (Hampel et al., 2021b), probablement via un transport actif médié par les transporteurs au monocarboxylate (MCT) (Murakami et al., 2005). Cependant, les niveaux de bumétanide diminuent très rapidement en 15-30min. Cela serait dû à un efflux actif rapide de bumétanide via les transporteurs d'anions organiques (OAT) (Donovan et al., 2015; Römermann et al., 2017a; Töllner et al., 2015). En effet, il a été démontré que le probénécide, un inhibiteur du transporteur OAT3, augmente les niveaux cérébraux de bumétanide (Donovan et al., 2015; Töllner et al., 2015). Etant donné les faibles concentrations de bumétanide dans le cerveau, l'efflux serait plus important que l'influx, suggérant que l'activité de l'OAT3 pourrait contribuer de manière significative au faible niveau cérébral de bumétanide après une administration systémique (Löscher et al., 2013).

L'ionisation élevée du bumétanide, sa liaison avec les protéines plasmatiques, sa diffusion limitée à travers la BHE, et l'efflux rapide via les transporteurs OAT, entraînent ainsi de faibles rapports de concentration cerveau/plasma (Figure 23).

Étant donné que les concentrations de bumétanide détectées dans le cerveau après une administration systémique sont bien inférieures à ce qui est nécessaire pour bloquer NKCC1, il est essentiel d'administrer des doses plus élevées de bumétanide. Cette augmentation nécessaire de la dose injectée induit alors un risque plus important d'effets secondaires (Figure 23) qui vont être renforcés par deux aspects.

Le premier est que, comme vu précédemment, NKCC1 n'est pas exprimé uniquement dans les neurones mais également dans de nombreux tissus de l'organisme et dans différents types cellulaires (voir I.1.3.1 et I.1.3.2). Le bumétanide, injecté par voie systémique, agit donc dans différents organes, comme le foie ou le rein. NKCC1 est fortement exprimé dans ces derniers et le bumétanide peut s'y accumuler via un transport actif médié par les OAT (Burckhardt, 2012). Le rapport de concentration organe/plasma du bumétanide va donc être beaucoup plus important dans ces organes (Figure 23).

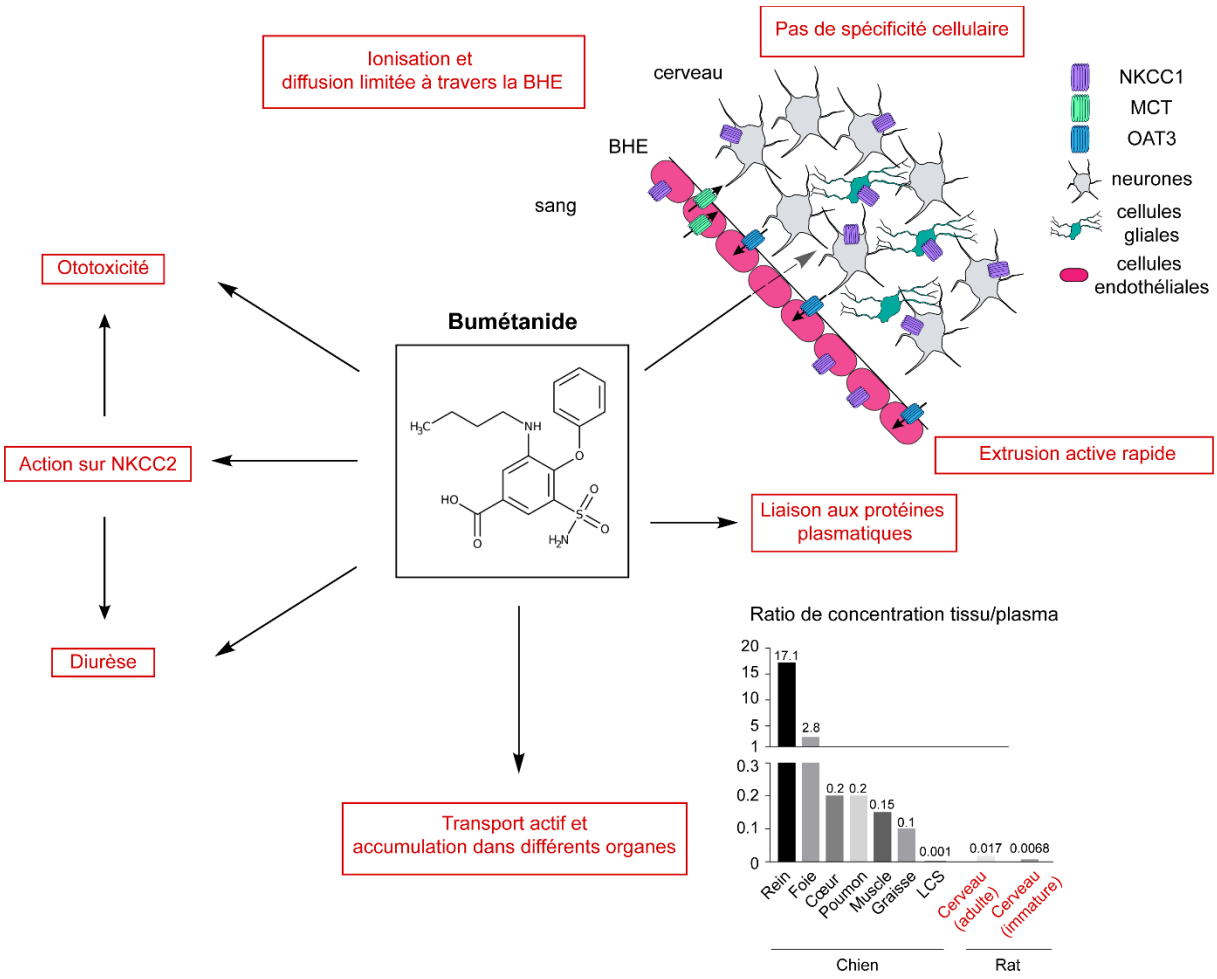


Figure 23. Limites à l'utilisation du bumétanide dans les affections neurologiques et psychiatriques.

L'injection systémique de bumétanide dans le cadre des affections cérébrales pose problème à plusieurs niveaux. D'une part le bumétanide est fortement ionisé et se lie aux protéines plasmatiques limitant ainsi la fraction de molécule active pouvant diffuser à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE). D'autre part, même s'il peut être transporté activement dans le cerveau via les transporteurs au monocarboxylate (MCT), son extrusion rapide, via les transporteurs d'anions organiques (OAT) tel qu'OAT3, maintient des niveaux faibles de bumétanide dans le cerveau. La fraction restante de bumétanide agit sur NKCC1, mais sans spécificité cellulaire. Le ratio de concentration de bumétanide tissu/plasma est extrêmement faible dans le cerveau tandis qu'il est plus élevé dans d'autres organes où un transport actif permet son accumulation. Enfin, l'inhibition de NKCC1 dans d'autres organes, couplée à l'action du bumétanide sur NKCC2, conduit à de nombreux effets secondaires, tels qu'une ototoxicité ou une diurèse pouvant conduire à une hypokaliémie. Les données du ratio de concentration proviennent de Brandt et al., 2010b; Cohen et al., 1976b; Javaheri et al., 1993; Li et al., 2011.

Le second réside dans le fait que le bumétanide ne cible pas uniquement NKCC1. En effet, il ne faut pas oublier qu'il agit aussi en bloquant NKCC2, de même que KCC2, à des concentrations élevées (Delpire et al., 2009).

Comme indiqué dans le chapitre sur l'expression des CCCs (voir I.1.3.1), NKCC2 est lui aussi exprimé dans différents organes dont le tractus gastro intestinal (Zhu et al., 2011b), le pancréas (Alshahrani et al., 2012) et même au niveau de l'oreille interne, où il régulerait avec NKCC1 le volume de l'endolymphe (Akiyama et al., 2010; Kakigi et al., 2009; Nishimura et al., 2009).

Le bumétanide (0.05-0.3 mg/kg chez les nouveau-nés et les enfants, 0.5-2 mg/kg chez les adultes), induit ainsi une diurèse marquée chez l'homme. Celle-ci peut entraîner une déplétion volumique et électrolytique ainsi qu'une hypokaliémie. De plus, le bumétanide présente une forte ototoxicité et notamment chez les nouveau-nés (Ding et al., 2016; Pressler et al., 2015; Soul et al., 2021), ce qui explique les effets observés dans les essais cliniques sur les crises néonatales (Löscher and Kaila, 2021; Pressler et al., 2015; Song et al., 2011).

Enfin, si l'on se réfère aux explications précédentes, les faibles doses de bumétanide utilisées en clinique ne permettent pas d'atteindre des niveaux inhibiteurs de NKCC1 dans le parenchyme cérébral adulte (Brandt et al., 2018), ni dans le cerveau néonatal (Cleary et al., 2013; Johne et al., 2021b; Li et al., 2011). Cela signifie que les effets du bumétanide rapportés dans les troubles du SNC ne sont probablement pas liés à l'inhibition de NKCC1 au niveau cérébral (Löscher and Kaila, 2021).

III.1.1.1.3- Effets « off-target » possibles du bumétanide

Plusieurs mécanismes indépendants de l'inhibition de NKCC1 dans le cerveau peuvent expliquer l'effet du bumétanide dans la pathologie. J'en présente ici une liste non exhaustive.

NKCC1 est fortement exprimé à la membrane luminale de l'endothélium vasculaire cérébral. Cela lui permet de contribuer à la composition ionique et au volume du liquide interstitiel cérébral. Il jouerait donc un rôle essentiel lors de la formation d'œdèmes ioniques et dans le gonflement du parenchyme à la suite d'une agression cérébrale. Les œdèmes cérébraux sont l'un des principaux facteurs de mortalité et de crises précoces, et peuvent également être impliqués dans le développement de l'épilepsie acquise (Donkin and Vink, 2010; Glykys et al., 2017; Iffland et al., 2014). Ainsi, il a été proposé qu'une réduction du volume (et de la pression) intracérébral, via l'inhibition de NKCC1 au niveau de la BHE, pourrait contribuer à l'effet antiépileptique du bumétanide (Auer et al., 2020; Puskarjov et al., 2014a).

Il est intéressant de noter que des effets anti-convulsivants d'autres diurétiques non inhibiteurs de NKCC1, comme le mannitol, ont aussi été rapportés (Haglund and Hochman, 2005; Kharod et al., 2019; Löscher et al., 2013). Cela suggère que l'effet diurétique du bumétanide pourrait contribuer à lui seul à ses effets anti-convulsivants (Hesdorffer et al., 2001), et pourrait également être impliqué dans l'amélioration des symptômes dans d'autres troubles du SNC.

NKCC1 est également exprimé dans de nombreuses cellules impliquées dans l'inflammation chronique et le système immunitaire (Hung et al., 2018; Norlander et al., 2017; Panet et al., 2002; Perry et al., 2019) qui, à leur tour, sont connues pour être en communication bidirectionnelle étroite avec les systèmes nerveux central et périphérique (Chavan et al., 2017; Miller et al., 2017; Pavlov et al., 2018; Tracey, 2002). Il a notamment été démontré que ces interactions contribuent à de nombreuses manifestations cliniques, y compris les troubles du spectre de l'autisme (Brown et al., 2004; Dawidowski et al., 2021; Hodes et al., 2015; Vargas et al., 2005). Ainsi, il est tout à fait possible que le bumétanide, administré de manière systémique, ait des actions sur la maladie en agissant sur ces voies.

Le stress a un effet potentialisateur bien connu sur les crises. Il a ainsi été démontré que l'activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA), induite par les crises augmente la fréquence de ces dernières (Hooper et al., 2018). Le bumétanide a été montré comme ayant une action anxiolytique (Ko et al., 2018), via le blocage de NKCC1 au niveau du noyau paraventriculaire, dans les cellules neuroendocrines libérant de la corticotrophine. Cela limite ainsi l'activation de l'HPA (Hooper et al., 2018; Maguire and Salpekar, 2013). De plus, NKCC1 est exprimé de manière robuste dans la glande surrénale (Hübner et al., 2001a), renforçant son effet sur l'HPA. En accord avec les effets endocriniens du bumétanide, il a été démontré qu'une faible dose du médicament (0.2 mg/kg i.p.) bloque l'activation de l'axe HPA, induite par les crises, et diminue ainsi la sensibilité aux crises chez les souris adultes (Hooper et al., 2018). Il est également intéressant de noter que l'autisme est associé à une réactivité accrue de l'axe HPA au stress (Hollocks et al., 2014; Spratt et al., 2012). Ainsi, l'effet du bumétanide sur l'HPA pourrait expliquer son potentiel thérapeutique dans différentes affections du SNC.

Enfin, comme la plupart des diurétiques de l'anse, le bumétanide contient un groupe sulfamoyle, qui permet sa liaison avec l'anhydrase carbonique (AC) (Carta and Supuran, 2013). L'effet antiépileptique du bumétanide pourrait donc passer par l'inhibition de l'AC, comme c'est le cas de différents TAEs (voir II.2.6.1). Cette hypothèse n'a pas encore été examinée et reste à démontrer.

III.1.1.2- Autres composés ciblant NKCC1

Le bumétanide n'est pas le seul diurétique approuvé cliniquement et ayant une action sur NKCC1. C'est également le cas d'autres diurétiques de l'anse dérivés de l'acide 5-sulfamoylbenzoïque, tels que le furosémide, le pirétanide et le benzmétanide. Cependant, contrairement au bumétanide, ces derniers médicaments ne sont pas sélectifs pour les NKCCs, mais bloquent également KCC2 à des concentrations à peu près similaires (Alvarez-Leefmans, 2001; Russell, 2000b). Outre les dérivés de l'acide sulfamoylbenzoïque, d'autres diurétiques de l'anse non-acides, et ayant des structures chimiques légèrement différentes, sont également utilisés en clinique. Parmi ces composés l'azosémide est d'un intérêt tout particulier. En effet, ce composé inhibe 4 fois plus puissamment NKCC1 que le bumétanide dans des ovocytes de xénope (Hampel et al., 2018). L'isoforme A du NKCC1 humain (hNKCC1A) ou l'isoforme B (hNKCC1B) présentent ainsi respectivement une IC50 de 0.246 µM ou 0.197 µM pour l'azozémide. En comparaison, ces valeurs sont respectivement de 0.945 µM et 0.842 µM pour le bumétanide (Hampel et al., 2018). L'azozémide est également 12 fois plus puissant pour inhiber NKCC1 par rapport à NKCC2 (IC50 : 3 µM) (Hampel et al., 2018).

En raison de l'absence de groupes acides dans ce composé, on pourrait s'attendre à ce qu'il pénètre dans le cerveau plus efficacement que le bumétanide. Cependant, une étude pharmacocinétique chez la souris a montré que le rapport cerveau/plasma de l'azosémide est aussi faible que celui du bumétanide. Cela est probablement dû à l'extrusion rapide via les OATs (Hampel et al., 2021c). D'un point de vue thérapeutique, l'azosémide n'a pas d'effet anticonvulsif à lui seul, mais potentialise l'effet du phénobarbital chez des souris présentant une épilepsie chronique (Hampel et al., 2021a). Ces données suggèrent que l'azosémide partage le mode d'action du bumétanide en tant qu'adjuvant du phénobarbital.

Bien que ces composés constituent des alternatives intéressantes au bumétanide, ils présentent néanmoins une mauvaise pénétration cérébrale (Frey et al., 1979; Frey and Löscher, 1980; Löscher, 1985; Löscher et al., 1983). Cela a donc lancé la recherche de nouvelles approches pharmacologiques pour inhiber NKCC1 dans le SNC. Parmi elles, des prodrogues lipophiles du bumétanide ont été développées (Töllner et al., 2014). La pénétration cérébrale de ces composés a été comparée et l'ester N,N-diméthylaminoéthylique du bumétanide (DIMAEB ; également appelé BUM5 ou STS5) semble être le composé le plus intéressant. En effet, ce composé présente plusieurs avantages.

D'une part, il pénètre rapidement dans le cerveau des souris et des rats, et est clivé en bumétanide, donnant ainsi des niveaux cérébraux de bumétanide 3 à 5 fois plus élevés que ceux observés après l'administration systémique d'une dose équivalente de bumétanide. D'autre part, il présente un potentiel thérapeutique intéressant dans l'épilepsie. Le DIMAEB potentialise, par exemple, l'effet anti-convulsivant du phénobarbital chez des rats et des souris épileptiques de façon plus marquée que le bumétanide. De plus, il a été montré que le DIMAEB possède aussi un effet sur le seuil des crises induites pendant la phase d'épileptogenèse, dans un modèle murin d'épilepsie induite par la pilocarpine (Töllner et al., 2014). Plus récemment, il a été montré, dans un modèle d'asphyxie périnatale chez le rat (Ala-Kurikka et al., 2021), que le DIMAEB potentialise de manière significative l'effet anti-convulsivant du phénobarbital sur les crises néonatales. Cela est intéressant car en comparaison, le bumétanide, même à une dose élevée (10 mg/kg), est inefficace avec et sans phénobarbital (Johne et al., 2021a, 2021b). Enfin, et de manière surprenante, le DIMAEB est moins diurétique que le bumétanide, malgré des taux plasmatiques de bumétanide plus élevés par rapport au DIMAEB. Cela peut s'expliquer par le fait que le DIMAEB semble inhiber le transport actif du bumétanide médié par OAT3 (Römermann et al., 2017b). L'ensemble de ces résultats souligne le fait que le DIMAEB pourrait constituer une bonne alternative au bumétanide dans différentes pathologies du SNC (Erker et al., 2016; Töllner et al., 2014).

Enfin, un nouvel inhibiteur sélectif de NKCC1 (pas d'inhibition de NKCC2 ou de KCC2), et présentant une meilleur pénétration de la BHE, a été récemment découvert. Cette nouvelle molécule, ARN23746, appartient à une classe chimique d'acides 4-amino-3-(alkylsulfamoyl)-benzoïques (Borgogno et al., 2021; Savardi et al., 2020).

L'ARN23746 (0.2 mg/kg) semble rétablir les déficits cognitifs dans un modèle murin de syndrome de Down, ainsi que les comportements sociaux/répétitifs dans un modèle murin d'autisme, sans effet diurétique et sans toxicité lors du traitement chronique chez les animaux adultes (Savardi et al., 2020). Bien que ces données soient intéressantes, les auteurs ne présentent aucune donnée avec des doses plus élevées d'ARN23746. Il est utile de souligner ici que le bumétanide, n'induit pas non plus de diurèse chez la souris à une dose aussi faible (Olsen, 1977). Cela signifie que la prétendue sélectivité sur NKCC1 et l'absence d'action diurétique de l'ARN23746 sont simplement basées sur les faibles concentrations et doses utilisées, plus que sur les véritables caractéristiques du médicament.

III.1.2- Pourquoi cibler KCC2 plutôt que NKCC1 ?

NKCC1 représente une cible attrayante pour rétablir l'homéostasie neuronale des ions Cl^-, la polarité de la signalisation GABAergique, et par conséquent pour réduire l'émergence d'activités pathologiques dans différents modèles de maladies neurologiques et psychiatriques. Le bumétanide montre ainsi des effets bénéfiques *in vitro* et *in vivo* dans l'épilepsie, l'autisme et la schizophrénie. Cependant, comme on a pu le voir, cibler NKCC1 pose problème à différents niveaux. Les résultats rapportés dans différentes études utilisant le bumétanide et d'autres composés ciblant ce transporteur en sont un bon exemple.

D'une part, NKCC1 est exprimé dans différents tissus et types cellulaires et d'autre part, il n'existe pas actuellement, et à ma connaissance, de composé ciblant uniquement NKCC1. La combinaison de ces deux paramètres augmente considérablement les risques d'effets secondaires, ce dont témoignent les résultats obtenus en clinique. Un autre problème majeur réside dans le fait que les composés actuels passent difficilement à travers la BHE, et que les concentrations de composés actifs à l'intérieur du cerveau sont souvent en deçà des concentrations inhibitrices minimales. Comme discuté, il est possible que l'effet du bumétanide dans la pathologie ne passe même pas par un effet sur le SNC.

Si l'on souhaite cibler NKCC1 dans des affections du SNC, il donc est nécessaire de développer de nouveaux composés passant plus facilement la BHE, beaucoup plus spécifiques et avec des pharmacocinétiques bien meilleures. Malheureusement, les alternatives actuelles au bumétanide présentent les mêmes inconvénients que le bumétanide. Seul le DIMAEB présente des résultats intéressants, mais des tests supplémentaires, et notamment cliniques, sont nécessaires pour confirmer son potentiel thérapeutique.

En complément des études cherchant à identifier de nouveaux composés bloquant NKCC1, les travaux en cours et à venir de modélisation moléculaire sur les structures à haute résolution de NKCC1 dans diverses espèces s'avèrent particulièrement intéressants (Chew et al., 2019; Yang et al., 2020). Ces travaux vont permettre à coup sûr de faciliter la conception de la prochaine génération d'inhibiteurs sélectifs de NKCC1 et présentant une biodisponibilité cérébrale accrue.

Une alternative à ces approches ciblant NKCC1 pourrait consister au contraire à potentialiser KCC2. Cette approche présente un avantage considérable puisque KCC2 est presque exclusivement exprimé dans le cerveau, et que son expression et sa fonction sont fortement dérégulées dans différentes pathologies, dont l'épilepsie.

Comme on a pu le voir, la régulation de l'expression et de la fonction de KCC2 est bien connue, offrant différentes possibilités d'approches thérapeutiques. De plus, cibler KCC2 permet non seulement d'agir sur sa fonction de transport d'ions Cl^-, dans le but de rétablir l'homéostasie neuronale de ces ions, mais aussi de moduler positivement les nombreuses fonctions non-canoniques du transporteur, telles que la régulation de l'excitabilité neuronale, qui pourraient être affectées secondairement à la réduction de l'expression de KCC2 (Goutierre et al., 2019b).

III.2- Comment potentialiser la fonction de KCC2 ?

III.2.1- Augmenter l'expression génique du transporteur

La première possibilité afin d'augmenter l'expression membranaire, et donc la fonction du transporteur, consiste à agir directement en favorisant la transcription du gène codant pour KCC2.

III.2.1.1- Identification des potentialisateurs d'expression de KCC2 (PEKs)

Comme on va le voir, les études visant à identifier des modulateurs de KCC2 ont été conduites en partie sur des lignées de cellules hétérologues, n'exprimant pas KCC2 de façon endogène, et nécessitant par conséquent une surexpression de la protéine (voir III.2.3). Ces études n'ont pas permis d'identifier de composés qui augmentent l'expression du transporteur, probablement masquée par cette surexpression et par le fait que ces cellules ne présentent pas la même régulation cellulaire et génomique complexe de KCC2 que celle observée dans les neurones.

Ce n'est que récemment, qu'une étude a identifié différents composés pouvant augmenter l'expression génique de KCC2 dans les neurones (Tang et al., 2019). Pour ce faire, et avec les technologies d'édition de gènes CRISPR-Cas9, les auteurs ont inséré un gène rapporteur 2A-luciférase dans le locus endogène de KCC2 de cellules souches embryonnaires (ES) humaines. Cela leur a permis d'avoir une lecture pratique de l'expression du gène KCC2 dans ces cellules et d'effectuer un criblage à haut débit. Ils ont ainsi identifié, parmi environ 900 molécules, un certain nombre de composés potentialisant l'expression du gène KCC2. Dans le reste du texte, je vais appeler ces composés des potentialisateurs de l'expression de KCC2 (PEKs). Les PEKs identifiés ont ensuite été validés par des expériences de western blot et par réaction de polymérisation en chaîne par transcription inverse (RT-PCR).

Des expériences de pharmacologie et de biologie moléculaire ont révélé que ces PEKs ciblent différentes familles de protéines, agissant via diverses voies de signalisations (Figure 24).

Un certain nombre d'entre eux, tels que BIO, SB-41528, KW-2449 ou TWS-119 sont des inhibiteurs de la GSK3β, une protéine sérine/thréonine kinase (Figure 24). Le rôle de la GSK3β dans la régulation de l'expression de KCC2 a ensuite été confirmé dans plusieurs études. Il a ainsi été montré qu'un autre composé inhibant GSK3β, la kenpaullone, augmente l'expression et la fonction de KCC2 dans des cultures de neurones humains ou de rongeur (Yeo et al., 2021b). Dans le même sens, une étude effectuée sur des cellules PC-12 et des cultures primaires de neurones de rat suggère que l'oxytocine (OxT) augmente l'expression de KCC2 en inhibant une voie de signalisation impliquant la GSK3β (Tomita et al., 2022b) (Figure 25).

Il est intéressant de noter qu'une autre étude, s'intéressant au potentiel de l'OxT et de ses récepteurs dans la douleur neuropathique, a mis en évidence un effet potentialisateur de l'OxT sur l'expression de KCC2 (ARNm et protéine). Ce mécanisme implique la PKC, et seule l'injection continue d'OxT atténue les comportements douloureux (Ba et al., 2022b). Malgré le fait que les auteurs n'observent pas d'effet sur la fonction de KCC2 avec une courte injection d'OxT, les résultats précédents, obtenus par Leonzino et al., 2016, suggèrent que l'activation de la PKC, via les récepteurs de l'OxT, induirait une réponse en deux temps. La première serait rapide (10min) et impliquerait la PKC et la pS940, augmentant ainsi la stabilité membranaire et probablement la fonction de KCC2 (Leonzino et al., 2016).

La seconde impliquerait aussi la PKC, mais cette dernière moduleraitsur le long terme (jours) la transcription du gène Slc12a5 (Ba et al., 2022b). Ces résultats intéressants mettent en évidence le fait que l'OxT peut exercer son rôle de PEK via différents mécanismes (Figure 25).

De nombreux composés identifiés dans l'étude de Tang et al., 2019, sont des inhibiteurs de récepteurs tyrosine kinase (RTK) (Figure 24). Le dovitlinib ou le sunitinib, par exemple, inhibent les RTK de type fms 3 (FLT3), les récepteurs aux facteurs de croissance des fibroblastes (FGFR), ainsi que les récepteurs du facteur de croissance endothélial vasculaire. Étant donné le rôle de ces récepteurs dans la croissance tumorale, ces composés ont jusqu'à présent été utilisés principalement pour leur effet anticancéreux. L'identification de leur rôle modulateur de l'expression de KCC2 ouvre de nouvelles voies thérapeutiques possibles. Cependant, les voies de signalisation reliant ces récepteurs à la régulation de l'expression de KCC2 restent à identifier.

Le KW-2449 est, quant à lui, un inhibiteur multi-cible, inhibant aussi bien des RTKs, des récepteurs sérine/thréonine kinase, ainsi que des tyrosines kinase cytosoliques, comme ABL1 (Figure 24). Là encore les voies de signalisation impliquées ne sont pas connues. Il est intéressant de noter qu'ABL1 a été détecté dans l'interactome de KCC2 révélé par notre équipe (Al Awabdh et al., 2022), ce qui suggère que des partenaires de KCC2 sont aussi capables de réguler sa transcription.

D'autres PEKs, tels que le safinamide ou la méthysticine, sont des inhibiteurs de la monoamine oxydase (MO) (Figure 24), une enzyme qui empêche la dégradation des catécholamines du cerveau et du système sympathique. Ces composés peuvent être utilisés dans le traitement de la dépression. Ils peuvent aussi être utilisés en tant que traitement d'appoint pour la maladie de Parkinson lorsqu'ils ciblent spécifiquement MAO-B, comme le safinamide. Un inhibiteur de la MO, le resvératrol agit spécifiquement sur la sirtuine 1, une protéine enzymatique qui fonctionne comme un facteur de transcription dans de nombreux processus physiologiques (Yamamoto et al., 2007). La voie de signalisation reliant cette protéine à la machinerie de régulation de l'expression de KCC2 a été identifiée. Le resvératrol augmente ainsi l'expression de KCC2 via l'activation de Sirt1, qui à son tour active c-Jun, une protéine inhibant la transcription de REST. Cela conduit à une levée de l'inhibition de la transcription du gène Slc12a5 (Guida et al., 2015) (Figure 25).

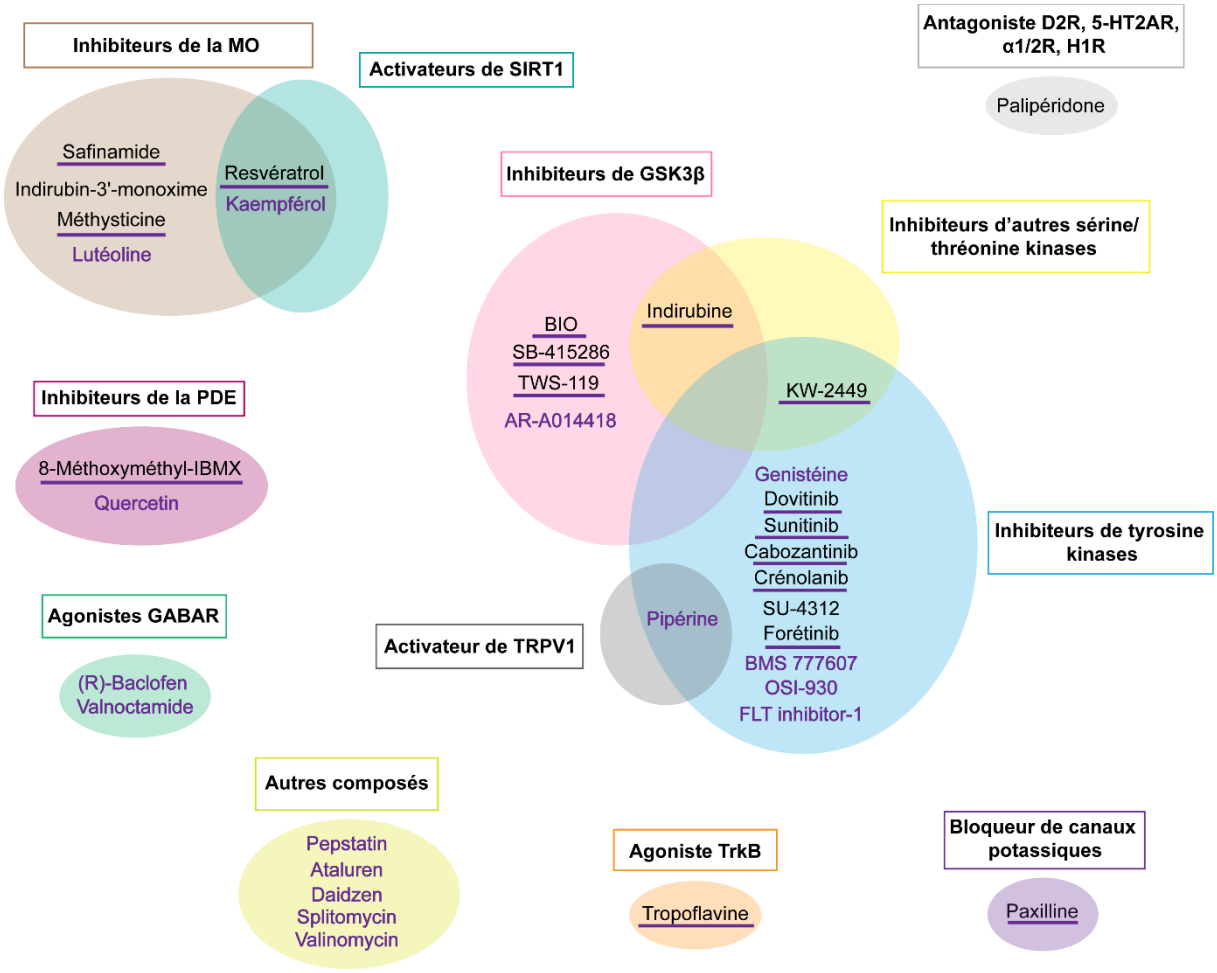


Figure 24. Grandes familles de potentialisateurs de l'expression de KCC2 (PEKs) identifiés (d'après Tang et al., 2019).

Les PEKs identifiés à partir du criblage sur neurones humains sauvages sont indiqués en noir. Ceux identifiés à partir du criblage sur neurones humains mutants RTT sont indiqués en violet. Ceux identifiés dans les deux cas sont en noir et soulignés en violet. La plupart des composés sont des inhibiteurs de tyrosine kinase (récepteurs tyrosine kinase ou tyrosines kinase cytosoliques), des inhibiteurs de GSK3 ou des inhibiteurs de la monoamine oxydase (MO). Certains composés appartiennent à plusieurs familles comme l'indirubine, le KW-2449, la pipérine, le resvératrol ou le kaempférol. Pour la clarté de la représentation, certains composés identifiés uniquement dans les neurones humains mutants RTT, et ayant différents mécanismes d'action, ont été placés dans «autres composés». Pour plus d'information sur les mécanismes d'action de ces derniers voir Tang et al 2019. GSK3 : glycogène synthase kinase 3; D2R : récepteurs à la dopamine D2; 5HT2AR : récepteurs 5HT2A; α1/2R : récepteurs alpha-adrénergiques 1 et 2; H1R : récepteurs histaminegrique de type 1; PDE: phosphodiestérase; TRPV1 : récepteurs ionotropiques activés par les vanilloïdes.

Toujours dans l'étude de Tang et al., 2019, d'autres composés avec des modes d'action très différents ont été identifiés. Le 8-Methoxymethyl-IBMX inhibe la phosphodiestérase, et la paxilline bloque les canaux potassiques. De manière surprenante, la tropoflavine, un agoniste des récepteurs TrkB, augmente l'expression de KCC2 (Tang et al., 2019), ce qui est contre-intuitif étant donné que, dans les neurones matures, la voie BNDF/TrkB diminue l'expression de KCC2 (Rivera et al., 2004c).

Le palipéridone, un antagoniste de différents récepteurs aux neurotransmetteurs, dont les 5HT-2AR, augmente également l'expression de KCC2 (Tang et al., 2019). L'effet du palipéridone passe probablement par son antagonisme d'autres récepteurs, puisqu'une augmentation de l'expression de KCC2 est observée suite à l'activation des 5HT-2AR avec du DOI (Yuan et al., 2022b).

A noter que, de la même manière que l'oxytocine avec les récepteurs OxTR, l'activation des 5HT-2AR a un effet à court terme en modulant la fonction du transporteur (Bos et al., 2013c), ainsi qu'un effet à plus long terme en augmentant l'expression de KCC2 (Yuan et al., 2022b). Des agonistes des 5HT-2AR constituent donc de bons candidats PEKs.

Hormis l'oxytocine et le DOI, qui augmentent l'expression de KCC2 dans la pathologie, les PEKs présentés ci-dessus ont été identifiés dans des études sur des neurones humains non pathologiques. Afin de tester si de nouveaux PEKs peuvent être identifiés dans la pathologie, Tang et al., 2019, ont effectué un criblage avec les mêmes bibliothèques de composés que précédemment, mais cette fois-ci sur des neurones n'exprimant plus Mecp2, et donc représentatifs du syndrome de Rett (RTT). Comme indiqué plus haut (voir II.1.2), ce dernier est associé à une diminution d'expression de KCC2 (Banerjee et al., 2016b; Duarte et al., 2013c; Tang et al., 2016b), et présente donc un intérêt pour tester l'effet des PEKs dans des conditions pathologiques.

Les auteurs observent ainsi que la plupart des PEKs identifiés précédemment augmentent aussi l'expression de KCC2 dans les neurones RTT (Figure 24). De plus, cette augmentation est plus élevée que dans les neurones contrôles, ce qui est cohérent avec une expression basale de KCC2 réduite dans les neurones RTT.

Des composés non identifiés précédemment dans l'étude de Tang et al., 2019, en conditions physiologiques, ont été identifiés spécifiquement dans ces neurones n'exprimant plus Mecp2 (Tang et al., 2019).

On peut par exemple citer le (R)-Baclofen et le valnoctamide, des agonistes $GABA_BR$ et $GABA_AR$ respectivement ; la pepstatin, une protéase aspartique ; ou encore le daidzen, un agoniste des récepteurs aux œstrogènes couplés aux protéines G (GPER). La piperine, un activateur des récepteurs ionotropiques activés par les vanilloïdes (TRPV1), augmente aussi l'expression de KCC2, tandis que cet effet est abolit par l'utilisation d'un antagoniste de TRPV1 (A784168) (Tang et al., 2019).

A nouveau, les voies de signalisations impliquées n'ont pas été identifiées. Cependant, le fait que ces PEKs augmentent l'expression de KCC2 dans la pathologie suggère qu'ils présentent un potentiel thérapeutique.

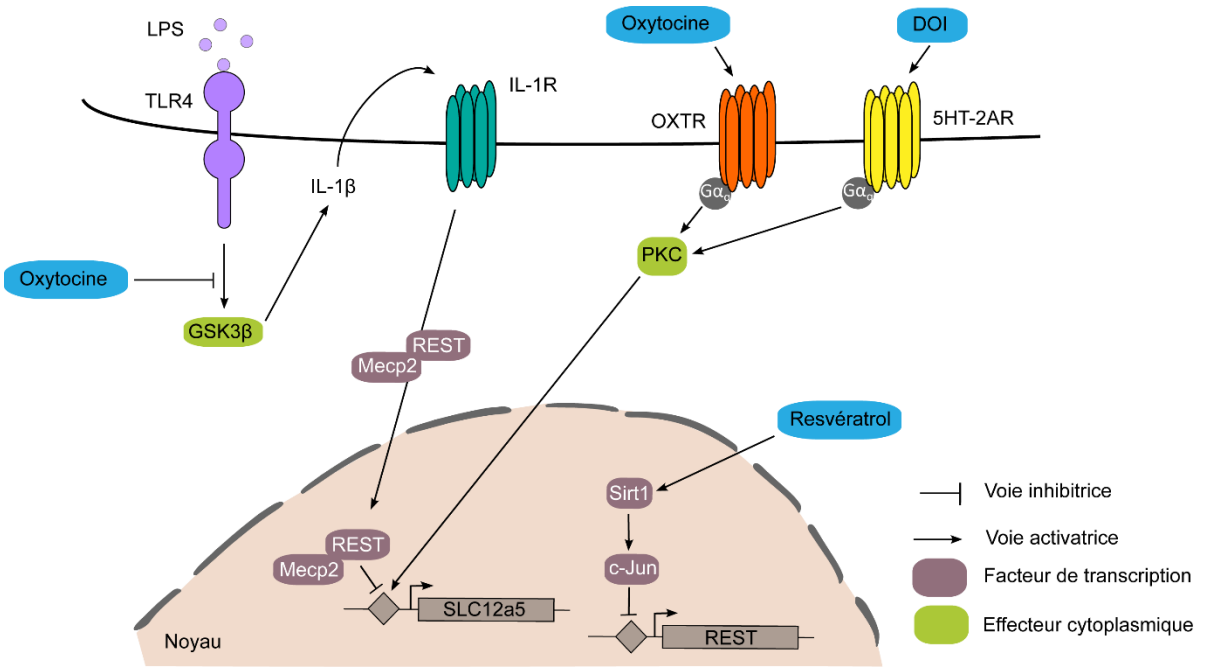


Figure 25. Exemples de voies de signalisation modulées par les PEKs.

Selon Tomita et al 2022, l'activation des récepteurs de type Toll 4 (TLR4) par les lipopolysaccharides (LPS) augmente l'expression de l'interleukin 1β (IL-1β) via la glycogène synthase kinase 3 β (GSK3β). IL-1β active ensuite les récepteurs IL-1R qui favorisent la translocation nucléaire des facteurs de transcription REST et Mecp2. Ces derniers inhibent la transcription du gène Slc12a5. L'oxytocine en inhibant l'activation de la GSK3β augmente donc l'expression de KCC2. Les PEKs inhibiteurs de la GSK3β ont peut-être le même mode d'action mais cela reste à démontrer. L'oxytocine est aussi connue pour augmenter l'expression de KCC2 via un mécanisme impliquant les récepteurs métabotropiques à l'oxyctocine (OxTR) et la PKC (Ba et al 2022). Le DOI, un agoniste des récepteurs métabotropiques à la sérotonine (5HT-2AR), augmente aussi l'expression de KCC2 en impliquant la PKC. Enfin, selon Guida et al 2015, le resvératrol augmente l'expression de KCC2 via l'activation de la sirtuin-1 (Sirt1) et de c-Jun, dont le rôle est d'inhiber la transcription de REST.

III.2.1.2- Potentiel des PEKs dans la pathologie

Ainsi, Tang et al., 2019, ont montré qu'un traitement avec les PEKs KW-2449 ou BIO restaure, dans les neurones RTT, à la fois E_{GABA} et la neurotransmission glutamatergique à des niveaux semblables à ceux enregistrés dans des neurones contrôles. De plus, ce traitement supprime les déficits morphologiques habituellement observés dans la pathologie, tels que l'augmentation de la taille du noyau ainsi que l'augmentation de la longueur et de la complexité d'organisation des neurites (Li et al., 2013; Marchetto et al., 2010; Nguyen et al., 2012).

Il est intéressant de noter que le traitement des neurones contrôles avec ces PEKs ne modifie pas leurs propriétés morphologiques et fonctionnelles, ce qui renforce l'idée que les changements observés dans les neurones RTT sont bien liés à la restauration d'expression de KCC2. Ces résultats sont très intéressants d'un point de vue thérapeutique. En effet, chez certaines patientes RTT mosaïques, la moitié des neurones est WT tandis que l'autre moitié exprime l'allèle mutant Mecp2 (Chahrour and Zoghbi, 2007). Il serait ainsi possible de traiter les neurones déficients sans pour autant altérer la physiologie des neurones ne présentant pas de mutation. En continuité avec les résultats sur neurones RTT, Tang et al., 2019, ont ensuite montré que le traitement avec les PEKs KW-2449 ou pipérine améliore les déficits comportementaux observés chez les souris mutantes Mecp2.

Le potentiel thérapeutique des PEKs a aussi été observé dans une étude plus récente explorant l'effet d'une administration intrapéritonéale de BIO pendant la période critique chez un modèle souris d'autisme (Verma et al., 2022). Ce composé restaure la balance excitation/inhibition, les déficits de plasticité synaptique, et les symptômes cognitifs, émotionnels et sociaux.

Certaines voies de signalisations ciblées par les PEKs sont connues pour être impliquées dans la pathologie. C'est le cas de la GSK3β par exemple, dont la suractivation a été rapportée dans plusieurs affections neurologiques (Arciniegas Ruiz and Eldar-Finkelman, 2021).

J'ai aussi mentionné la signalisation par la kinase FLT3, qui a été étudiée en tant que cible dans les thérapies cancéreuses (Fathi and Chen, 2017; Konig and Levis, 2015). Cependant, bien que cette kinase soit exprimée dans le cerveau (Brazel et al., 2001), les médicaments qui ciblent la voie FLT3 n'ont pas été étudiés de manière approfondie en tant que traitements potentiels des maladies neurologiques et psychiatriques.

En résumé, même si de nombreux PEKs identifiés ici sont d'ores et déjà utilisés dans différentes affections, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si l'effet thérapeutique est lié ou non à l'augmentation d'expression de KCC2.

III.2.2- Augmenter la fonction de KCC2 en stabilisant son expression membranaire

Comme on a pu le voir précédemment, l'expression membranaire de KCC2, et donc sa fonction, dépend d'un équilibre entre son adressage à la membrane, son agrégation, sa diffusion, son interaction avec différents partenaires moléculaires, son endocytose, et sa dégradation (voir I.3).

L'ensemble de ces mécanismes implique très souvent des modifications du niveau de phosphorylation du transporteur. Cibler les voies de signalisation modulant la phosphorylation de KCC2 peut donc permettre d'augmenter sa stabilité.

III.2.2.1- Composés ciblant la voie WNK/SPAK/OSR1

L'une des principales voies régulant la stabilité membranaire et la fonction de KCC2 est la voie impliquant les kinases WNK1, SPAK/OSR1, et la phosphorylation des résidus T906 et T1007 de KCC2 (Heubl et al., 2017) (voir I.3.2.5). Des composés ciblant cette voie de signalisation à différents niveaux représentent donc des candidats potentialisateurs de KCC2.

III.2.2.1.1- Inhibiteurs de WNK1

L'étude de Heubl et al., 2017, démontre qu'une manipulation de $[Cl^-]_i$, en modulant l'activité de la voie WNK-SPAK, représente un moyen très efficace de moduler l'expression membranaire et la fonction de KCC2. Dans ces conditions, agir directement sur cette voie présente un potentiel thérapeutique d'intérêt.

Un criblage à haut débit mené par Yamada et al., 2016, a conduit à l'identification de WNK463, un puissant inhibiteur des kinases WNK. Ce composé est un inhibiteur orthostérique qui tire parti d'une irrégularité structurelle unique présente dans le domaine kinase des kinases WNK. Celles-ci sont caractérisées par le placement anormal d'un résidu lysine catalytique (Lys233) au niveau du site de liaison de l'ATP (Min et al., 2004b). En se liant spécifiquement au niveau de ce résidu, WNK463 possède ainsi une excellente affinité pour les kinases WNK. WNK463 inhibe ainsi la phosphorylation par WNK de SPAK et OSR1 au niveau de leurs résidus activateurs (S373 et S325 respectivement, Yamada et al., 2016). Il présenterait donc un intérêt pour potentialiser indirectement la fonction de KCC2 (Figure 26).

Dans ce sens, une étude a testé les effets de WNK463 sur la fonction de KCC2 et a étudié le potentiel de ce composé dans la pathologie (K. L. Lee et al., 2022). Les auteurs mettent en évidence que WNK463 réduit bien la pT1007 de KCC2 *in vitro* et *in vivo*. Cet effet est associé à une augmentation de l'extrusion de Cl^- médiée par KCC2, et par conséquent, à une hyperpolarisation d'ECl^-. Ils démontrent également que WNK63 présente un intérêt dans l'épilepsie. En effet, l'administration de WNK463 dans un modèle d'épilepsie 4-aminopyridine (4-AP), réduit la fréquence et le nombre d'événements épileptiformes.

Dans le même sens, des souris recevant du WNK463 par voie intrahippocampique présentent un retard dans l'apparition de l'état épileptique induit par l'acide kaïnique, une réduction de l'activité épileptique sur l'EEG, et ne développent pas de pharmaco-résistance au diazépam.

WNK463 agit donc comme un potentialisateur de KCC2 et présente un intérêt thérapeutique dans l'épilepsie. Bien que ces résultats soient très intéressants, l'utilisation de WNK463 présente un inconvénient majeur qui est le manque de spécificité. En effet, comme indiqué précédemment, le site de liaison à l'ATP est hautement conservé parmi les kinases WNK (Berman et al., 2002), ce qui rend WNK463 peu spécifique pour l'une d'entre elles. Cela est problématique étant donné le rôle central des kinases de la famille WNK dans de nombreux processus physiologiques, et leur distribution d'expression dans l'organisme (Rodan and Jenny, 2017; Shekarabi et al., 2017). Des injections systémiques de WNK463 présenteraient donc un risque important d'effets secondaires. Le développement de WNK463 a ainsi été interrompu en raison de problèmes de sécurité préclinique, d'ataxie, et de difficultés respiratoires à des doses de 1 à 10 mg/kg (Yamada et al., 2016).

Pour ces raisons de non spécificité il peut être plus intéressant d'utiliser des molécules qui inhibent les WNK de manière allostérique. En effet, ces dernières peuvent cibler des régions moins conservées des kinases WNK, ce qui leur permet une plus grande sélectivité. Dans cette optique, un autre criblage à haut débit a été réalisé par Yamada et al., 2016. Ils ont ainsi identifié le composé 2, qui montre une sélectivité pour WNK1 à une concentration élevée (Yamada et al., 2016). Ce composé semble inhiber la fonction de NKCC1 mais son action sur KCC2 n'a pas été testée. Malgré les résultats positifs *in vitro* du composé 2, les études *in vivo* ne sont pas envisageables en raison de son profil pharmacocinétique inadéquat (Yamada et al., 2016).

Yamada et collaborateurs ont par la suite optimisé ces composés pour développer des molécules pouvant être testées *in vivo* (Yamada et al., 2017). Ils ont ainsi développé le composé 12 (Figure 26), qui a un profil pharmacocinétique amélioré, une clairance plus faible, et une meilleure biodisponibilité orale (Yamada et al., 2017).

Il est maintenant nécessaire de tester l'effet de ce composé sur KCC2 et d'identifier son potentiel dans la pathologie.

En parallèle, des criblages d'inhibiteurs de kinases par deux autres équipes ont permis d'identifier un autre inhibiteur des kinases WNK : PP121 (Apsel et al., 2008; Pinkas et al., 2017) (Figure 26). Cependant ce composé présente un niveau modéré de sélectivité, ce qui suggère que des modifications supplémentaires de PP121 sont nécessaires pour limiter les effets secondaires. Aux vues de l'ensemble de ces résultats, l'utilisation d'inhibiteurs de WNK1 pour potentialiser KCC2 n'est pas une solution envisageable. En effet, cibler WNK1 manque de spécificité et les composés eux-mêmes ne sont pas spécifiques de WNK1.

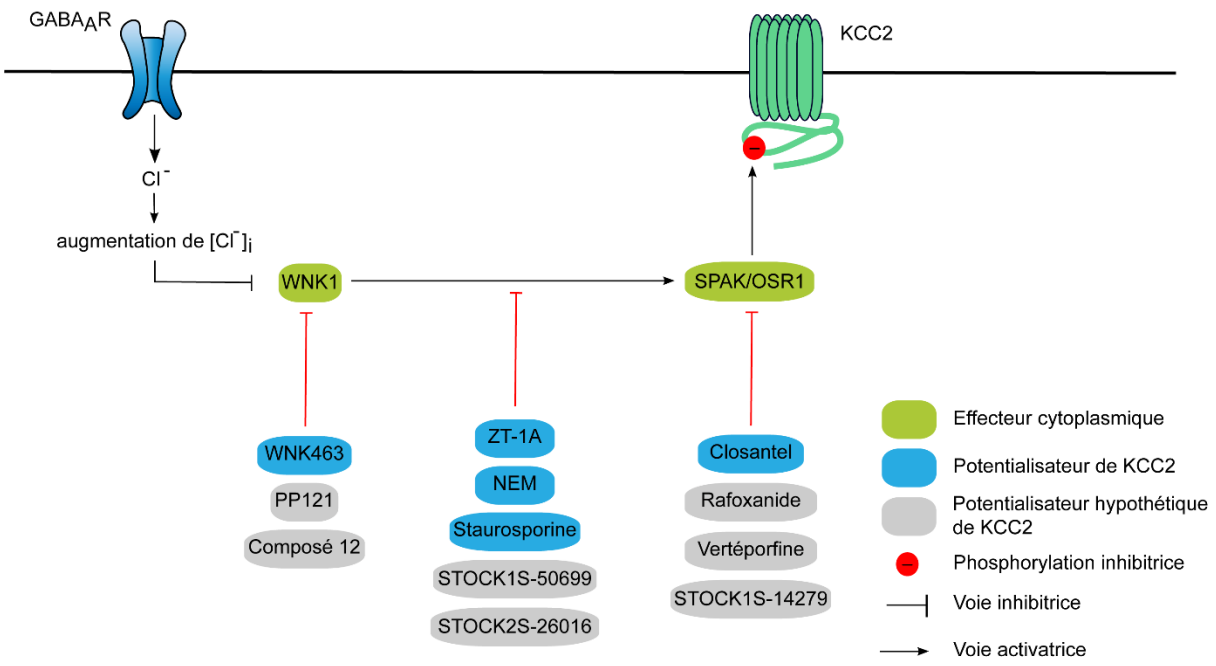


Figure 26. Potentialisateurs vérifiés et hypothétiques de KCC2 ciblant la voie WNK1/SPAK/OSR1.

La signalisation GABAergique, aussi bien phasique que tonique, influence en permanence le niveau de chlorure intracellulaire. Une élévation de ce niveau, en inhibant la voie WNK/SPAK/OSR1, conduit à une réduction de la phosphorylation des résidus thréonine 906 et 1007, favorisant ainsi l'agrégation et la fonction de KCC2 (Heubl et al., 2017). Des composés ciblant directement la voie WNK/SPAK/OSR1 représentent donc des potentialisateurs possibles de KCC2. C'est le cas du WNK463 qui inhibe directement WNK1; du ZT-1A, du NEM et de la staurosporine, qui empêchent l'interaction de WNK1 avec SPAK/OSR1; et du closantel qui inhibe directement SPAK/OSR1. D'autres potentialisateurs hypothétiques de KCC2 sont représentés. La plupart de ces composés sont connus pour inhiber cette voie mais leur effet sur KCC2 n'a pas encore été démontré.

III.2.2.1.2- Inhibiteurs de SPAK/OSR1

Il est également possible de cibler les kinases SPAK/OSR1 pour potentialiser KCC2.

Un criblage à haut débit et une stratégie de repositionnement de médicament a permis d'identifier deux inhibiteurs allostériques de SPAK : le STOCK1S-14279 et le closantel (Kikuchi et al., 2015). Le closantel est un salicylanilide halogéné doté d'une puissante activité antiparasitaire et couramment utilisé chez le bétail (Swan, 1999). Le STOCK1S, quant à lui, est une petite molécule issue d'une banque de composés (Kikuchi et al., 2015).

Un traitement avec ces composés *in vitro* sur des lignées cellulaires entraîne une diminution significative de la phosphorylation de NCC et NKCC1 après 30 minutes. Des injections i.p. de ces composés *in vivo* chez la souris montrent des effets similaires sur NCC et NKCC1 mais pas sur NKCC2, qui est principalement régulé par OSR1 (Lin et al., 2011). Cependant, les niveaux de phosphorylation reviennent à la normale après 120 minutes (Kikuchi et al., 2015).

L'administration chronique de ces composés a donc été testée. Des injections répétées de STOCK1S-14279 sont létales chez les souris, tandis qu'un traitement par voie orale avec du closantel a un effet limité *in vivo* et ne montre pas d'effets significatifs sur la pression sanguine ou les niveaux d'électrolytes dans l'urine (Kikuchi et al., 2015).

En parallèle de ces résultats, il a été montré sur des neurones hippocampiques en culture que les phosphorylations de KCC2, dépendantes de SPAK et OSR1, sont réduites par un traitement avec du closantel, ce qui favorise probablement l'agrégation du transporteur et sa fonction (Heubl et al., 2017) (Figure 26).

Il est intéressant de noter que les résultats *in vitro* de Heubl et al., 2017, remettent en question la spécificité du closantel vis-à-vis de SPAK, suggérée dans les études de Kikuchi et al., 2015, et Lin et al., 2011. Ce n'est que récemment qu'il a été confirmé que le STOCK1S-14279 et le closantel se lient au niveau d'une poche secondaire hautement conservée située sur le domaine C-terminal de SPAK et OSR1 (AlAmri et al., 2017a; Jonniya et al., 2021). Par conséquent, des tests supplémentaires ont été effectués *in silico* pour identifier d'autres molécules inhibitrices se liant à cette poche secondaire (AlAmri et al., 2017a).

Le criblage de 1200 composés a ainsi permis d'identifier le rafoxanide (Figure 26), une molécule structurellement similaire au closantel, qui est également utilisé en tant qu'antiparasitaire chez les bovins et les ovins (Ghoneim et al., 2006; Michiels et al., 1987).

In vitro, ce composé inhibe les formes constitutivement actives d'OSR1 (OSR1 T185E) et de SPAK (SPAK T233E), et est capable d'inhiber OSR1 même en présence de MO25, un activateur de SPAK/OSR1.

Le rafoxanide inhibe ainsi la phosphorylation de NKCC1 dans des cellules HEK293 (AlAmri et al., 2017a). Un autre inhibiteur d'OSR1 et de SPAK, la vertéporfine (Figure 26), a été identifié un an plus tard (AlAmri et al., 2018), mais ce composé manque de spécificité et inhibe huit autres kinases de manière importante. A noter que l'effet de ces composés sur le niveau de phosphorylation et la fonction de KCC2 n'a pas encore été testé.

Bien que ces composés présentent des résultats encourageants *in vitro*, l'absence d'effet du bumétanide obtenu *in vivo* dans l'étude de Kikuchi et al., 2015, suggère que des modifications pharmacologiques supplémentaires sont nécessaires avant de tester leur effet sur le niveau de phosphorylation et la fonction de KCC2 *in vivo*.

Il est en effet possible que ces composés passent difficilement la BHE, mais cela reste une hypothèse car les concentrations de bumétanide dans le cerveau n'ont jamais été mesurées. De plus, l'utilisation en clinique de ces composés n'est pas envisageable. En effet, comme on vient de le voir, un traitement chronique avec du STOCK1S-14279 est létal chez la souris (Kikuchi et al., 2015). Le closantel, quant à lui, est un antiparasitaire connu pour induire de nombreux effets secondaires chez l'homme, dont une déficience visuelle et une cécité (Asoklis et al., 2018; Essabar et al., 2014; Ghods et al., 2021; Tabatabaei et al., 2016). Le rafoxanide est également un antiparasitaire et a été très peu étudié chez l'homme. Seule une étude a testé son effet thérapeutique chez un enfant atteint de fasciolose (Yurdakök, 1985). Étant donné sa structure similaire au closantel, il est fort probable que ce composé ait également des effets néfastes *in vivo*.

A un autre niveau, des molécules empêchant l'interaction entre WNK et SPAK/OSR1 ont aussi été développées.

Un screening de composés a permis d'identifier le STOCK1S-50699 et STOCK2S-26016, deux composés qui, en se liant à SPAK, vont empêcher l'interaction de WNK (Mori et al., 2013) (Figure 26). Ces derniers ont un effet sur NKCC1 et NCC *in vitro* dans des cultures cellulaires mais n'ont pas été testés sur KCC2.

Une étude plus récente a découvert et caractérisé un inhibiteur puissant et sélectif de la kinase SPAK, le ZT-1a (J. Zhang et al., 2020) (Figure 26). Ce dernier inhibe la phosphorylation activatrice de SPAK, et réduit les phosphorylations activatrices de NKCC1 et inhibitrices de KCC2, inhibant et potentialisant respectivement les deux transporteurs. Ce composé présente aussi un potentiel dans la pathologie. En effet, l'administration intracérébroventriculaire de ZT-1a, dans un modèle d'hydrocéphalie post-hémorragique, réduit la phosphorylation de SPAK et des CCCs dans les plexus choroïdes, et neutralise l'hypersécrétion de LCR induite par l'inflammation. De plus, l'injection systémique de ZT-1a diminue la phosphorylation des CCCs neuronaux et gliaux, et réduit la taille de l'infarctus et de l'œdème cérébral dans un modèle d'accident vasculaire cérébral ischémique.

Ces résultats suggèrent que le ZT-1a est un modulateur efficace des CCCs et en particulier un potentialisateur de KCC2, qui présente un potentiel thérapeutique pour le traitement des troubles cérébraux associés à une altération de l'homéostasie du volume cellulaire (J. Zhang et al., 2020).

Il est cependant important de noter que le ZT-1a présente des résultats intéressants uniquement dans un modèle de lésions cérébrales post-ischémique, connues pour perturber les jonctions serrées de la BHE (Sandoval and Witt, 2008; Shi et al., 2016), et ainsi faciliter l'accès au cerveau de nombreux médicaments (Won et al., 2011). En revanche, la demi-vie plasmatique de ce composé n'est que de ~1,8 h chez la souris en condition physiologique, et la pénétration du ZT-1a à travers la BHE saine est minime (J. Zhang et al., 2020), questionnant la pertinence de l'utilisation de ce composé en clinique.

Enfin, deux composés présentés précédemment (voir I.3.2.5), la staurosporine et la NEM, semblent aussi avoir un effet sur SPAK et donc un potentiel pour augmenter la fonction de KCC2 (Figure 26). En effet, ces composés diminuent les phosphorylations activatrices (Thr233 et Ser373) de SPAK et la phosphorylation Thr1007 de KCC2 (Conway et al., 2017b; Khirug et al., 2005; J. Zhang et al., 2020). Il est intéressant de noter que ces composés réduisent aussi la phosphorylation de la T906 et de la S940, via des mécanismes indépendants. Bien que cette dernière module positivement la fonction de KCC2, cet effet demeure modeste de sorte que l'effet net reste une potentialisation du transporteur (Conway et al., 2017b; Cordshagen et al., 2018b). Cependant, comme discuté en I.3.2.5, ces composés ne sont pas du tout spécifiques de KCC2 et agissent sur de nombreuses cibles et mécanismes cellulaires (Block et al., 1988; Escobar-Ramirez et al., 2015; Gani and Engh, 2010).

Les composés ciblant la voie ubiquitaire WNK/SPAK présentent donc des résultats intéressants *in vitro* mais leur effet *in vivo* n'est pas clair et peut être associé à de graves effets secondaires. Leur utilisation en clinique n'est donc pour le moment pas envisageable.

III.2.2.2- Composés ciblant les récepteurs métabotropiques et la voie PKC/pS940

Une autre voie impliquée dans la régulation de la stabilité membranaire de KCC2 et de sa fonction met en jeu la phosphorylation de la S940 médiée par la PKC (voir I.3.2.5). Différents récepteurs modulent l'activité de la PKC, et donc la fonction de KCC2.

C'est le cas notamment des OxTR (Leonzino et al., 2016) qui, comme indiqué précédemment (voir III.2.1.1), modulent la fonction de KCC2 sur le court terme et son expression sur le long terme (Ba et al., 2022b). Activer ces récepteurs pharmacologiquement permettrait donc de potentialiser KCC2 (Figure 27).

L'OxT est connue pour moduler l'excitabilité neuronale (Lin and Hsu, 2018) et pour influencer la sensibilité aux crises (Erbas et al., 2013; Loyens et al., 2012; Sala et al., 2011), renforçant l'idée que l'injection d'OxT pourrait présenter un intérêt pour traiter l'épilepsie. Étant donné que l'OxT a une demi-vie courte et ne peut pas traverser facilement la BHE, une étude a utilisé de l'OxT encapsulée dans des nanoparticules. Les auteurs ont mis en évidence que l'OxT confère une protection robuste et durable contre les crises induites, et rétablit un comportement social normal dans un modèle murin d'épilepsie (modèle Scn1a) (Wong et al., 2021).

Bien que ces effets thérapeutiques de l'OxT dans des modèles d'épilepsie n'aient pas été directement associés à des changements de la fonction de KCC2, il est possible que ce soit le cas. L'OxT, en agissant à la fois sur l'expression et la fonction de KCC2, pourrait donc être un composé thérapeutique très intéressant pour essayer de traiter différents troubles neurologiques et psychiatriques.

Les récepteurs du kaïnate régulent également l'expression membranaire et la fonction de KCC2 via la même voie de signalisation (Garand et al., 2019; Gilad et al., 2015; Khirug et al., 2010), suggérant que l'application de kaïnate pourrait avoir un effet intéressant pour potentialiser KCC2. Cependant, l'injection de kaïnate *in vivo* est largement utilisée pour induire un *status epilepticus*, et par la suite, de l'épilepsie dans différents modèles (Ben-Ari, 2012).

Il semblerait donc que l'effet du kaïnate sur KCC2 ne soit pas suffisant pour contrebalancer son effet pro-convulsif, rendant ainsi inenvisageable son utilisation dans la pathologie. Dans le même sens, l'utilisation d'agonistes glutamatergiques pour cibler les mGluR1/5 n'est pas intéressante, malgré l'implication de ces derniers dans la régulation de l'expression et de la fonction de KCC2 (Banke and Gegelashvili, 2008b). En effet, ces agonistes vont induire une excitotoxicité qui va, au contraire, aggraver les troubles du SNC (Crupi et al., 2019).

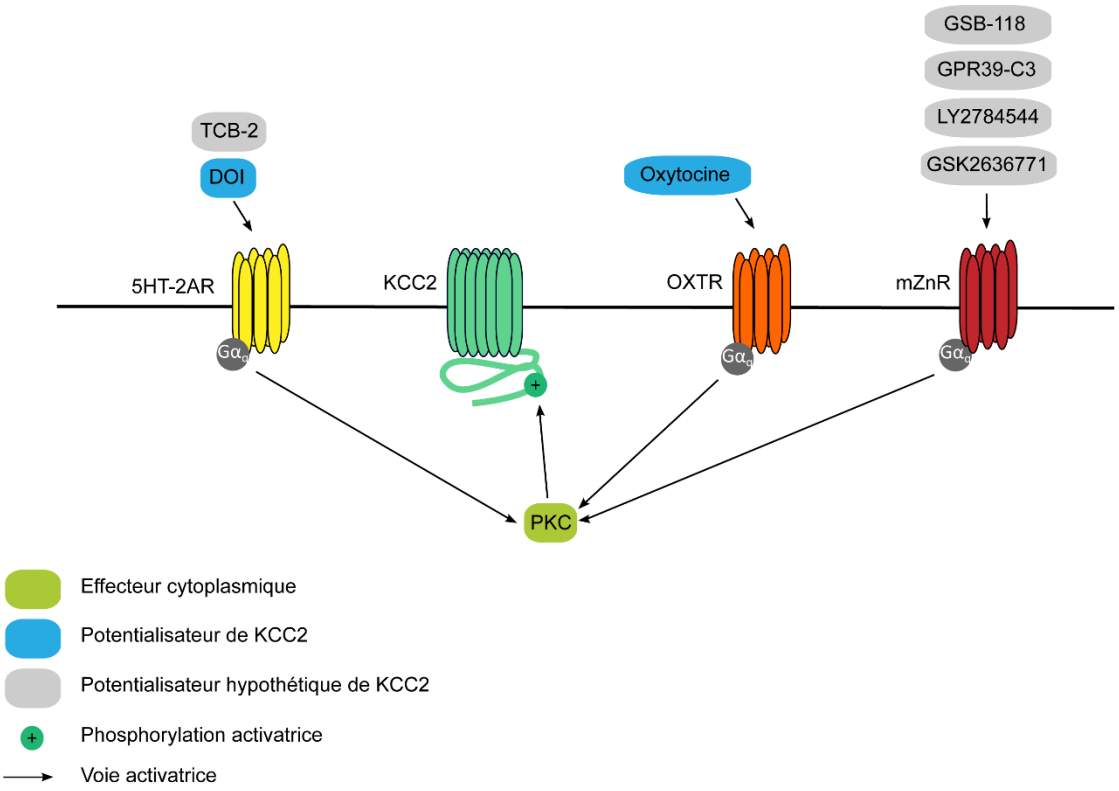


Figure 27. Potentialisateurs vérifiés et hypothétiques de KCC2 ciblant la voie PKC/pS940.

Différents récepteurs métabotropiques sont connus pour réguler la stabilité membranaire et la fonction de KCC2 via l'activation de la PKC et la phosphorylation de la S940. C'est le cas des récepteurs à la sérotonine 5HT-2AR, des récepteurs à l'ocytocine OxTR, et des récepteurs au zinc mZNR. Le DOI, un agoniste des 5HT-2AR, ou l'ocytocine, en agissant sur les OxTR, vont potentialiser la fonction de KCC2. D'autres potentialisateurs hypothétiques de KCC2 sont représentés, le TCB-2, un agoniste des 5HT-2AR, et divers composés identifiés comme agonistes spécifiques des mZnRs (Peukert et al., 2014; Sato et al., 2016; Shimizu et al., 2017).

L'activation des récepteurs métabotropiques au zinc (mZnR/GPR39) conduit elle aussi à une augmentation de la stabilité et de la fonction de KCC2 via deux mécanismes distincts : l'un impliquant la PKC et la pS940 (Chorin et al., 2011; Saadi et al., 2012), et l'autre impliquant les protéines SNAP23 et Syntaxine 1A (Asraf et al., 2022a). Cibler ces récepteurs représente donc un bon moyen de potentialiser le transporteur.

Un certain nombre de ligands synthétiques des mZnR/GPR39 ont émergé ces dernières années (Frimurer et al., 2017). Ces agonistes comprennent le TC-G 1008 (GPR39-C3 ou C3) (Peukert et al., 2014), le GSB-118 (Shimizu et al., 2017), ainsi que le LY2784544 et le GSK2636771 (Sato et al., 2016) (Figure 27). Le GPR39-C3 est biodisponible par voie orale et a été évalué comme traitement du diabète de type 2 grâce à sa capacité à augmenter le GLP-1 (glucagon-like peptide 1) (Peukert et al., 2014). Le LY2784544 et le GSK2636771 ont été évalués dans des modèles animaux, et des essais sont en cours chez l'homme dans des troubles myéloprolifératifs et des cancers (Frimurer et al., 2017; Laitakari et al., 2021). Bien que cela reste à démontrer, il est possible que ces composés soient des potentialisateurs de KCC2.

De plus, étant donné l'implication des mZnR/GPR39 dans diverses pathologies dont l'épilepsie, la douleur neuropathique, la maladie d'Alzheimer, et les troubles neuropsychiatriques (Xu et al., 2021), leur utilisation, couplée à leur effet potentiel sur KCC2, présente un intérêt thérapeutique tout particulier.

Enfin l'activation des récepteurs de la sérotonine de type 2A augmente rapidement la stabilité membranaire et la fonction de KCC2 (Bos et al., 2013a). Aussi, l'augmentation de la fonction du KCC2, en ciblant les récepteurs 5-HT2A, présente donc un potentiel thérapeutique dans le traitement des troubles neurologiques impliquant une altération de l'homéostasie des ions Cl^-.

Cependant, ces récepteurs ont été impliqués dans plusieurs troubles psychiatriques (González-Maeso and Sealfon, 2009), et leurs effets sur le traitement de la douleur est controversé (Millan, 2002). Cela souligne la nécessité d'étudier plus en détail les effets systémiques des agonistes spécifiques des 5-HT2AR, tels que le DOI ou le (4-bromo-3,6-diméthoxybenzocyclobuten-1-yl) méthylamine (TCB-2) (Figure 27).

III.2.2.3- Autres possibilités et limites

Étant donné l'ambiguïté existante sur l'effet de la phosphorylation des résidus tyrosines de KCC2 sur sa stabilité membranaire et sur sa fonction (voir I.3.2.5), une meilleure compréhension du rôle de ces résidus est nécessaire avant d'imaginer des potentialisateurs ciblant cette voie.

L'observation de Watanabe et al., 2009, selon laquelle les radeaux lipidiques augmentent l'agrégation et la fonction de KCC2, suggère que des modulateurs pharmacologiques de ces radeaux lipidiques pourraient constituer des potentialisateurs indirects de KCC2. Cependant, étant donné le lien entre l'accumulation des radeaux lipidiques et la pathologie (Sviridov et al., 2020), il ne semble pas raisonnable d'augmenter la formation des radeaux lipidiques sans complètement désorganiser la distribution du nombre de protéines membranaires.

On a vu en I.3.4 que les interactions de KCC2 avec de nombreux partenaires moléculaires régulent l'agrégation et la fonction de KCC2. Théoriquement, il serait donc également possible d'augmenter la fonction de KCC2 en modulant ces interactions. Toutefois, le manque de spécificité est là encore présent.

III.2.3- Identification de nouveaux composés augmentant la fonction de KCC2

Contrairement aux voies de signalisation ubiquitaires présentées ci-dessus, l'idéal serait de cibler directement KCC2 afin d'en restaurer l'expression ou la fonction dans la pathologie.

III.2.3.1- Le CLP257

III.2.3.1.1- Identification du CLP257

Dans le but d'identifier des composés potentialisateurs de KCC2, l'équipe d'Yves de Koninck a effectué un criblage à haut débit d'une bibliothèque de 92 500 composés (Gagnon et al., 2013b). Ce criblage a consisté à identifier, sur une lignée cellulaire exprimant KCC2 (NG-108) et transfectée avec le senseur de Cl^- Cloméléon, des composés capables de réduire $[Cl^-]_i$. Un total de 78 composés a ainsi été identifié.

Par la suite, une sélection supplémentaire a été effectuée sur des cellules HEK293, qui n'expriment pas KCC2 mais d'autres CCCs tels que NKCC1, KCC1, KCC3, et KCC4 (Hiki et al., 1999; Simard et al., 2007b). Les auteurs ont ainsi pu s'assurer que l'effet de ces composés était bien spécifique de KCC2.

Une sélection plus poussée, basée sur le manque d'effets cytotoxiques, la facilité de synthèse, et les propriétés médicamenteuses (Lipinski et al., 2001) a enfin été réalisée et a permis d'identifier le CL-058.

Plus de 300 analogues du CL-058 ont ensuite été synthétisés pour optimiser l'efficacité et les propriétés médicamenteuses (Figure 28A). Parmi eux, le CLP257 a montré une réduction de plus de 40% du $[Cl^-]_i$ (Figure 28B). Ce composé n'a aucun effet sur des cellules HEK293 et augmente l'activité de transport de KCC2 de 61% dans des ovocytes de xénope (Figure 28C). La spécificité du CLP257 a également été confirmée par l'ajout d'un antagoniste spécifique de KCC2, le VU0240551 (Delpire et al., 2009).

L'affinité du CLP257 pour d'autres cibles pharmacologiques a également été testée par des expériences de liaison par compétition de radioligands. Sur les 55 interactions testées aucune n'a été inhibée à plus de 30% par le CLP257 (10 µM), suggérant que ce composé est spécifique de KCC2. Cependant, il est important de noter que le CLP257, à une concentration plus élevée de 50 µM, a un effet agoniste très faible (< 0.2% en comparaison à l'effet de l'application de 5 µM de muscimol) mais non négligeable sur les $GABA_AR$ possédant les sous unités α1β2γ2 (Gagnon et al., 2013a).

Les auteurs ont ensuite testé le potentiel thérapeutique du CLP257 dans la douleur neuropathique, dans laquelle, comme on a pu le voir en II.1.1, une altération de l'expression de KCC2 et de l'homéostasie neuronale des ions Cl^- est observée.

Ils ont ainsi étudié l'effet du CLP257 sur le transport de Cl^- dans des tranches de moelle épinière issues d'un modèle rat de douleur neuropathique, ainsi que dans des tranches de cerveau de rat prétraitées avec du BDNF, qui présentent une expression de KCC2 réduite. En utilisant une sonde au Cl^- (MQAE), ils ont mis en évidence que le CLP257 augmente significativement le transport de KCC2 dans les deux modèles. Ils ont également confirmé ces résultats, via des expériences d'électrophysiologie, en montrant que le CLP257 rétablit une valeur plus hyperpolarisée d'E_{GABA} (Figure 28E). Il est intéressant de noter que les effets du CLP257 sur E_{GABA} semblent indépendants de changements de conductance des $GABA_AR$, étant donné que le CLP257 n'augmente pas l'amplitude des courants GABAergiques en présence de VU0240551.

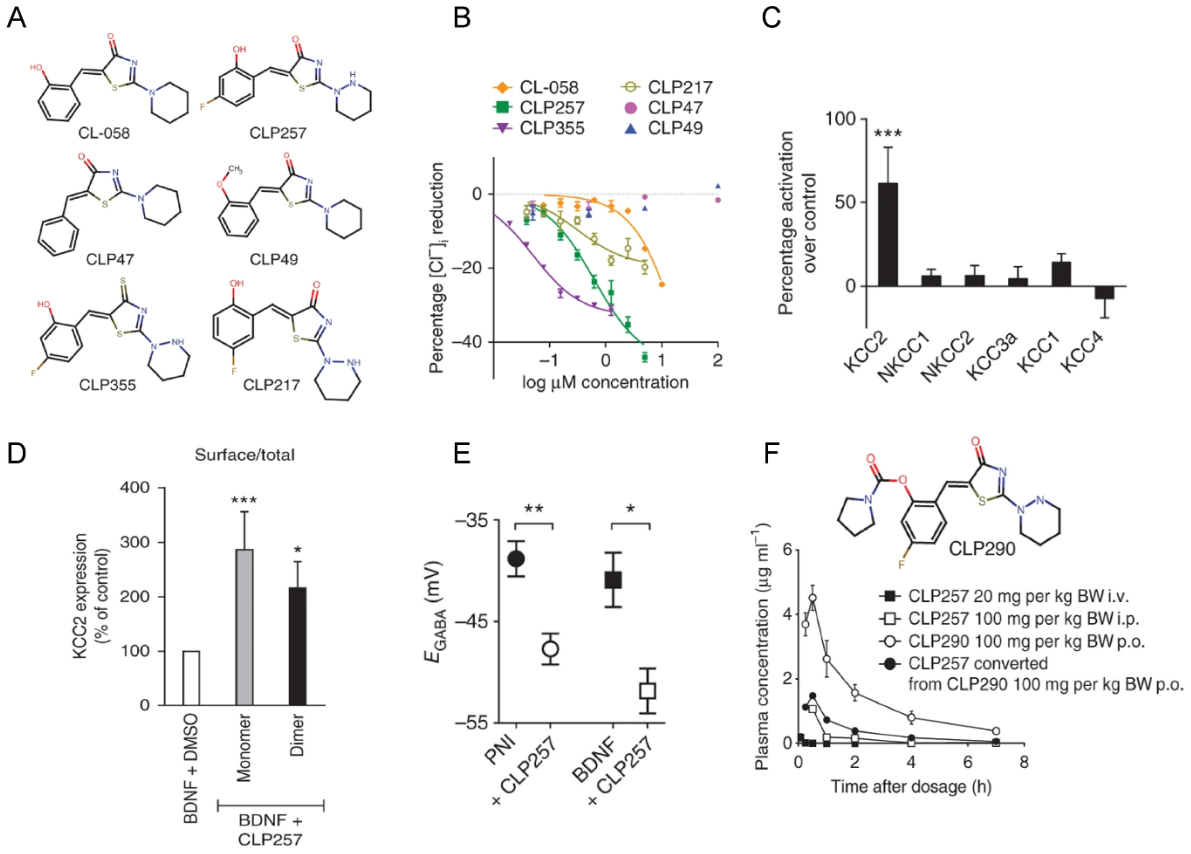


Figure 28. Effets du CLP257 sur $[Cl^-]_i$, KCC2 et E_{GABA} (Gagnon et al., 2013b).

A. Structure chimique des analogues du CL-058. **B.** Relations dose-réponse des différents analogues du CL-058 sur $[Cl^-]_i$. Le CLP257 permet la réduction la plus importante de $[Cl^-]_i$ dans des cellules HEK exprimant constitutivement KCC2.. **C.** Effet du CLP257 sur la fonction des CCCs dans des ovocytes de xénope. Le CLP257 augmente significativement la fonction de KCC2. **D.** Effet du CLP257 sur l'expression membranaire des monomères et dimères de KCC2, dans des tranches de moëlle épinière prétraitées avec du BDNF. Le CLP-257 augmente signifcativement la fraction de monomères et de dimères de KCC2 à la membrane. **E.** Effet du CLP257 sur l'E_{GABA} enregistré dans des neurones de la corne dorsale superficielle, à partir de tranches de moëlle épinière de rat, après lésion du nerf périphérique (PNI) ou de tranches prétraitées avec du BDNF. Le CLP257 hyperpolarise E_{GABA} dans les deux cas. **F.** Profil pharmacocinétique du CLP257 ou du CLP290 après injection i.v., i.p. ou administration orale (p.o.) chez des rats. L'administration orale de CLP290 permet d'atteindre une meilleure concentration plasmatique du composé.

Ils ont ensuite étudié les mécanismes par lesquels le CLP257 augmente l'activité de KCC2. Ils ont mis en évidence, via des expériences de biotinylation de surface sur des tranches de moelle épinière de rat prétraitées avec du BNDF, que le CL257 augmente l'expression membranaire des dimères et monomères du transporteur mais pas son expression totale (Figure 28D).

Les auteurs ont ensuite testé *in vivo* l'effet analgésique du CLP257. Ils observent un effet anti-nociceptif de ce dernier dans un modèle rat de lésion de la moelle épinière. Cependant, les effets analgésiques sont nettement moins importants que ceux de la gabapentine, ce qui suggère un mauvais profil pharmacocinétique.

En effet, la concentration plasmatique de CLP257 après injection intrapéritonéale diminue rapidement, le composé atteignant sa demi-vie en moins de 15 min. De plus, des analyses de métabolites ont révélé que le CLP257 subit une glucurono-conjugaison (ou ajout d'acide glucuronique) rapide qui produit un métabolite inactif.

Dans le but d'améliorer la pharmacocinétique du CLP257, les auteurs ont conçu une prodrogue, le CLP290. Cette dernière a une demi-vie de 5 heures, une meilleure concentration plasmatique maximale (Figure 28F), et permet d'augmenter l'effet analgésique. De plus, elle n'induit pas d'effet secondaire majeur.

III.2.3.1.2- Controverse sur le CLP257

Quelques années plus tard, un article de l'équipe de Stephen J Moss à Tufts University a suggéré que le CLP257 ne modifierait pas l'activité de KCC2, mais au contraire potentialiserait l'activité des $GABA_AR$ (Cardarelli et al., 2017). Une réponse du groupe d'Yves de Koninck à cet article a paru la même année (Gagnon et al., 2017).

Pour mieux comprendre cette controverse je vais mettre en parallèle les critiques de Cardarelli et al., 2017, avec les résultats obtenus dans l'article original de Gagnon et al., 2013a, et compléter avec des éléments de réponse de Gagnon et al., 2017.

1) Expression de KCC2 dans les cellules NG-108

Cardarelli et al questionnent l'utilisation des cellules NG-108 pour identifier des potentialisateurs de KCC2, puisqu'ils ne détectent pas KCC2 dans les cellules NG-108. Cette absence apparente de KCC2 dans les cellules NG-108 est biaisée par le fait que Cardarelli et al ont utilisé la même quantité de protéines totales (sans préciser laquelle) pour révéler l'expression du transporteur dans ces cellules et dans des neurones.

Cela n'est pas logique étant donné que la justification de l'utilisation des cellules NG-108 dans l'étude de Gagnon et al reposait sur le fait que ces cellules expriment des niveaux très faibles de KCC2, semblables à ceux détectés dans la douleur neuropathique. L'utilisation d'une quantité plus importante de protéine aurait peut-être permis à Cardarelli et al de détecter KCC2 dans les cellules NG-108.

2) Effet du CLP257 sur $[Cl^-]_i$

Cardarelli et al n'observent aucun changement des niveaux de $[Cl^-]_i$, en patch perforé à la gramicidine, après 5h d'exposition au CLP257. Ils montrent même, en utilisant la technique d'imagerie FRET du Cloméléon de l'article de Gagnon et al, qu'un traitement avec du CLP257 augmente $[Cl^-]_i$ au cours du temps, et que cet effet est potentialisé par l'application de VU0463271. Cela suggère que le CLP257 n'agirait pas sur KCC2 et augmenterait les niveaux de $[Cl^-]_i$.

Plusieurs remarques sont nécessaires ici. Tout d'abord, Cardarelli et al observent une augmentation de $[Cl^-]_i$ avec l'ajout de VU0463271, ce qui signifie que leurs cellules NG-108 expriment bien du KCC2 fonctionnel, contrairement à ce que suggère leur étude d'expression. Ensuite, ils rapportent une contamination par fluorescence du CLP257. Celle-ci s'explique probablement par la concentration de CLP257 utilisée dans leur étude (100 µM), en comparaison à celle utilisée par Gagnon et al (0.6 µM). Cette concentration élevée peut ainsi conduire à un mauvais ratio signal/bruit, être interprétée comme une augmentation de $[Cl^-]_i$, et masquer l'effet du CLP257.

3) Effet du CLP257 sur l'activité de KCC2

Cardarelli et al n'observent pas de potentialisation de KCC2 dans une expérience de dosage par fluorescence de l'influx de Tl^+ réalisée sur des cellules HEK293 surexprimant KCC2. En revanche, ils observent une potentialisation de KCC2 par le NEM ainsi qu'une réduction du transport par l'application de VU0463271.

De plus, ils n'observent pas non plus de potentialisation du transport de Cl^- après ajout de CLP257 dans des expériences de patch perforé.

Cardarelli et at ont surexprimé KCC2 dans les cellules HEK293, ce qui pose problème car, non seulement les niveaux de KCC2 ne sont pas physiologiques, mais en plus les cellules HEK293 expriment d'autres CCCs (NKCC1, KCC1, KCC3 et KCC4). Il faut ajouter à cela que le NEM, qui certes potentialise KCC2, agit également sur les autres CCCs, perturbant ainsi complétement l'homéostasie neuronale des ions Cl^- et la fonction de KCC2. Malgré cela, et de manière amusante, Gagnon et al., 2017, ont montré un effet significatif du CLP257 sur la fonction de KCC2 après extraction du graphe de l'article de Cardarelli et al., 2017, ce qui questionne les méthodes d'analyse utilisées.

L'utilisation de cellules HEK293 surexprimant KCC2 pose aussi problème pour les expériences d'électrophysiologie car, avec des niveaux élevés de KCC2, E_{anion} atteint un niveau de saturation qui peut masquer l'effet du CLP257.

4) Effet du CLP257 sur l'expression membranaire de KCC2

Cardarelli et al observent que de faibles concentrations de CLP257 (3-10 µM) ne modifient pas l'expression membranaire de KCC2, tandis qu'une concentration plus élevée (30 µM) la réduit. Le CLP257 n'augmenterait donc pas l'expression de KCC2. Dans cette expérience ils ont utilisé des cellules N2A, qui n'expriment pas KCC2, et ont testé l'effet du CLP257 dans des conditions de surexpression du transporteur.

5) Effet du CLP257 sur les récepteurs $GABA_A$

A l'aide d'enregistrements électrophysiologiques sur neurones hippocampiques de rat en culture, Cardarelli et al proposent que le CLP257 potentialise les $GABA_AR$. De plus, cette potentialisation est indépendante de l'activité de KCC2 étant donné que cette première n'est pas affectée par l'ajout de VU0463271 ou la suppression de de KCC2 par interférence ARN.

En revanche, Gagnon et al n'observent aucun effet du CLP257 sur l'amplitude des courants GABAergiques induits par le biais d'application focale de GABA, ni sur les mIPSCs.

Il est possible que l'effet du CLP257 reflète une action sur la cinétique des courants GABAergiques plus que sur leur amplitude. Cet effet n'a pas été étudié dans l'étude de Gagnon et al et est peut-être masqué par l'application de muscimol dans l'étude de Cardarelli et al.

6) Interaction CLP257-KCC2

En utilisant une technique d'interférométrie par rétrodiffusion, Cardarelli et al n'observent pas de liaison du CLP257 à KCC2. En revanche, ils observent une liaison du CLP257 à différents récepteurs ou protéines dont les $GABA_AR$, le 5HT1AR, la protéine translocatrice (TPSO), ou le transporteur de l'adénosine.

Malgré le fait que Gagnon et al observent un antagonisme dose-dépendant entre le CLP257 et le VU0240551, il est possible que celui-ci soit dû à une interaction entre les deux composés en solution plus qu'à une interaction direct du CLP257 sur KCC2. De plus, comme mentionné précédemment, Gagnon et al observent que le CLP257, à une concentration de 50 µM, a un effet agoniste très faible mais non négligeable sur les $GABA_AR$.

Cardarelli et al ayant utilisés des concentrations plus importantes de CLP257, il est possible que ce dernier se lie aux $GABA_AR$s et potentialise les réponses GABAergiques.

En prenant en compte l'ensemble de ces résultats, il apparait clairement que le rôle du CLP257 en tant que potentialisateur de KCC2 reste à confirmer et que les mécanismes impliqués restent à identifier. De plus, il est possible, comme le suggèrent Cardarelli et al, que le CLP257 ne soit pas spécifique de KCC2 mais qu'il agisse également sur d'autres récepteurs tels que les $GABA_AR$s.

III.2.3.1.3- Effet sur KCC2 et potentiel thérapeutique des CLP257 et CLP290

Malgré l'existence de cette controverse, il est apparu comme un consensus pour d'autres équipes, peut-être à tort, que le CLP257 et sa prodrogue le CLP290 sont des potentialisateurs de KCC2, et qu'ils présentent un intérêt dans la pathologie.

III.2.3.1.3.1- Effet du CLP257 et du CLP290 dans des modèles de douleur et de neuropathie

A la suite des travaux de Gagnon et al., 2013a, de nombreuses études se sont penchées sur le potentiel de ces deux composés dans différents modèles de douleur et de neuropathie.

Ferrini et al., 2017, se sont ainsi penchés sur l'impact du CLP257 et du CLP290 dans un modèle rat d'hyperalgésie induite par la morphine. Ils ont montré que le CLP257 permet de restaurer l'homéostasie neuronale des ions Cl^- dans des tranches de moelle épinière issues de ces rats.

De plus, un co-traitement avec de la morphine et du CLP290 (administré par voie orale) prévient la diminution d'expression membranaire de KCC2 dans les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière. Ce co-traitement avec du CLP290 permet d'atténuer significativement l'hyperalgésie induite par la morphine, et l'administration aigüe de CLP257 restaure le comportement nociceptif lorsque l'hyperalgésie est établie. Plus récemment, Gao et al., 2022, se sont intéressés à l'effet du CLP257 dans un autre modèle d'hyperalgésie, cette fois-ci induite par le rémifentanil, un agoniste sélectif des récepteurs morphiniques μ. Ce dernier induit une diminution de l'expression des $GABA_AR$ contenant la sous-unité α2, de KCC2, ainsi qu'une réduction de la libération de GABA, perturbant ainsi l'inhibition et favorisant l'hyperalgésie. Ils ont montré que le CLP257 ou le muscimol sont capables d'inhiber l'hypersensibilité mécanique induite par le rémifentanil.

De plus, la combinaison des deux renforce l'effet observé avec chaque composé seul, et cet effet combiné implique une augmentation de l'expression de KCC2 et des $GABA_AR$.

Bilchak et al., 2021, ont évalué l'effet du CLP257 dans un modèle rat de spasticité suite à une lésion de la moelle épinière (SCI). Le CLP257 restaure l'expression membranaire de KCC2 dans les motoneurones suite à la SCI et diminue les symptômes de spasticité chez ces animaux. Enfin, une autre étude a testé l'effet du CLP257 dans des modèles murins de douleur (Paige et al., 2022). Ils ont montré que le CLP257 supprime l'hypersensibilité mécanique induite par le peptide lié au gène calcitonine (CGRP) et inhibe le développement d'hyperalgésie, induite par une injection d'IL-6 ou de PGE_2.

III.2.3.1.3.2- Effet du CLP257 et du CLP290 dans des modèles d'épilepsie

Le CLP257 et sa prodrogue le CLP290 ont aussi été testées dans le contexte de l'épilepsie.

Hamidi and Avoli, 2015, ont montré que le CLP257 augmente la durée de l'activité épileptiforme de type « ictal », induite *in vitro* par la 4-AP sur des tranches de cortex piriforme et entorhinal. Le CLP257 réduit aussi la durée de l'activité épileptiforme de type « interictal » dans le cortex piriforme. Les auteurs suggèrent que cet effet pro-épileptogène du CLP257 serait lié à une augmentation de l'extrusion de K^+ via le transporteur potentialisé, et ainsi à l'augmentation de $[K^+]$ extracellulaire, entraînant une hyperexcitabilité neuronale.

L'effet restreint au cortex piriforme du CLP257 sur les activités épileptiformes de type « interictal » n'est en revanche pas discuté par les auteurs, mais suggère des mécanismes différents de genèse de ces activités entre les deux régions.

Contrairement à ces résultats, Dzhala and Staley, 2021, ont montré que le CLP257 (1-30 µM) restaure l'homéostasie neuronale des ions Cl^-, et réduit la durée et la fréquence des activités épileptiformes de type « ictal » enregistrées *in vitro* dans un modèle d'épileptogenèse post-traumatique (Dyhrfjeld-Johnsen et al., 2010; Dzhala et al., 2012; Dzhala and Staley, 2014). Les auteurs suggèrent que les différences observées avec l'étude de Hamidi and Avoli, 2015, s'expliquent par la concentration élevée (100 µM) de CLP257 utilisée dans cette dernière.

En parallèle de ces résultats intéressants *in vitro*, Sullivan et al., 2021, ont testé l'effet du CLP290 *in vivo* dans un modèle souris de crises néonatales. Les crises néonatales sont souvent résistantes au phénobarbital et les auteurs mettent en évidence que le CLP290 restaure l'expression totale de KCC2, le niveau de pS940, et l'effet du phénobarbital à P7.

Il est intéressant de noter que le CLP290 n'augmente pas l'efficacité du phénobarbital à P10, au moment où les crises sont de nouveau sensibles au phénobarbital. Cela suggère que le potentiel thérapeutique du CLP dépend du degré de perte de fonction de KCC2.

Les auteurs observent également que le CLP290 prévient le développement de l'épileptogenèse. Cependant, il est important de noter ici que l'effet du CLP290 sur l'épileptogenèse a été testé en étudiant la sensibilité des animaux à P12 à l'induction de crises induites par le PTZ. Il ne s'agit pas réellement d'étude de l'effet sur le développement de l'épileptogenèse. En effet, les auteurs auraient dû attendre l'occurrence de crises spontanées et récurrentes chez l'adulte plutôt que d'induire pharmacologiquement des crises avant même le début de la phase chronique.

Quoi qu'il en soit, ces effets sur « l'épileptogenèse » sont prévenus par l'expression de mutants non phosphorylables de KCC2 (S940A ou T906A/T1007A), suggérant que le niveau de phosphorylation de KCC2 régule la susceptibilité aux crises induites pendant la période néonatale, et que le CLP290 présente un intérêt thérapeutique dans l'épilepsie.

Pour finir, et dans le but d'étudier plus en détail les mécanismes impliqués dans l'effet du CLP290 et du CLP257, les auteurs ont testé l'effet des composés *in vitro* sur des tranches de cerveaux nouveaux nés à P7. Le CLP257 augmente l'expression membranaire mais pas totale de KCC2, et augmente la pS940. En revanche, il est intéressant de noter que seule la pS940 est augmentée avec le CLP290. De plus, seule la dose extrêmement élevée (500µM) - et peu comparable à celle utilisée dans les autres études - de CLP257 induit un effet sur KCC2 ou la pS940.

Les auteurs observent également que le CLP257 n'est pas capable d'augmenter l'expression membranaire de KCC2 lorsque le résidu S940 de celui-ci est muté en alanine et non phosphorylable. Néanmoins, il est possible que le CLP257 n'ait pas d'effet sur ce transporteur muté, indépendamment du fait qu'il agisse ou non sur ce résidu.

III.2.3.1.3.3- Effets du CLP257 et du CLP290 dans d'autres pathologies

Le CLP257 et sa prodrogue ont aussi été testés dans d'autres pathologies.

L'effet du CLP290 a ainsi été étudié chez des rats diabétiques (Kim et al., 2018). Le CLP257 restaure E_{GABA} dans des tranches de cerveau de rats diabétiques, et le CLP290 *in vivo* diminue les niveaux d'arginine-vasopressine (AVP) et de glucose chez ces animaux, alors qu'il n'augmente que le niveau d'AVP chez des animaux contrôles.

Le CLP290 montre également un effet bénéfique dans des modèles animaux de trauma crânien (Lizhnyak et al., 2019) dans lesquels il restaure l'expression totale de KCC2. Il est intéressant de noter que cette restauration est plus efficace lorsque le traitement est réalisé rapidement après le trauma. Cela suggère une fenêtre temporelle plus sensible à l'action des potentialisateurs de KCC2. Le CLP290 restaure les fonctions motrices, de la même manière, dans une certaine fenêtre de temps.

Une étude s'intéressant à l'effet de la nicotine sur la surconsommation de benzodiazépines chez les fumeurs a exploré l'impact d'une exposition chronique à la nicotine sur la transmission inhibitrice dans l'aire tegmentale ventrale (VTA) (Ostroumov et al., 2020). Ils ont montré que la nicotine perturbe l'inhibition, induite par le diazépam, des neurones GABAergiques de la VTA, et favorise la consommation de diazépam. Dans ce sens, un traitement avec du CLP290 permet de normaliser l'effet induit par le diazépam sur la transmission GABAergique, et de réduire la consommation de diazépam à la suite de l'administration de nicotine (Ostroumov et al., 2020).

Ce composé présente également des résultats intéressants dans une étude portant sur les altérations de la signalisation GABAergique sous-tendant la neuropathologie, induite par une infection au virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Barbour et al., 2020). Les auteurs mettent en évidence que l'incubation de neurones humains avec le surnageant de monocytes infectés avec le VIH ou avec la protéine du VIH Tat1-86 réduit l'expression totale de KCC2 ainsi que l'hyperpolarisation médiée par le GABA, et qu'un traitement avec du CLP257 permet de restaurer ces déficits (Barbour et al., 2020).

Un an plus tard, la même équipe démontre également que le CLP290 est capable de restaurer l'expression membranaire de KCC2 et les niveaux de phosphorylation de la S940 dans un modèle souris transgénique HIV-1 Tat (Barbour et al., 2021).

Enfin, le CLP290 restaure l'effet sédatif du midazolam chez des rats nouveaux nés sans changer l'expression totale ou membranaire de KCC2 (Doi et al., 2021), et permet de restaurer un E_{GABA} physiologique, de réduire la tension artérielle, ainsi que les niveaux d'arginine vasopressine dans un modèle rat d'hypertension (Jin et al., 2021).

Une synthèse de l'ensemble des résultats obtenus dans la littérature sur l'effet de ces composés est présentée dans le Tableau 2. Même si des effets bénéfiques du CLP257 ou du CLP290 dans la pathologie ont été rapportés, très peu d'études ont exploré les mécanismes impliqués, et vérifié que ces composés augmentent bel et bien la fonction de KCC2.

Seuls les travaux de Gagnon et al font état d'une potentialisation directe de la fonction de transport de KCC2. Dans d'autres articles, seules une diminution de $[Cl^-]_i$ ou une hyperpolarisation d'E_{GABA} sont rapportées, alors que ces valeurs peuvent être impactées par d'autres paramètres et qu'il existe des méthodes plus adaptées pour mesurer la fonction de KCC2 (voir MM.1).

Le mécanisme d'action de ces composés reste également très flou. La plupart des études montrent une restauration de l'expression de KCC2 dans la pathologie après application de CLP257 ou CLP290. Cependant, certaines d'entre elles observent uniquement une augmentation de l'expression membranaire (Barbour et al., 2021; Bilchak et al., 2021; Ferrini et al., 2017; Gagnon et al., 2013a), tandis que d'autres rapportent une augmentation de l'expression totale de la protéine (Barbour et al., 2020; Gao et al., 2022; Lizhnyak et al., 2019), voir des deux (Sullivan et al., 2021). Dans certains cas, la restauration de l'expression membranaire ou totale de KCC2 est associée à une restauration du niveau de phosphorylation de la S940 (Barbour et al., 2021; Gao et al., 2022; Sullivan et al., 2021). Une étude réalisée chez des rats nouveaux nés a également montré une absence d'effet de ces composés sur l'expression de la protéine (Doi et al., 2021).

Il est donc possible que l'effet du CLP257 et du CLP290 sur l'expression de KCC2 ne soit observé que dans des conditions pathologiques. Avant d'étudier l'effet de ces composés dans la pathologie, il est nécessaire de confirmer plusieurs choses. D'une part, il est important de s'assurer que ces composés potentialisent bien la fonction de KCC2 dans des neurones, et pas seulement dans des cellules hétérologues. D'autre part, il pourrait être intéressant de comparer les mécanismes impliqués dans l'effet de ces composés sur KCC2 dans des conditions non pathologiques et pathologiques.

Article	Molécule testée	Modèle/pathologie	Effet sur l'expression/les phosphorylations de KCC2	Effet sur $[Cl^-]i$	Effet sur la pathologie
Gagnon et al 2013	CLP257	Cellules NG-108	Pas testé	Diminution de $[Cl^-]i$	
		Ovocytes de xénope	Pas testé	Potentialisation de KCC2	
		Tranches de moëlle épinière de rat traitées au BDNF	Restauration de l'expression membranaire	Potentialisation de KCC2 et restauration d'un E_{GABA} normal	
	CLP257 CLP290	Modèle rat de douleur neuropathique	Pas testé		Effet analgésique
Cardarelli et al 2017	CLP257	Cellules NG-108	Pas testé	Pas d'effet sur [Cl-]i	
		Cellules HEK293 surexprimant KCC2	Pas testé	Pas de potentialisation de KCC2	
		Cellules N2A surexprimant KCC2	Pas d'effet ou réduction de l'expression membranaire	Pas testé	
Ferrini et al 2017	CLP257 CLP290	Modèle rat d'hyperalgésie induite par la morphine (HIM)	Restauration/augmentation de l'expression membranaire	Restauration d'un E_{GABA} normal	Prévention et suppression de la HIM
Gao et al 2022	CLP257	Modèle rat d'hyperalgésie induite par le rémifentanil (HIR)	Restauration de l'expression totale et du niveau de pS940	Pas testé	Suppression de la HIR
Paige et al 2022	CLP257	Modèles rongueurs d'hyperalgésie induite par le CGRP, l'IL-6 ou PGE_2	Pas testé	Pas testé	Prévention et suppression de l'hyperalgésie
Bilchak et al 2021	CLP257	Modèle rat de spasticité suite à une lésion de la moelle épinière	Restauration de l'expression membranaire	Pas testé	Réduction des symptômes de spasticité
Chen et al 2018	CLP290	Modèle souris de lésion de la moelle épinière	Pas testé	Pas testé	Restauration de la marche chez les souris paralysées
Hamidi et Avoli 2015	CLP257	Activités épileptiformes induites *in vitro* par la 4-AP (tranches de cortex piriforme et entorhinal)	Pas testé	Pas testé	Augmentation de la durée des AEs «ictale» et réduction de la durée des AEs «interictales»
Dzhala et Staley 2021	CLP257	Modèle *in vitro* d'épileptogenèse post-traumatique (tranches organotypique hippocampique)	Pas testé	Diminution de $[Cl^-]i$	Réduction de la durée et de la fréquence des activités épileptiformes
Sullivan et al 2021	CLP290	Modèle souris de crises néonatales	Restauration de l'expression totale et du niveau de pS940	Pas testé	Rétablissement de l'effet du phénobarbital à P7 et réduction de la sensibilité au PTZ à P12
	CLP257 CLP290	Tranches de cerveau de souris nouveaux-nées	Augmentation de l'expression membranaire et du niveau de pS940	Pas testé	
Kim et al 2018	CLP257 CLP290	Modèle rat de diabète	Pas testé	Restauration d'un E_{GABA} normal	Diminution des niveaux d'AVP et de glucose
Lizhnyak et al 2019	CLP290	Modèle rat de trauma crânien	Restauration de l'expression totale	Pas testé	Restauration des fonctions motrices
Ostroumov et al 2020	CLP290	Exposition de rats à la nicotine	Pas testé	Pas testé	Prévention de l'effet de la nicotine sur la transmission GABAergique et la consommation de diazépam
Barbour et al 2020	CLP257	Neurones humains incubés avec des protéines du HIV	Restauration de l'expression totale	Restauration de l'hyperpolarisation médiée par le GABA	Restauration d'une inhibition normale
Barbour et al 2021	CLP290	Modèle souris transgénique HIV-1 Tat	Restauration de l'expression membranaire et du niveau de pS940	Pas testé	Restauration d'une locomotion normale
Doi et al 2021	CLP290	Effet du midazolam chez des rats nouveaux-nés	Pas d'effet sur l'expression totale ou membranaire	Pas testé	Restauration l'effet sédatif du midazolam
Jin et al 2021	CLP290	Modèle rat d'hypertension	Pas testé	Restauration d'un E_{GABA} normal	Diminution de la pression artérielle et des niveaux d'AVP

Tableau 2. Résumé des données de la littérature concernant l'effet du CLP257 et du CLP290 sur KCC2 et la pathologie.

L'ensemble des articles dans lesquels le CLP257 ou le CLP290 ont été utilisés sont présentés ici. Le modèle utilisé est indiqué, ainsi que l'effet des composés sur l'expression de KCC2, $[Cl^-]_i$, et la pathologie. Les effets positifs sont indiqués en vert, l'absence d'effet en orange et les effets négatifs en rouge.

III.2.3.2- La prochlorpérazine (PCPZ)

III.2.3.2.1- Identification de la PCPZ comme potentialisateur de KCC2

Toujours dans l'idée d'identifier des composés potentialisateurs de KCC2, un autre criblage a été effectué par l'équipe de Laurent Vinay à Marseille (Liabeuf et al., 2017). Celui-ci a consisté à identifier dans des cellules HEK293 exprimant KCC2, via des expériences de flux de thallium, des composés augmentant l'activité de transport de KCC2. Cette technique consiste à substituer le Cl^- ou le K^+ par un isotope non radioactif, le thallium (Tl^+). Une sonde fluorescente sensible au Tl^+ est injectée dans les cellules, et le gradient de cet isotope est fixé de telle sorte à ce qu'il soit transporté vers l'intérieur de la cellule.

En présence de bumétanide et d'un inhibiteur de la Na^+/K^+ ATPase, le flux de Tl^+ est principalement médié par KCC2. Le niveau de fluorescence mesuré reflète par conséquent l'activité de transport de KCC2.

Les cellules ont été incubées 15 min avec les composés candidats, puis la mesure de fluorescence a été effectuée. Parmi 880 composés, 121 ont montré un effet potentialisateur de KCC2 (augmentation de plus de 20% de l'activité de transport). Les auteurs ont ensuite identifié, parmi ces candidats, 27 composés qui n'ont pas d'effet sur les cellules HEK293. Après des tests supplémentaires, 4 molécules d'intérêt sont apparues : la perphénazine, la prochlorperazine (Figure 29A), la trifluopérazine et la thiopropérazine. Toutes appartiennent aux dérivés antipsychotiques de la pipérazine et de la phénothiazine.

8 pipérazine phénothiazines commerciales ont ensuite été testées dans des analyses plus poussées d'efficacité et de cytotoxicité. Parmi ces composés, la PCPZ a montré la meilleure efficacité potentialisatrice de KCC2 à faible concentration (3 µM) (Figure 29B) et aucun effet cytotoxique en deçà d'une concentration de 200 µM.

Les auteurs ont ensuite étudié plus en détail l'effet de la PCPZ sur KCC2 et dans la pathologie.

A l'aide d'enregistrements électrophysiologiques sur des préparations de moelle épinière de rat nouveau-nés, les auteurs ont mesuré E_{IPSP} et le potentiel de membrane au repos (V_{rest}). Ils observent que la PCPZ augmente significativement la force électromotrice des courants inhibiteurs (E_{IPSP}-V_{rest}), démontrant que le composé renforce la transmission synaptique inhibitrice (Figure 29C). Ils montrent ensuite que la PCPZ est capable de rétablir l'inhibition et de diminuer la spasticité chez des rats après lésion de la moelle épinière.

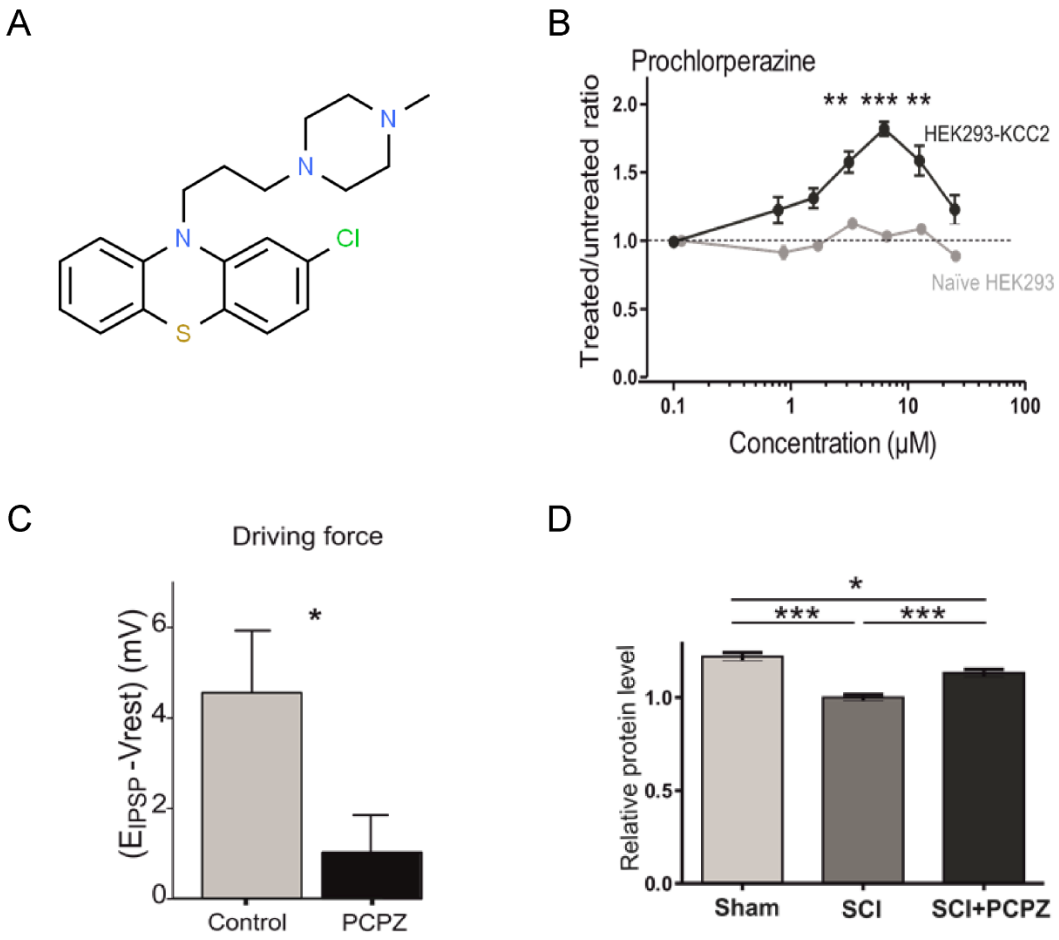


Figure 29. Effet de la prochlorperazine (PCPZ) sur la fonction et l'expression de KCC2 (Liabeuf et al., 2017).

A. Structure chimique de la PCPZ. (D'après ChemSpider) **B.** Relation dose-réponse de la PCPZ sur la fonction de KCC2 dans des cellules HEK293 surexprimant ou n'exprimant pas KCC2. La PCPZ augmente significativement la fonction du transporteur. **C**. Effet de la PCPZ sur la force électromotrice du Cl-. **D**. Effet de la PCPZ sur l'expression membranaire de KCC2, évaluée par immunofluorescence, dans des motoneurones de la corne ventrale de la moelle épinière de rats après lésion (SCI).

Cet effet passe probablement par la restauration partielle de l'expression membranaire de KCC2 dans les motoneurones (Figure 29D).

Ces résultats sont la première preuve que la PCPZ pourrait servir de potentialisateur de KCC2, suggérant son intérêt thérapeutique dans la pathologie. Cependant, de la même manière que pour le CLP257, les mécanismes par lesquels la PCPZ module la fonction de KCC2 dans les motoneurones n'ont pas été identifiés.

Plus récemment, une étude a exploré l'effet de la PCPZ sur l'activité électrique du muscle soleus chez le rat dans un contexte de suspension des membres postérieurs (Kalashnikov et al., 2021).

Ce contexte conduit à une augmentation de l'activité électromyographique (EMG), mais les mécanismes impliqués étaient inconnus. Les auteurs ont mis en évidence une diminution d'expression de KCC2 et du niveau de phosphorylation de la S940 dans les motoneurones de la moelle épinière. L'administration de PCPZ a permis de prévenir la diminution d'expression totale de KCC2, mais sans affecter significativement le niveau de pS940. Enfin, le traitement avec PCPZ a empêché l'augmentation d'activité EMG, renforçant l'idée que ce composé, via son action sur KCC2, peut être utilisé pour limiter l'hyperactivité neuronale.

Une autre étude relève, dans un modèle de lésion de la moelle épinière, un effet réducteur de la PCPZ sur l'excitabilité des motoneurones lombaires (Plantier et al., 2019). Cependant, l'effet sur KCC2 n'a pas été testé.

Ainsi, hormis les deux articles de Liabeuf et al., 2017, et de Kalashnikov et al., 2021, aucune autre étude n'a testé l'effet de la PCPZ sur KCC2, ni son potentiel dans la pathologie.

III.2.3.2.2- La PCPZ : utilisation en clinique

En dehors de son effet récemment décrit sur KCC2, la PCPZ est avant tout un antipsychotique de première génération approuvé par la FDA. Elle est ainsi utilisée dans le cadre de la schizophrénie, de troubles schizo-affectifs, et d'autres affections présentant des symptômes de psychose (Din and Preuss, 2022). La PCPZ peut être utilisée pour traiter à la fois les épisodes psychotiques aigus, et les maladies mentales chroniques. En tant qu'antipsychotique de première génération, le médicament est plus efficace pour traiter les symptômes positifs que négatifs, notamment les délires, les hallucinations, l'agitation, et la désorganisation du discours et du comportement (Chokhawala and Stevens, 2022).

Le composé est aussi largement utilisé pour traiter les nausées et les vomissements, que ce soit en post-chimiothérapie et post-radiothérapie, dans un contexte pré et postopératoire, ou dans d'autres situations (Furyk et al., 2015).

En dehors des indications de la FDA, ce médicament a aussi été recommandé par l'American Headache Society pour traiter les migraines (Orr et al., 2016). Pour les migraines pédiatriques, les médecins des services d'urgence prescrivent souvent une combinaison d'un anti-inflammatoire non stéroïdien et d'un antagoniste de la signalisation dopaminergique, tel que la PCPZ (Bachur et al., 2015). Cette dernière a été montrée comme étant la drogue la plus efficace en comparaison d'autres antagonistes dopaminergiques, permettant de réduire la douleur d'au moins 50% (Sheridan et al., 2018).

III.2.3.2.3- Cibles de la PCPZ

En tant qu'antipsychotique de première génération, la PCPZ bloque principalement les récepteurs D2 de la dopamine dans le cerveau. Cependant, elle peut également bloquer d'autres récepteurs dopaminergiques, des récepteurs histaminergiques, sérotoninergiques, cholinergiques, noradrénergiques, ainsi que les transporteurs à la dopamine (DAT) et à la norépinéphrine (NET) (Tableau 3).

Une étude a également montré que la PCPZ inhibe le récepteur P2X7 dans les macrophages humains mais pas dans les cellules de souris, empêchant ainsi un afflux d'ions calcium (Hempel et al., 2013).

Il est intéressant de noter que la PCPZ est aussi un inhibiteur de la dynamine (Daniel et al., 2015), réduisant ainsi l'endocytose de récepteurs comme les EGFR, et présentant par conséquent un potentiel anticancéreux (Chew et al., 2021).

Protéine	Ki (nM)	Organisme	Article
5-HT1A	5.888	humain	Silvestre et al 2005
5-HT2A	7.24	humain	Silvestre et al 2005
5-HT2C	123	humain	Silvestre et al 2005
5-HT3	1349	humain	Silvestre et al 2005
5-HT6	148	humain	Silvestre et al 2005
5-HT7	6.760	humain	Silvestre et al 2005
α1	24	humain	Richelson et Nelson 1984
α2	1700	humain	Richelson et Nelson 1984
M1	776	humain	Silvestre et al 2005
M2	1413	humain	Silvestre et al 2005
D1	251	humain	Silvestre et al 2005
D2	2.24	humain	Silvestre et al 2005
D3	1.82	humain	Silvestre et al 2005
D4	5.37	humain	Silvestre et al 2005
H1	6.03	humain	Appl et al 2012
H3	17.378	humain	Appl et al 2012
H4	17783	humain	Appl et al 2012
DAT	589	humain	Silvestre et al 2005
NET	600	rat	Richelson et Pfenning 1984
P2X7	?	humain	Hempel et al 2013
Dynamine	?	cellules d'insectes	Daniel et al 2015

Tableau 3. Cibles protéiques de la PCPZ.

Les récepteurs, transporteurs et protéines ciblées par la PCPZ sont résumées ici. La constante d'inhibition (Ki) est indiquée lorsque celle-ci a été calculée.

III.2.3.2.4- Effets secondaires

Etant donné son action sur différents récepteurs, et notamment son rôle antipsychotique, la PCPZ peut provoquer divers effets indésirables (Chokhawala and Stevens, 2022). Il peut s'agir de symptômes extrapyramidaux importants, notamment de dystonie aigüe ou tardive, de parkinsonisme et d'akathisie (Caughey et al., 2010; Kelley and Tepper, 2012), de désordres oculaires (cataracte, pigmentation lenticulaire), et de troubles cutanés (prurit, urticaire, dermatite exfoliative, photosensibilité cutanée et pigmentation anormale de la peau) (Caughey et al., 2010; Lal et al., 1993; Lamer et al., n.d.; Ruigómez et al., 2000; Tashiro et al., 2012).

A noter que la pigmentation anormale de la peau est liée à un effet de la PCPZ sur les mélanocytes. En effet, il a été montré *in vitro,* que la PCPZ induit une diminution de la viabilité cellulaire ainsi qu'une réduction de la teneur en mélanine et de l'activité de la tyrosinase (Otręba et al., 2019). Cette perte de viabilité cellulaire est probablement liée au fait que les phénothiazines peuvent former des radicaux libres et induire une cytotoxicité sous l'action de peroxydases (Eghbal et al., 2004; Gutiérrez-Correa et al., 2003; MacAllister et al., 2013).

Les effets secondaires peuvent aussi être anti-cholinergiques (anorexie, vision trouble, constipation, sécheresse des muqueuses et rétention urinaire), anti-histaminiques (sédation) ou anti-adrénergiques (hypotension orthostatique). La PCPZ peut également avoir un effet pro-épileptique (Bloechliger et al., 2015; Lapierre et al., 1969; Shaw et al., 1959), mais celui est débattu (St Laurent et al., 1962).

La PCPZ peut enfin avoir des effets indésirables importants chez les enfants (Manteuffel, 2009). Parmi les effets secondaires les plus fréquents on trouve la sédation et les symptômes extrapyramidaux, et de façon plus rare des convulsions, une dyskinésie tardive, un syndrome malin des neuroleptiques et une défaillance autonome (Lau Moon Lin et al., 2016). D'autres effets secondaires sont possibles mais beaucoup moins fréquents et sont résumés dans (Chokhawala and Stevens, 2022).

IV- Rationnel et objectifs du projet

Dans les neurones, les CCCs KCC2 et NKCC1 contrôlent l'homéostasie neuronale des ions Cl^-, et par conséquent l'efficacité et la polarité de la signalisation GABAergique. Dans de nombreux troubles neurologiques, y compris l'épilepsie, une réduction de l'expression de KCC2 et/ou une élévation de l'expression du transporteur NKCC1 augmentent $[Cl^-]_i$. Il en résulterait une signalisation GABAergique paradoxalement excitatrice, qui contribuerait à l'émergence d'activités pathologiques. Compenser la dérégulation des CCCs dans la pathologie, et par conséquent l'homéostasie neuronale des ions Cl^-, apparaît donc comme une stratégie thérapeutique prometteuse. L'utilisation d'antagonistes de NKCC1 présente plusieurs limites *in vivo,* et les résultats d'études cliniques mettent en évidence de nombreux effets secondaires. En revanche, cibler KCC2, dont l'expression est presque exclusivement restreinte au cerveau, présente un fort potentiel thérapeutique. Les potentialisateurs actuels de KCC2 (WNK463, ZT-1A, NEM, staurosporine, closantel, oxytocine, DOI) manquent de spécificité. Mais récemment, le criblage de banques de composés a mis en évidence l'effet potentialisateur de deux substances : le CLP257 et la PCPZ. Ces composés ont été étudiés dans différents modèles cellulaires et animaux de pathologie associés à une diminution d'expression de KCC2. Cependant, leur mode d'action dans les neurones et leur effet dans l'épilepsie demeurent peu documentés voir débattus.

Au cours de ma thèse, j'ai tout d'abord étudié l'effet de ces composés sur KCC2 et leur mode d'action dans des neurones hippocampiques *in vitro,* en combinant diverses approches cellulaires, biochimiques, électrophysiologiques et d'imagerie. Dans un second temps, j'ai testé l'effet de ces composés sur l'émergence d'activités épileptiformes, à la fois *in vitro* sur du tissu humain réséqué de patients atteints d'ELT, et *in vivo* dans un modèle murin d'ELT. En parallèle de ce travail principal, j'ai exploré l'impact fonctionnel de l'interaction de KCC2 avec de nouveaux partenaires, tels que les canaux potassiques de fuite Task-3 (Goutierre et al., 2019a) et la géphyrine - une molécule d'ancrage des $GABA_AR$ – dont j'ai démontré le rôle dans la fonction du transporteur (Al Awabdh et al., 2022). Je me suis également intéressé au rôle de KCC2 dans la régulation de l'homéostasie des ions Cl^-, au sein des interneurones à parvalbumine de l'hippocampe (Otsu et al., 2020). Enfin, la mise en place des enregistrements *in vitro* de tissus humains post-opératoires dans le cadre de ce projet, m'a amené à contribuer à deux études visant à explorer les déterminants cellulaires des réseaux épileptiques (Frazzini et al., 2022) (Ribierre et al, *en révision*).

Matériel et Méthodes

La plupart des méthodes mises en œuvre au cours de ma thèse sont décrites en détail dans la partie « Résultats » du manuscrit. Dans cette section, j'ai donc choisi de discuter certaines alternatives existantes aux techniques utilisées au cours de ma thèse, de justifier le choix de la technique sélectionnée, et de présenter certains aspects de l'utilisation du tissu humain postopératoire ou des modèles animaux d'ELT.

MM.1- Méthodes pour mesurer la fonction de KCC2

Étant donné que KCC2 est un transporteur électroneutre, il est impossible de mesurer son activité par les méthodes électrophysiologiques classiques. Une stratégie consiste donc à substituer le Cl^- ou le K^+ par des isotopes radioactifs ($^{36}Cl^-$ ou $^{86}Rb^+$ (Bartschat and Blaustein, 1985)) ou non radioactifs (Rb^+ (Scott and Krot, 2003; Tang et al., 2001), Tl^+ (Carmosino et al., 2013; Weaver et al., 2004; Zhang et al., 2010), et NH_4^+). Il est ainsi possible, après avoir fixé des gradients de ces isotopes, de suivre les dynamiques de concentrations de part et d'autre de la membrane, et d'obtenir ainsi une estimation de l'activité de transport de KCC2. Malheureusement, l'utilisation d'isotopes radioactifs présente de nombreux désavantages, dont un coût élevé et un risque important lié à leur manipulation (Yu et al., 2016). Le test d'efflux de Rb^+ non radioactif, qui utilise une détection par spectroscopie d'absorption (Terstappen, 1999), reste donc la méthode la plus utilisée. Cette technique est notamment fréquemment utilisée pour le criblage à haute densité de nouveaux composés pharmacologiques, car elle permet une bonne estimation de l'activité des transporteurs (Chaudhary et al., 2006; Liu et al., 2010; Scott and Krot, 2003). Cependant, cette approche présente une faible résolution temporelle (typiquement de quelques secondes à quelques minutes) (Yu et al., 2016), et offre seulement la possibilité d'avoir une estimation de la fonction moyenne de KCC2 dans un ensemble de cellules, sans permettre de tester les cellules individuelles ou des compartiments subcellulaires (axones, dendrites et épines dendritiques). Enfin, dans le cas de l'utilisation de substituts au K^+, l'expression neuronale de nombreux canaux et transporteurs au K^+ empêche une évaluation précise du flux de ces ions, attribué spécifiquement à KCC2.

Contrairement à ces techniques, plusieurs approches électrophysiologiques permettent d'estimer de façon indirecte l'activité de transport de KCC2 au niveau de cellules individuelles, en exploitant le fait que les récepteurs $GABA_A$ et glycinergiques sont principalement perméables aux ions Cl^- (80%, contre environ 20% pour les ions HCO_3^- ; (Kaila and Voipio, 1987). Il est ainsi possible de mesurer le potentiel d'inversion des courants GABAergiques (E_{GABA}) via une méthode de patch perforé à la gramicidine.

La gramicidine est un antibiotique qui va former des pores dans les membranes lipidiques, les rendant exclusivement perméables aux cations monovalents et aux petites molécules (Kyrozis and Reichling, 1995). Cette technique permet donc d'estimer les niveaux de Cl^- intracellulaires, sans les perturber (Akerman and Cline, 2006; Woodin et al., 2003). Cependant, cette approche ne reflète pas nécessairement une activité d'extrusion réelle de KCC2, car dans des conditions de faible conductance membranaire au Cl^- (c'est-à-dire lorsque les entrées GABAergiques, notamment, sont peu nombreuses ou actives), une activité même relativement faible de KCC2 peut influencer de manière significative $[Cl^-]_i$. Une alternative consiste donc à mesurer le gradient somatodendritique d'E_{GABA}, dans des conditions où $[Cl^-]_i$ est fixée au niveau somatique par une pipette de patch (Gauvain et al., 2011; Khirug et al., 2008; Otsu et al., 2020). Nous avons montré, ainsi que d'autres, que la mesure de ce gradient fournit une estimation fiable de la fonction de KCC2. En effet, ce gradient est presque aboli par un antagoniste spécifique de KCC2 (Gauvain et al., 2011; Otsu et al., 2020) et n'est pas affecté par le bumétanide qui, comme on l'a vu plus haut, bloque spécifiquement le transporteur NKCC1 (Khirug et al., 2008). Cette technique permet donc de prendre en compte l'activité de KCC2 le long de l'axe somatodendritique. Cependant, il est important de noter que la concentration intracellulaire élevée de Cl^- va avoir tendance à surestimer le rapport de fonction KCC2/NKCC1 à l'état d'équilibre. Cette forte concentration peut également inhiber les kinases WNK sensibles au Cl^-, et donc la voie sous-jacente des kinases SPAK/OSR1 fortement impliquées dans la régulation des CCCs (voir I.2.3).

Une façon d'éviter ce problème consiste à évaluer la capacité d'extrusion de KCC2 en mesurant le taux de récupération (τ) des changements du potentiel postsynaptique inhibiteur (IPSP), médié par les $GABA_AR$, après une brève injection de courants Cl^- par iontophorèse (Deisz et al., 2014, 2011; Lal et al., 1993). Cette injection de Cl^- sur un temps court est intéressante puisqu'elle permet de minimiser l'impact sur la cascade de signalisation SPAK/OSR1, permettant ainsi de mesurer une véritable activité d'extrusion de KCC2.

Cependant, dans ces conditions, le taux d'extrusion du Cl^- ($1/\tau$) via KCC2 correspond seulement à 45.3% du taux d'extrusion total (Deisz et al., 2011). L'extrusion restante est en effet médiée par ClC2 (23.1%), NKCC1 (18.1%), et les échangeurs d'anions (13.6%) (Deisz et al., 2011). Il est donc nécessaire de bloquer pharmacologiquement chaque composante de l'extrusion de Cl^- afin d'isoler l'information sur la fonction de KCC2. Les concentrations intracellulaires de Cl^- et l'activité de KCC2 ne sont donc pas représentatives d'un système avec l'ensemble des transporteurs au Cl^-, tel qu'observé lors de l'analyse du gradient somato/dendritique d'E_{GABA}.

Les méthodes électrophysiologiques décrites ci-dessus, en plus de ne fournir que des corrélats indirects de l'activité de transport de KCC2, peuvent être fastidieuses, empêchant ainsi l'analyse de larges populations cellulaires. Pour surmonter ce problème, de nombreux indicateurs fluorescents ont été développés dans le but d'estimer directement la concentration en Cl^-. Parmi eux, le colorant organique au Cl^- MQAE (Doyon et al., 2011b; Galeffi et al., 2004), a été largement utilisé pour sa capacité à franchir la membrane plasmique. Cependant, le signal MQAE s'atténue fortement au cours du temps et ne permet donc qu'une acquisition à basse fréquence (Inglefield and Schwartz-Bloom, 1997). L'utilisation de microscopie en temps de vie de fluorescence, ou FLIM, peut permettre de s'affranchir de ce problème puisqu'on ne regarde que la demi-vie du signal fluorescent, et non son amplitude (Weilinger et al., 2020). Les senseurs de Cl^- génétiquement codés (GECS), tels que H148Q, Clomeleon, SuperClomeleon, ClopHensor et Cl-sensor permettent également de s'affranchir de ces limites (Arosio and Ratto, 2014). En effet, la plupart de ces senseurs sont des protéines de fusion comprenant un fluorophore sensible à l'halogénure (YFP, E2GFP) et un autre qui y est insensible (CFP, DsRed, tdTomato), les deux étant reliés par une courte liaison peptidique (Arosio and Ratto, 2014). Ces sondes permettent donc d'effectuer des mesures ratiométriques en mode FRET ou non-FRET avec tous les avantages qui y sont liés (Arosio and Ratto, 2014). De plus, ces mesures sont non invasives et peuvent être effectuées au niveau du soma ainsi qu'au niveau des différents compartiments neuronaux (axones, épines et prolongements dendritiques).

Cependant, un inconvénient majeur de ces senseurs au Cl^- réside dans le fait qu'ils sont, pour la plupart, très peu résolutifs dans la gamme physiologique de $[Cl^-]_i$. La K_{app} (ou concentration de Cl^- provoquant un changement de 50% du rapport de fluorescence) du Clomeleon est par exemple supérieure à 160mM (Kuner and Augustine, 2000), alors que la gamme physiologique de $[Cl^-]_i$ est comprise entre 5 et 30 mM (Krapf et al., 1988; Rohrbough and Spitzer, 1996; Tyzio et al., 2006).

De plus, ces senseurs présentent une forte sensibilité au pH (Arosio and Ratto, 2014; Markova et al., 2008), un paramètre qui peut être affecté par la fonction de KCC2, ce qui soulève des questions quant à leur utilisation pour mesurer l'activité du transporteur.

A noter aussi qu'il existe d'autres moyens de mesurer $[Cl^-]_i$, tel que l'utilisation de microélectrodes sensibles au Cl^-, la gravimétrie, ou encore la spectroscopie d'absorption. Cependant, ces microélectrodes sont difficiles à construire, et les deux techniques suivantes, bien que toujours utilisées (Qi et al., 2014), sont fastidieuses puisqu'elles nécessitent de multiples étapes de lavage, ainsi que la séparation des solutions cellulaires et extracellulaires (Ludwig et al., 2017).

En conclusion, plusieurs techniques existent pour estimer l'activité de KCC2. Chacune d'entre elles présente des avantages et des inconvénients, et le choix de la technique doit être adapté à la question posée. Ainsi, l'utilisation des sondes ratiométriques au Cl^- permet, par exemple, d'étudier des variations de $[Cl^-]$ à large échelle, ce qui est particulièrement intéressant dans le cas de criblage à haute densité de nouveaux composés pharmacologiques. L'approche électrophysiologique de mesure du gradient somatodendritique d'E_{GABA}, utilisée au cours de ma thèse, permet quant à elle d'estimer assez facilement et très spécifiquement l'activité de KCC2 au niveau de neurones individuels (voir Article : Methods).

MM.2- Problématiques liées au marquage et à la quantification de l'expression de KCC2

La difficulté pour étudier la localisation ou l'expression de KCC2 à la membrane réside dans le fait qu'il n'existe pas d'anticorps, utilisable en immunocytochimie, qui soit dirigé contre un domaine extracellulaire de KCC2.

Deux possibilités sont donc envisageables pour étudier l'expression membranaire de KCC2. La première consiste à surexprimer, dans des neurones ou lignées cellulaires, une construction KCC2 avec une étiquette classique, telle que FLAG ou HA (Chamma et al., 2013), ou fluorescente telle que la pHluorin (Kahle et al., 2014), insérée dans une boucle extracellulaire. L'utilisation d'un anticorps anti-FLAG ou anti-HA permet ensuite de marquer, sur des neurones vivants, KCC2 à la membrane (Al Awabdh et al., 2022).

Il est possible d'inclure ce marquage dans un protocole en plusieurs étapes si l'on souhaite comparer les niveaux d'expression membranaire du transporteur entre différentes conditions expérimentales, tout en s'affranchissant de la variabilité intercellulaire du niveau d'expression totale de KCC2.

Ce dernier est tout d'abord marqué à la membrane avec un anticorps primaire anti-FLAG ou anti-HA, et un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome d'une certaine couleur. La membrane est ensuite perméabilisée, et le pool total de KCC2 est marqué avec un anticorps ciblant le domaine intracellulaire de KCC2, ainsi qu'un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome d'une autre couleur (Al Awabdh et al., 2022). Cette approche permet ainsi d'obtenir un ratio d'expression de KCC2 surface/total, qui permet une bonne estimation du niveau d'expression du transporteur à la membrane. Cette approche est intéressante mais soulève un problème majeur qui est que la surexpression de KCC2 ne permet pas d'évaluer des niveaux d'expression physiologiques de KCC2 dans les cellules ou neurones. La surexpression peut ainsi masquer l'effet d'une condition ou au contraire l'amplifier, posant problème quant à l'interprétation des résultats.

Malgré cette problématique, la surexpression reste obligatoire pour certaines techniques. C'est le cas de la méthode de suivi de particule unique (SPT), utilisée au cours de ma thèse, qui permet d'étudier la diffusion membranaire de KCC2 sur des neurones vivants (Chamma et al., 2013; Heubl et al., 2017).

En revanche, dans certains cas, il peut être intéressant de marquer la protéine endogène. J'ai ainsi utilisé cette approche pour étudier l'agrégation de KCC2. Cela permet de s'affranchir des problèmes de surexpression, mais ne permet pas de savoir si les agrégats de KCC2 détectés sont membranaires ou intracellulaires. Cependant, le fait que KCC2 forme des agrégats exclusivement à la membrane plasmique (Barthó et al., 2004; Chamma et al., 2013, 2012; Gulyás et al., 2001; Heubl et al., 2017; Hübner et al., 2001a; Watanabe et al., 2009) suggère que les agrégats de KCC2 détectés avec un marquage de la protéine endogène sont principalement membranaires.

L'approche par immunofluorescence est pratique, et permet de détecter et de localiser une protéine d'intérêt. En revanche, elle ne permet pas d'avoir une idée précise de la quantité de protéine à la membrane. En effet, la qualité du marquage dépend du niveau d'expression de la protéine, de l'anticorps utilisé et du ratio signal/bruit, associé aux seuils de détection fixés par l'utilisateur (Murphy and Lamb, 2013).

En comparaison, l'étude des niveaux d'expression d'une protéine à la membrane est plus précise et semi-quantitative, voir quantitative, avec une approche biochimique (Frankenberg et al., 2014; Mollica et al., 2009; Murphy et al., 2011, 2009; Murphy and Lamb, 2013). La biotinylation de surface, par exemple, est une méthode idéale que j'ai utilisée au cours de ma thèse. Le principe consiste à lier de manière covalente un groupement biotine aux protéines membranaires, d'isoler uniquement la fraction membranaire par immunoprécipitation avec des billes de streptavidine, puis de révéler la protéine d'intérêt par western blot. Cette technique permet ainsi d'obtenir une information précise et quantitative sur le niveau d'expression de KCC2 à la membrane. De plus, dans le cas d'une protéine faiblement exprimée, l'immunoprécipitation peut faciliter la détection en enrichissant la fraction protéique avec la protéine d'intérêt. Cela est beaucoup plus compliqué avec des approches basées sur un marquage immunofluorescent ou immunoenzymatique.

L'immunoprécipitation est par exemple essentielle pour détecter différentes formes phosphorylées de KCC2. En effet, le niveau de phosphorylation basal de KCC2 n'est pas suffisamment élevé pour détecter ces protéines simplement par western blot. Au cours de ma thèse, et après m'être formé auprès de Jinwei Zhang à l'université d'Exeter, j'ai mis en place un protocole au laboratoire afin d'immunoprécipiter différentes formes phosphorylées de KCC2. J'ai optimisé certains aspects du protocole afin de permettre, par exemple, une meilleure détection des protéines phosphorylées.

J'ai également adapté ce protocole à des échantillons protéiques issus de tranches d'hippocampes de cerveaux de rat (voir Article : Methods). Ce matériel biologique permet d'avoir une plus grande quantité de protéines que celle pouvant être obtenue sur des cultures cellulaires.

MM.3- Le tissu humain épileptique réséqué : une opportunité unique pour la recherche

MM.3.1- Récupération du tissu et conservation

Suite à une résection chirurgicale du foyer épileptique, et avec le consentement du patient, une partie du tissu prélevé peut être utilisée pour la recherche. Au cours de ma thèse, et par le biais de collaborations avec des neurochirurgiens de l'hôpital Sainte Anne et de la Pitié Salpêtrière, j'ai mis en place une routine au laboratoire afin de récupérer le tissu de patients atteints d'ELT.

Trois paramètres sont essentiels pour permettre une bonne survie neuronale dans le tissu humain : le temps de transport, la solution utilisée et les conditions de conservation.

Le temps nécessaire pour transporter le tissu du bloc chirurgical au laboratoire peut impacter drastiquement la survie neuronale. Le problème pouvant être le manque d'oxygénation du tissu. Pour surmonter ce problème, un apport continu d'O_2 à la solution de transport peut être envisagé (Ting et al., 2018). Cette approche est idéale mais ne semble pas obligatoire lorsque le temps de transport est compris entre 15 min et 1h (Andersson et al., 2016; Kraus et al., 2020; Wickham et al., 2018).

En accord avec ces observations, je transportais au cours de ma thèse le tissu en 15-30 min, sans application continue d'O_2, ce qui permettait une bonne survie du tissu.

La préparation rigoureuse d'une solution de transport adaptée est essentielle. Celle-ci doit être une solution dans laquelle le NaCl a été substitué par une autre espèce ionique. Cela permet de bloquer l'excitabilité neuronale liée notamment aux canaux sodiques. Dans ce sens, différentes solutions sont fréquemment utilisées pour conserver le tissu. Il peut s'agir d'une solution riche en N-Méthyl-D-Glucamine (NMDG) (voir Article : Methods), en sucrose (Huberfeld et al., 2011, 2007b; Le Duigou et al., 2018), ou en choline (Kraus et al., 2020; Silva et al., 2010).

Ces solutions sont refroidies et oxygénées au préalable, et permettent une bonne préservation du tissu. Cependant, des effets subtils sur les neurones peuvent être observés en fonction des solutions utilisées.

Une solution riche en NMDG est, par exemple, plus adaptée qu'une solution riche en sucrose à la préservation structurale et fonctionnelle des interneurones GABAergiques (Pan et al., 2015).

En revanche, les neurones présentent une plus grande résistance membranaire lorsqu'ils sont maintenus dans une solution riche en NMDG (Ting et al., 2014). Cela peut donc affecter l'approche par patch clamp en cellule entière. En comparaison, une solution riche en choline peut permettre de bons enregistrements à la fois en patch-clamp et en enregistrements extracellulaire (Kraus et al., 2020). Cependant, des travaux non publiés au laboratoire ont mis en évidence que la choline affecte considérablement la plasticité synaptique à long terme, possiblement du fait que la choline, à de fortes concentrations (140mM), est un agoniste de certains récepteurs muscariniques à l'acétylcholine (Costa and Murphy, 1984). Au cours de ma thèse j'ai donc choisi d'utiliser une solution riche en NMDG.

Concernant le maintien des tranches, les systèmes à interface sont les plus intéressants. Dans ces systèmes, les tranches sont maintenues à 37°C sur une membrane de nylon à l'interface entre le liquide cérébrospinal artificiel (aCSF) et une atmosphère saturée en humidité et en carbogène (5 % CO_2 dans 95 % O_2).

Ces conditions sont essentielles pour le maintien de cellules vivantes fonctionnelles et pour préserver l'activité des microcircuits pendant plusieurs heures. Plusieurs groupes ont ainsi clairement démontré les avantages d'un système de stockage à interface par rapport au stockage standard en bécher, et l'importance de la température et de l'oxygénation pour la préservation de l'activité du réseau (Hájos et al., 2009; Maier et al., 2009). Au laboratoire, j'ai utilisé des chambres à interface classique (voir Article : Methods), mais il est également possible d'utiliser des chambres à double flux qui permettent une meilleure conservation sur le long terme (jusqu'à 48h) (Hájos et al., 2009; Wickham et al., 2018).

Il est possible de réaliser des cultures organotypiques pour conserver le tissu des jours, voire des semaines, après la chirurgie (Eugène et al., 2014; Jones et al., 2016). Des tranches de tissu sont ainsi placées sur des membranes semi-poreuses ou inserts, à l'interface entre un milieu de culture défini et une atmosphère à 5% de CO_2.

Cette mise en culture permet une bonne conservation du tissu ainsi que la possibilité d'induire des activités de type interictal et de moduler leur occurrence pharmacologiquement jusqu'à 4 semaines après la chirurgie (Eugène et al., 2014).

L'utilisation d'un milieu défini nécessite cependant un temps important de préparation et représente un certain coût. Dans le but de trouver une alternative, j'ai cherché, au cours de ma thèse, à conserver ce tissu dans un milieu physiologique idéal, le liquide cérébrospinal humain (LCS). Ce LCS est régulièrement récupéré lors de ponctions lombaires chez des patients atteints d'hydrocéphalie à pression normale, et est rarement conservé. Par le biais d'une collaboration avec Stéphane Goutagny, neurochirurgien à l'hôpital Beaujon, à Clichy, j'ai récupéré du LCS humain et testé son potentiel pour conserver les tranches organotypiques de tissu humain épileptique. J'ai observé que les tranches incubées en présence de LCS présentent des activités interictales spontanées 14 jours après mise en culture, ce qui n'est pas le cas avec des tranches maintenues dans du milieu défini. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Schwarz et al., 2017, et suggèrent que le LCS humain serait idéal pour conserver le tissu sur le long terme.

Récemment, de nouvelles techniques de conservation ont vu le jour, telles que la culture de tranches flottantes, qui est une méthode plus simple, moins coûteuse que le protocole classique utilisant des inserts, et qui plus adaptée pour une conservation à court terme de tranches de tissu humain (Fernandes et al., 2019).

MM.3.2- Enregistrement du tissu humain épileptique à l'aide de matrices multi-électrodes (MEA)

Les activités épileptiformes présentées en introduction (voir II.2.4) sont des activités extracellulaires qui peuvent être enregistrées à l'aide de MEA. Les MEA sont des dispositifs constitués de dizaines, voire de milliers, de microélectrodes, généralement composées d'oxyde d'indium-étain ou de titane, et qui ont un diamètre compris entre 10 et 30 µm. Un cylindre central permet d'enregistrer la tranche de tissu tout en la maintenant vivante par perfusion d'une solution d'aCSF oxygénée. Les MEA présentent une excellente résolution spatiale, ce qui permet de détecter les IILDs et HFOs qui, comme indiqué précédemment, sont souvent restreintes à une région du tissu. Les MEA représentent aussi une technique de choix pour étudier la propagation des activités épileptiformes dans le tissu. Par le biais de graphes temps-fréquence, il est ainsi possible de suivre la propagation des IILDs et des HFOs.

En plus d'enregistrer les potentiels de champ, les MEA permettent d'enregistrer l'activité multi-unitaire (MUA) qui représente la décharge de potentiels d'action par l'ensemble des neurones situés à proximité de l'électrode.

Bien que des microélectrodes plus récentes puissent enregistrer *in vivo* de la MUA, elles sont néanmoins invasives, limitant ainsi leur utilisation à des fins de recherche lors d'enregistrements intracrâniens.

Bien que les MEA donnent accès à l'activité extracellulaire et multi-unitaire, elles ne fournissent pas d'informations sur les propriétés synaptiques et biophysiques. D'autres techniques peuvent être couplées aux enregistrements MEA afin de mieux échantillonner le comportement cellulaire, les activités du réseau, ainis que la signalisation synaptique. Par exemple, l'imagerie par fluorescence, qui permet d'avoir une information sur le comportement des neurones ou des cellules gliales, ainsi que sur la dynamique ionique, peut-être combinée aux enregistrements MEA. Une analyse histologique *post hoc* peut également révéler des altérations spécifiques des types de cellules, des protéines ou des récepteurs, qui peuvent être corrélées à la localisation des activités épileptiques. Le système d'enregistrement par MEA peut également être intégré à un poste de patch-clamp afin d'étudier les propriétés intrinsèques des neurones dans la région épileptogène. Des outils optogénétiques peuvent également être combinés aux enregistrements par MEA, mais dans ce cas il est nécessaire d'utiliser des cultures organotypiques. En effet, ces dernières offrent la possibilité de transfecter ou d'infecter des types cellulaires spécifiques.

Au cours de ma thèse j'ai utilisé des MEA à 120 électrodes afin d'enregistrer l'activité des tranches de tissu reséqué de patients atteints d'ELT, de FCD, ou de lipofuscinose neuronale focale (FNL). Avec l'aide de Nicolas David et Manisha Sinha nous avons également développé au laboratoire une routine Matlab permettant une détection semi-automatique des IILDs et de la MUA. Brièvement, le signal est filtré à l'aide d'un filtre Bessel passe-bande (1-40hz) ou passe-haut (>250Hz) pour détecter respectivement les IILDs ou la MUA. Le signal filtré est ensuite normalisé, mis au carré, et les évènements sont détectés en fixant un seuil arbitraire.

Ces enregistrements de tissu humain m'ont permis, par exemple, d'observer une association entre IILDs et HFOs sur du tissu humain épileptique réséqué de patients atteints de FCD (Figure 30) ou d'ELT. Ces HFOs sont restreintes aux régions générant des IILDs spontanées, et surviennent en même temps que ces dernières (Ribierre et al, en révision).

Cette observation confirme l'observation précédente de Pallud et al., 2014 qui avait montré que les IILDs enregistrées dans les zones péri-tumorales peuvent être associées à une HFO. Le tissu réséqué de patients épileptiques peut donc fournir un support unique pour étudier le lien entre HFOs et genèse d'activités épileptiformes. Il pourrait par exemple être intéressant d'étudier si, comme chez les rongeurs, les neurones générateurs de HFOs sont répartis en petit groupe dans le tissu épileptogène, et entourés par des régions silencieuses (Bragin et al., 2002a, 2002b).

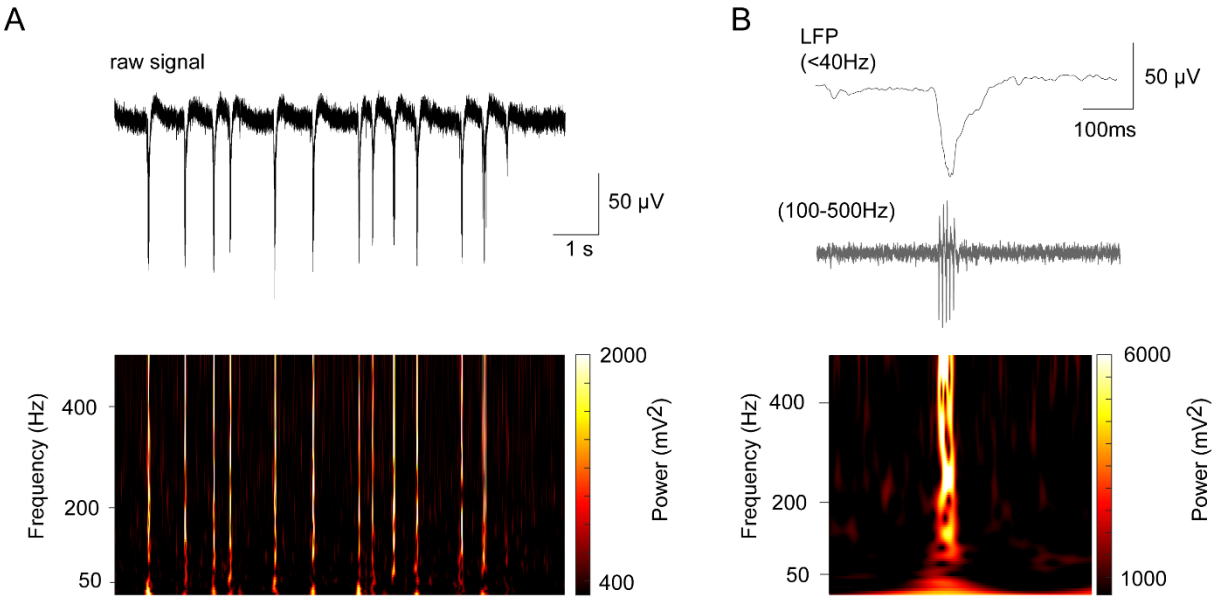


Figure 30. Les IILDs sont associées à des oscillations à haute fréquence (HFOs) dans le tissu réséqué de patients atteints de dysplasie corticale focale (FCD) de type II.

A. Enregistrement extracellulaire obtenu depuis une tranche de tissu réséqué d'un patient atteint de FCD de type II. Le spectrogramme met en évidence deux bandes de fréquence : une inférieure à 40Hz et une autre supérieure à 100Hz. **B**. Signal obtenu après avoir filtré le signal en A. On observe l'occurrence simultanée d'une HFO (100-500Hz) et d'une IILD (<40Hz).

MM.3.3- Corrélation entre les altérations géniques, cellulaires, protéiques et les activités épileptiformes

Les travaux sur les tissus épileptiques humains réséqués ont démontré des changements anatomiques considérables dans les régions préservées. Une réorganisation intense des réseaux neuronaux excitateurs et inhibiteurs est, par exemple, observée dans le gyrus denté.

Les cellules granulaires du gyrus denté sont dispersées (Houser, 1990), certaines classes d'interneurones inhibiteurs sont perdues de manière sélective (de Lanerolle et al., 1989; Maglóczky et al., 2000; Wittner et al., 2001), et du bourgeonnement axonal se produit au niveau des neurones glutamatergiques (Babb et al., 1991; Houser, 1990) et GABAergiques survivantes (Maglóczky et al., 2000; Wittner et al., 2001).

Une étude a également mis en évidence que les neurones de la substance blanche des patients atteints d'ELT reçoivent une entrée synaptique substantielle, et que ces neurones peuvent être intégrés dans les réseaux neuronaux épileptiques responsables du développement ou du maintien des crises (Sóki et al., 2022).

En plus des changements anatomiques, des altérations des niveaux d'expression de gènes et de protéines peuvent être observées grâce au tissu humain réséqué de patients épileptique. Dans ce sens, les tissus humains réséqués de FCD ont été largement utilisés pour étudier plus en détail les bases génétiques de cette pathologie (W. S. Lee et al., 2022). Des analyses RNA-seq, sur du tissu réséqué de patients atteint d'ELT, ont permis d'identifier de nouveaux gènes candidats (Dixit et al., 2016). Par le biais de PCR en temps réel et de spectrophotométrie, des changements des niveaux d'expression, de l'activité, et de la distribution cellulaire de diverses histones désacétylases (HDAC) ont ainsi été observés dans du tissu issu de patients atteints d'ELT (Srivastava et al., 2022). Des analyses RNAseq ont également permis de mettre en évidence chez ces patients une altération de l'expression des voies de signalisation régulant l'excitabilité neuronale (Hammer et al., 2019).

Comme indiqué précédemment, le tissu humain réséqué de patients épileptiques offre une opportunité unique pour corréler la présence de ces altérations cellulaires et protéiques à l'activité épileptiforme. Au cours de ma thèse, j'ai ainsi montré, à l'aide d'enregistrements MEA sur du tissu réséqué chez un patient atteint de FNL, que des IILDs spontanées sont enregistrées uniquement dans la zone présentant la plus forte densité de neurones dysmorphiques contenant de la lipofuscine.

Cela suggère une corrélation étroite entre la densité de neurones contenant de la lipofuscine et le caractère épileptogène (Frazzini et al., 2022). De la même manière, j'ai mis en évidence une corrélation entre la densité de neurones dysmorphiques et l'activité épileptiforme dans le tissu réséqué de patients atteints de FCD de type 2 (Ribierre et al, en révision).

Le tissu réséqué de patients épileptiques peut aussi permettre de faire le lien entre les activités enregistrées *in vivo* par électrocorticographie (ECoG) et les activités épileptiformes, ou les altérations cellulaires révélées *in vitro*. Une étude a ainsi mis en évidence un lien entre les HFOs enregistrées par ECoG préopératoire et l'activité de voies de signalisation impliquées dans l'inflammation dans le tissu péritumoral réséqué (Sun et al., 2022).

Une autre étude a mis en évidence une corrélation entre les HFOs enregistrées par ECoG en préopératoire et l'activité synaptique spontanée enregistrée *ex vivo* à partir d'échantillons de tissu cortical réséqués de patients pharmacorésistants. Une hyperactivité des interneurones GABAergiques est observée dans les zones présentant des HFOs, ce qui suggère que les interneurones GABAergiques joueraient un rôle dans la génération des HFOs pathologiques (Cepeda et al., 2020).

MM.3.4- Test de nouveaux traitements

Le tissu humain a été largement utilisé pour tester de nouveaux TAEs. Récemment, une étude a testé le potentiel thérapeutique de CERC-611 (LY3130481), un antagoniste des récepteurs AMPA, et de KRM-II-81, un modulateur allostérique positif des récepteurs $GABA_A$ (Witkin et al., 2019). Via des recherches sur le tissu humain postopératoire, (Cappaert et al., 2016) ont également mis en évidence un potentiel thérapeutique de la carbamazépine dans le gyrus denté de rats et sur du tissu humain provenant de patients pharmacorésistants. Wright et al., 2020, ont de leur côté montré que le pérampanel et l'acide décanoïque inhibent les décharges épileptiformes dans le tissu humain réséqué. D'autres études ont également identifié le potentiel antiépileptique du neuropeptide Y (Wickham et al., 2019) et d'un agoniste des récepteurs A1 de l'adénosine (Klaft et al., 2016).

Au cours de ma thèse j'ai également utilisé du tissu humain réséqué de patients atteints d'ELT afin d'évaluer le potentiel thérapeutique de nouveaux potentialisateurs de KCC2 sur l'émergence d'activités épileptiformes.

MM.3.5- Limites à l'utilisation du tissu humain et conclusion

Bien que le tissu humain présente de nombreux avantages pour l'étude de la pathologie, il existe quelques limites à son utilisation.

Tout d'abord, il est important de noter que l'utilisation de tissu humain postopératoire nécessite une bonne synchronisation et communication entre les neurochirurgiens, les services hospitaliers et le laboratoire de recherche, ce qui n'est pas toujours facile. Il est important que les différents acteurs s'accordent sur la quantité de tissu nécessaire pour la recherche sans impacter ou compromettre le travail des services d'anatomopathologie.

Les foyers épileptiques pouvant être très focaux, la résection peut conduire à la récupération d'une très faible quantité de tissu, ce qui n'est pas suffisant pour la préparation de tranches de tissu pour enregistrements électrophysiologiques. Il est également important de discuter avec les neurochirurgiens de la zone réséquée qui présente le plus d'intérêt pour la recherche. J'ai par exemple observé au cours de ma thèse, que la partie antérieure du corps de l'hippocampe est la plus à même de présenter des IILDs spontanées dans le cas de résection de sclérose hippocampique, alors que l'extrémité de la tête de l'hippocampe en est dépourvue.

Les chirurgies de résection n'étant pas nombreuses, le tissu humain reste très précieux. En prenant en compte le temps de préparation des solutions, le risque d'obtenir un tissu abimé, d'avoir une mauvaise survie tissulaire, ou de ne pas avoir le foyer épileptique, le résultat de ces expériences sur le tissu humain postopératoire reste variable. Cependant, celles-ci représentent une opportunité unique pour les chercheurs afin de mieux comprendre la pathologie, et d'établir une corrélation entre l'activité épileptiforme enregistrée *in vivo* ou *in vitro* et les altérations cellulaires et moléculaires observées sur les tranches de ce tissu. De plus, ce tissu présente un intérêt non négligeable pour tester de nouveaux composés à visée thérapeutique.

MM.4- Modèles animaux d'épilepsie du lobe temporal

L'épilepsie du lobe temporal (ELT) est caractérisée par des crises imprévisibles et récurrentes qui sont souvent résistantes aux médicaments antiépileptiques. Des modèles animaux reproduisant les caractéristiques électroencéphalographiques, comportementales, et neuropathologiques de ce trouble épileptique ont été développés au cours des quatre dernières décennies dans le but de mieux comprendre la pathophysiologie de l'ELT et de développer de nouvelles approches thérapeutiques.

L'induction de l'épilepsie dans ces modèles consiste en une lésion cérébrale initiale (état de mal épileptique, crise fébrile, hypoxie/ischémie, infection, traumatisme crânien), suivi d'une période de latence, puis d'une phase chronique pendant laquelle des crises récurrentes et spontanées peuvent être enregistrées (Figure 31).

Les différents modèles d'ELT peuvent être séparés en fonction du moyen d'induction de la lésion cérébrale. On distingue ainsi les modèles chimiques d'ELT (acide kaïnique, pilocarpine, lithium-pilocarpine, organophosphate, flurothyle, toxine tétanique,…), électriques (stimulation de la voie perforante, stimulation auto-entretenue), génétiques (mutations spontanées, induites), et d'autres modèles (hypoxie/ischémie, hyperthermie, lésion induite par percussion liquide) (Figure 32). Ces modèles sont décrits en détails dans Nirwan et al., 2018.

Dans cette partie, je présente les deux principaux modèles animaux d'ELT qui utilisent l'administration systémique de convulsivants chimiques. L'un de ces modèles utilise l'acide kaïnique, un analogue cyclique du L-glutamate et un agoniste des récepteurs ionotropiques à l'acide kaïnique.

L'autre modèle utilise la pilocarpine, un agoniste cholinergique muscarinique. Ces modèles ont été largement utilisés dans la recherche en raison de leur grande similitude avec la pathologie humaine.

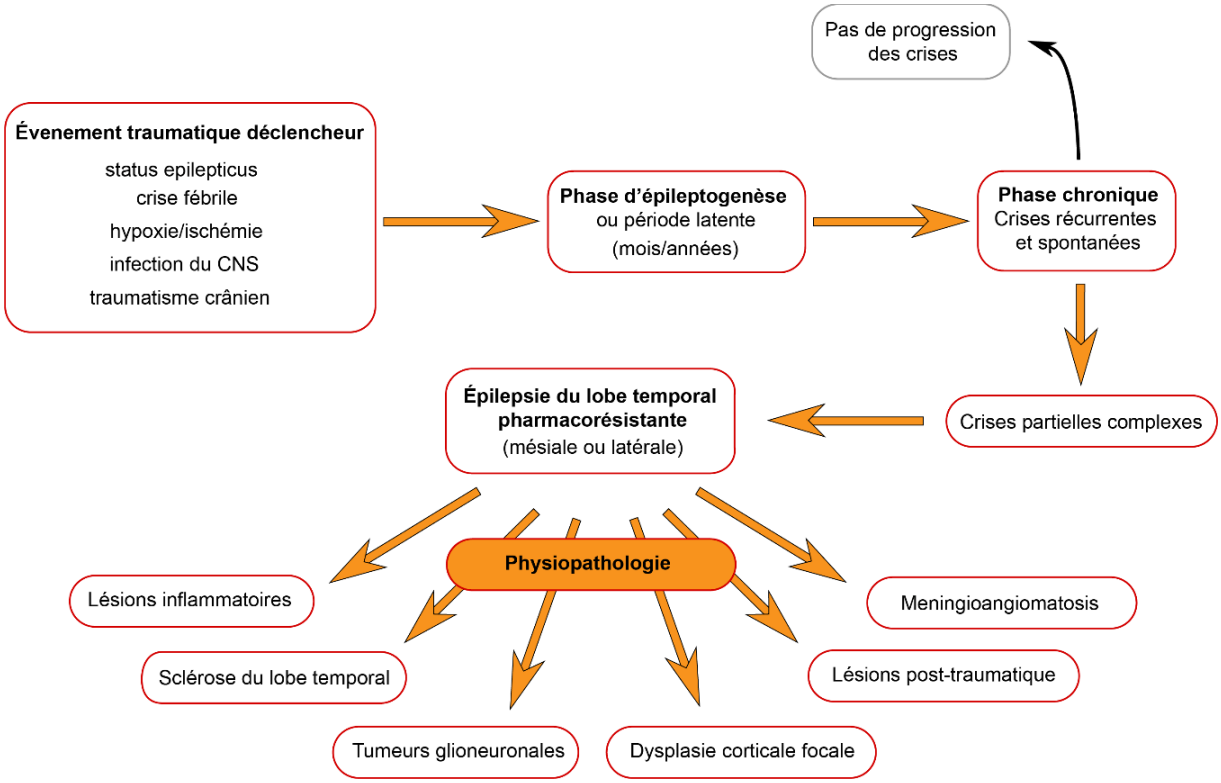


Figure 31. Epilepsie du lobe temporale pharmacorésistante : histoire naturelle.

Un événement initial (traumatisme, crisé fébrile, encéphalopathie...) conduit à une phase d'épileptogenèse, ou période latente sans crises, qui évolue vers une phase chronique caractérisée par la présence de crises récurrentes et spontanées. Ces crises peuvent évoluer vers des crises partielles complexes et conduire à une épilepsie du lobe temporal pharmacorésistante. Cette dernière peut être mésiale ou latérale et peut impliquer de nombreuses altérations pathophysiologiques.

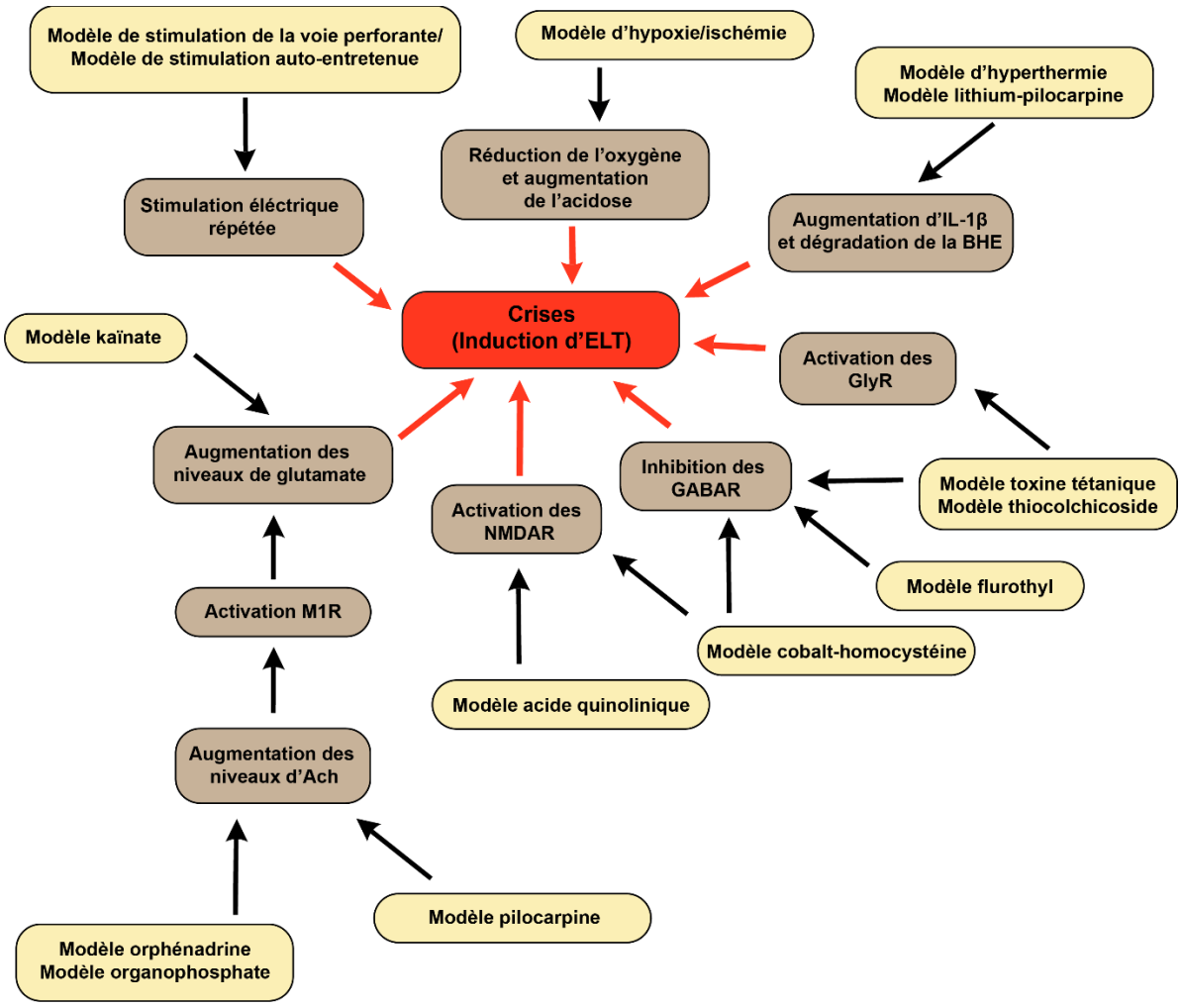


Figure 32. Mécanismes d'induction d'épilepsie du lobe temporal (ELT) dans les différents modèles animaux.

La stimulation électrique répétée du lobe temporal induit des crises dans un modèle de stimulation de la voie perforante et de stimulation auto-entretenue. Une acidose accrue et une réduction d'oxygène génèrent des crises dans le modèle d'hypoxie-ischémie. Les modèles d'hyperthermie et lithium-pilocarpine conduisent à une augmentation d'IL-β et à une rupture de la barrière hémato-encéphalique (BHE), conduisant à un *status epilepticus* (SE). L'augmentation des niveaux de glutamate induit des crises dans le modèle acide kaïnique, pilocarpine, orphénadrine et organophosphate. D'autres produits chimiques tels que l'acide quinolinique, le cobalt-homocystéine, la toxine tétanique et le thiocolchicoside provoquent des crises en activant les récepteurs glycinergiques (GlyR) ou les récepteurs NMDA (NMDAR). Le flurothyl inhibe les récepteurs GABA (GABAR) et provoque des crises. Ach : acétylcholine, M1R : récepteurs muscariniques de type 1. D'après Nirwan et al., 2018.

MM.4.1- Comparaison entre les modèles acide kaïnique et pilocarpine

MM.4.1.1- *Status epilepticus*

La première étape d'induction d'épilepsie dans ces modèles consiste à déclencher un état de mal épileptique, ou *status epilepticus* (SE). Celui-ci est défini comme une période d'activité épileptique ininterrompue d'au moins 30 min pendant laquelle la pleine conscience ne se rétablit pas (Lowenstein et al., 1999; Scott, 2014). Il évolue généralement en deux étapes. Le premier stade est caractérisé par des crises tonico-cloniques convulsives généralisées, alors que le second stade comprends des symptômes comportementaux mineurs, une augmentation de la pression intracrânienne et une diminution du débit sanguin cérébral (Cherian and Thomas, 2009).

Les modèles d'ELT, induits par des chimio-convulsivants, reproduisent cette lésion cérébrale initiale. Chez les animaux adultes, l'administration par voie intrapéritonéale d'une dose unique d'acide kaïnique (6-15 mg/kg) ou de pilocarpine (360-400 mg/kg) peut déclencher un SE (Curia et al., 2008; Lévesque and Avoli, 2013). Dans les deux modèles, les symptômes comportementaux sont observés dans l'heure qui suit l'administration du chimio-convulsivant, et sont caractérisés par une posture catatonique et des automatismes qui évoluent vers des secousses myocloniques de la tête et des membres, suivies de crises limbiques sévères et d'une chute arrière (Sperk et al., 1983; Strain and Tasker, 1991; Turski et al., 1989, 1983).

Dans le modèle acide kaïnique, la mortalité varie de 5 à 30%, mais elle peut être diminuée par l'administration de doses multiples de 5 mg/kg jusqu'à l'apparition de l'état de mal épileptique (Lévesque and Avoli, 2013). Les taux de mortalité dans le modèle pilocarpine sont plus élevés puisqu'environ 30 à 40 % des animaux traités ne survivent pas au SE (Curia et al., 2008). Ces taux peuvent cependant être significativement réduits par une administration préalable de lithium (127 mg/kg, i.p.) 18-24 heures avant l'injection de pilocarpine (Clifford et al., 1987; Curia et al., 2008; Müller et al., 2009). Le lithium active la cascade inflammatoire et par conséquent diminue le seuil des crises en augmentant la perméabilité de la BHE à la pilocarpine (Marchi et al., 2007). Les doses de pilocarpine injectées peuvent ainsi être réduites jusqu'à 30 mg/kg chez les rats (Curia et al., 2008; Müller et al., 2009).

Le modèle lithium-pilocarpine est associé à des anomalies du comportement, à des modifications histopathologiques, et à une activité EEG semblable à celle observée dans le modèle pilocarpine classique (Curia et al., 2008; Müller et al., 2009). L'injection de doses multiples de 10 mg/kg de pilocarpine peut également être utilisée pour diminuer le taux de mortalité et augmenter la proportion d'animaux traités qui développeront des crises spontanées (Curia et al., 2008; Sharma et al., 2007). La combinaison d'un prétraitement au lithium à 30 mg/kg et de doses multiples de pilocarpine à 10 mg/kg est décrite comme étant une la méthode la plus efficace, puisqu'elle permet de réduire le taux de mortalité à 7 % et une proportion élevée d'animaux (85 %) développe des crises spontanées (Glien et al., 2001).

L'état épileptique disparaît spontanément 5 à 6 heures après l'administration de pilocarpine ou d'acide kaïnique (Curia et al., 2008; Fritsch et al., 2010). Cependant, d'un point de vue pratique, et dans le but de réduire la variabilité entre les animaux et le taux de mortalité, le SE peut être arrêté dans les deux modèles après 30-120 min par l'administration de kétamine (50 mg/kg i.p. ou s.c.) et de diazépam (20 mg/kg i.p. ou s.c.) (Martin and Kapur, 2008; Vermoesen et al., 2010). Il est intéressant de noter que seul l'effet synergique de ces composés contribue à l'arrêt du SE (Martin and Kapur, 2008).

L'induction d'épilepsie avec l'acide kaïnique ou la pilocarpine est bien établie pour les rats, mais il est important de noter que l'effet du convulsivant diffère selon les souches utilisées, puisque les taux de mortalité et les dommages neuronaux sont plus élevés chez les souches Long-Evans et Wistar que chez les rats Sprague-Dawley (Curia et al., 2008). Il faut ajouter à cela que les animaux d'un même fournisseur, mais provenant de colonies de reproduction différentes, peuvent présenter des sensibilités différentes (Langer et al., 2011). L'utilisation de souris présente aussi une certaine complexité car certaines souches sont très sensibles aux agents chimio-convulsivants. Par exemple, les souris C57 et C3H présentent des taux de mortalité élevés (57%) après une injection unique d'acide kaïnique, tandis que les souris 129/SvJ ou 129/SvEms ont un taux de mortalité compris entre 0 et 8% (McKhann et al., 2003). Les souches C57 et C3H sont également plus susceptibles de présenter des crises longues et sévères, contrairement aux souris 129/SvJ et 129/SvEms, mais sont moins sensibles à la perte neuronale et moins susceptibles de développer un bourgeonnement des fibres moussues (McKhann et al., 2003; Schauwecker and Steward, 1997).

Enfin, les souris sont moins susceptibles de développer des crises spontanées en comparaison aux rats (McKhann et al., 2003). Cependant, elles sont plus susceptibles de présenter des crises spontanées et des lésions neuronales après l'administration de pilocarpine (Cavalheiro et al., 1996; Schauwecker, 2012).

En résumé, le principal avantage de la pilocarpine, par rapport à l'acide kaïnique, repose sur sa capacité à induire rapidement un SE. Peu d'injections sont nécessaires puisqu'une seule dose initiale de pilocarpine suivie d'une seconde demi-dose est suffisante pour produire un état de mal épileptique. Les animaux ont plus de chance de survivre au SE dans le modèle acide kaïnique (Covolan and Mello, 2000), mais de multiples injections à 1 h d'intervalle peuvent être nécessaires pour induire un état de mal épileptique, ce qui peut conduire à une durée d'expérimentation de 6 à 8 h (Hellier et al., 1998).

MM.4.1.2- Période latente

La durée de la période de latence s'étend entre 10 et 30 jours après l'injection d'acide kaïnique (Chauvière et al., 2012; Cherubini et al., 1983; Drexel et al., 2012; Lado, 2006; Petkova et al., 2014; Sharma et al., 2007; White et al., 2010; Williams et al., 2006), mais elle peut durer jusqu'à 5 mois après le traitement dans certaines expériences (Williams et al., 2006). Pendant cette période, des enregistrements EEG intracraniaux montrent des pointes intericales dans le lobe temporal (Chauvière et al., 2012; Suárez et al., 2012; White et al., 2010; Williams et al., 2006; Zhang et al., 2011). En utilisant des injections systémiques d'acide kaïnique, White et al., 2010, ont montré que le taux d'occurrence de ces pointes en phase d'épileptogenèse est corrélé à la fréquence des crises. Les rats qui développent des crises spontanées ont ainsi des taux plus élevés de pointes intericales par rapport aux rats qui ne développent pas d'épilepsie chronique (White et al., 2010).

La durée de la période de latence dans le modèle pilocarpine est similaire à celle rapportée chez les animaux traités par l'acide kaïnique, puisqu'elle dure en moyenne entre 4 et 40 jours après son administration (Bortel et al., 2010; Cavalheiro et al., 1991; Chauvière et al., 2012; Lévesque et al., 2012, 2011; Liu et al., 1994; Soukupová et al., 2014). Comme cela a été montré chez les animaux traités à l'acide kaïnique, des pointes intericales apparaissent pendant l'épileptogenèse dans les régions du lobe temporal des animaux traités à la pilocarpine (Bortel et al., 2010; Chauvière et al., 2012; Salami et al., 2014).

L'utilisation de l'un ou l'autre ce ces deux chimio-convulsivants n'offre donc aucun avantage particulier lors de l'analyse des activités épileptiformes pendant la période de latence. L'acide kaïnique et la pilocarpine sont tous deux associés à l'apparition de crises spontanées après des périodes de latence de durée similaire. Les pointes intericales enregistrées dans les régions du lobe temporal semblent également présenter des schémas d'évolution similaires dans le temps.

MM.4.1.3- Phase chronique

Les patients atteints d'ELT présentent souvent des bouffées de crises, au cours desquelles les crises se produisent plusieurs fois par jour, pendant plusieurs jours consécutifs (Haut, 2006). Les modèles à l'acide kaïnique et à la pilocarpine reproduisent cette caractéristique de l'ELT, puisque dans les premiers jours après l'injection, les animaux épileptiques alternent entre des périodes sans crises et des périodes de taux de crises élevés (Arida et al., 1999; Bortel et al., 2010; Cavalheiro, 1995; Drexel et al., 2012; Goffin et al., 2007; Grabenstatter et al., 2005; Lévesque et al., 2011; Mello et al., 1993; Williams et al., 2009). Cependant, lorsque les animaux sont enregistrés pendant trois mois après un état de mal épileptique induit par l'acide kaïnique, le taux d'occurrence des crises, bien qu'en bouffées, augmente progressivement dans le temps (Williams et al., 2009). Une telle augmentation de la fréquence des crises a également été mise en évidence dans le modèle pilocarpine au cours des deux premiers mois suivant le SE (Arida et al., 1999).

Les crises survenant au cours de la phase chronique chez les patients atteints d'ELT peuvent être classées en fonction de leur schéma d'apparition qui, selon certaines études, fournit des indices sur leur origine et leur mécanisme de génération. Le premier type de crise (« low voltage-fast onset » ou LVF) est caractérisé par une déflexion du potentiel de champ, suivie d'une activité à haute fréquence (>25 Hz). Le deuxième type de crise (« hypersynchronous onset pattern » ou HYP) consiste en des crises avec de multiples pointes périodiques, survenant à une fréquence d'environ 2 Hz. Les crises LVF sont souvent générées par des réseaux hippocampiques ou extrahippocampiques, et les patients présentant ce type de crises ont une atrophie hippocampique bilatérale (Ogren et al., 2009; Velasco et al., 2000). En revanche, les patients souffrant de crises HYP présentent des zones épileptogènes souvent focales au niveau des régions hippocampiques, et une atrophie hippocampique unilatérale est observée (Ogren et al., 2009; Spencer et al., 1992; Velasco et al., 2000).

Ces résultats ont été reproduits chez certains animaux traités à l'acide kaïnique (A. Bragin et al., 1999b; Bragin et al., 2005). Comme chez l'homme, les zones d'apparition des crises LVF sont diffuses alors que les crises HYP semblent provenir de réseaux hippocampiques ou parahippocampiques focaux (A. Bragin et al., 1999b; Bragin et al., 2005). Les mêmes observations sont faites pendant la phase chronique dans le modèle pilocarpine (Lévesque et al., 2012; Toyoda et al., 2013). La prévalence des crises LVF et HYP peut cependant différer entre les patients épileptiques et les animaux traités par chimio-convulsivants. En effet, la majorité des patients épileptiques présentent souvent, soit des crises LVF, soit des crises HYP (Velasco et al., 2000), alors que dans les modèles animaux alternent des crises LVF et HYP (Bragin et al., 2005; Lévesque et al., 2012).

Comme chez les patients atteints d'ELT, les animaux épileptiques présentent des pointes intericta les pendant la période chronique, aussi bien dans le modèle acide kaïnique (Chauvière et al., 2012; White et al., 2010; Zhang et al., 2011) que dans le modèle pilocarpine (Bortel et al., 2010; Chauvière et al., 2012; Lévesque et al., 2011; Salami et al., 2014). Dans le modèle acide kaïnique, les pointes intericta les sont toutefois plus susceptibles de se produire chez les animaux qui ont subi un SE convulsif, par rapport aux animaux contrôles et aux animaux qui ont subi une SE non convulsif (White et al., 2010). Les animaux qui ont subi un SE convulsif sont également plus susceptibles de présenter des bouffées de pointes intericta les sur des zones étendues du gyrus denté (White et al., 2010). Des pointes intericta les peuvent également apparaître dans le subiculum, l'hippocampe, et le néocortex après l'injection d'acide kaïnique (Arida et al., 1999; Zhang et al., 2011). Dans le modèle pilocarpine, des résultats similaires ont été obtenus (Bortel et al., 2010).

Il est intéressant de noter que, de manière similaire à ce qui est observé sur le tissu humain, les pointes intericta les peuvent être associées à des HFOs chez des animaux traités à l'acide kaïnique (Zhang et al., 2011) ou à la pilocarpine (Lévesque et al., 2011). Le taux de pointes intericta les associées à des HFOs dans l'aire CA3 a même été suggéré comme étant corrélé à la fréquence des crises (Lévesque et al., 2011).

En résumé, les propriétés et schémas de décharge des activités ictales et intericta les sont similaires entre les deux modèles. La seule différence réside dans la fréquence des crises, puisque les animaux traités à la pilocarpine présentent des taux de crises significativement plus élevés que les animaux traités à l'acide kaïnique (Polli et al., 2014).

MM.4.1.4- Altérations neuropathologiques

L'utilisation d'acide kaïnique induit des dommages neuronaux importants dans les structures hippocampiques et parahippocampiques. Une perte de cellules pyramidales dans les régions CA1, CA3 et CA4 de l'hippocampe est ainsi observée 48h après l'injection (Ben-Ari et al., 1980; Cantallops and Routtenberg, 2000; Castro-Torres et al., 2014; Drexel et al., 2012; Haas et al., 2001; Heggli and Malthe-Sørenssen, 1982; Kaila et al., 1997; MacGregor et al., 1996; Sloviter and Damiano, 1981; Sperk et al., 1983; Strain and Tasker, 1991; Suárez et al., 2012; Zhang et al., 2002). Par la suite d'autres altérations sont observées, telles qu'une perte de neurones dans le hile, une dispersion des couches cellulaires dans le gyrus denté, et un bourgeonnement des fibres moussues (Ben-Ari et al., 1980; Buckmaster and Dudek, 1997; Covolan and Mello, 2000; Polli et al., 2014).

Avec l'administration systémique de pilocarpine, les dommages cellulaires auraient lieu d'abord dans les cellules granulaires du gyrus dentée et dans le hile, suivis d'une dégénérescence neuronale dans CA3 et CA1, entre 24 h et 48 h après le SE (Covolan and Mello, 2000). Plusieurs noyaux du thalamus et de l'amygdale sont également fortement endommagés tôt après l'injection de pilocarpine (Clifford et al., 1987). La perte neuronale s'étend ensuite au subiculum, au septum, au tubercule olfactif, à l'amygdale, aux cortex piriforme et entorhinal, au néocortex, et au thalamus (Cavalheiro et al., 1996; de Guzman et al., 2006; Knopp et al., 2005; Turski et al., 1983).

Les deux modèles sont donc tous deux associés à des lésions neuronales qui se produisent d'abord dans l'hippocampe, et qui progressent ensuite vers les réseaux extra-hippocampiques avec approximativement les mêmes régions présentant une perte neuronale. Il a toutefois été suggéré que la principale différence entre les deux modèles réside dans le niveau d'intensité et le déroulement temporel des lésions neuronales. Les injections systémiques de pilocarpine sont associées à une forte perte neuronale survenant après un court intervalle de temps (3h), par rapport à l'acide kaïnique pour lequel la perte neuronale est retardée (8h) (Covolan and Mello, 2000). Le niveau élevé de perte neuronale et la progression rapide peuvent expliquer le taux de mortalité élevé associé à la pilocarpine.

MM.4.2- Choix du modèle ELT pour la thèse et optimisation du protocole

Comme on vient de le voir, le modèle pilocarpine présente plusieurs avantages par rapport au modèle kaïnate. L'injection généralement d'une seule dose de pilocarpine est suffisante pour induire un SE, le taux de mortalité peut être modéré avec l'ajout d'un prétraitement au lithium, le profil comportemental, histopathologique et EEG est très proche de la pathologie humaine et les souris injectées avec de la pilocarpine développent plus facilement des crises spontanées et avec un taux plus élevé que dans un modèle kaïnate (Lévesque et al., 2016). De plus, d'un point de vue pratique, la pilocarpine est moins onéreuse que l'acide kaïnique.

Au regard de tous ces avantages, j'ai donc choisi d'utiliser le modèle lithium-pilocarpine au cours de ma thèse.

Avant de débuter les expériences, Adrien Zanin, médecin et stagiaire M2 au moment de ma thèse, a vérifié au laboratoire que ce protocole était le plus adapté et l'a optimisé pour réduire la mortalité. Il a tout d'abord comparé deux protocoles d'induction du SE chez des souris C57Bl6/J. Le SE a été induit par injection unique (*single*) de pilocarpine dans un premier groupe de souris (n=10) tandis qu'il a été induit par injections successives de doses infraliminales de pilocarpine (*kindling*) dans un second groupe (n=9). Un troisième groupe (contrôle, n=4) n'a pas reçu d'injection de pilocarpine. Toutes les souris ont été injectées avec du lithium (423 mg/kg, i.p.) 18 à 24h avant la première injection de pilocarpine. Ces souris ont également reçu de la scopolamine à la posologie de 1mg/kg (voie i.p.) 30 minutes avant l'expérimentation, afin de limiter les effets périphériques de la pilocarpine.

Les souris du groupe *single* ont reçu de la pilocarpine à la dose de 80 mg/kg (voie i.p.) en une seule injection. Si la première injection ne suffisait pas à induire un *SE*, une seconde injection était réalisée 1h après la première (Figure 33A). Les souris du groupe *kindling* ont reçu de la pilocarpine à la dose de 10 mg/kg (voie i.p.) toutes les 30 minutes jusqu'à obtenir un *SE* (sans dépasser la dose de 40 mg/kg). Le *SE* a été par la suite arrêté avec du diazepam, à la posologie de 10mg/kg, et de la kétamine, à la posologie de de 10 à 40 mg/kg. Le score de Racine modifié a été utilisé pour évaluer cliniquement le *status epilepticus*.

Sur les 23 souris testées, un *SE* a été induit chez 90% des souris du *groupe single* contre seulement 44% dans le groupe *kindling* (Figure 33C, p=0.0495). Le taux de mortalité a atteint 50% dans le groupe *single* contre 55.5% dans le groupe *kindling* (Figure 33B).

D'autre part, le délai d'apparition du *SE* a été significativement plus court pour les souris du groupe *single* que pour celles du groupe *kindling* (77.6±10.1 *vs.* 118.8±9.7 min, respectivement, p=0.0235 ; Figure 33D). Toutefois, il est important de noter qu'Adrien Zanin a constaté une mortalité élevée due à la kétamine lors du premier jour d'expérimentation. En effet, pour une dose de ketamine>10mg/kg, 75% des souris ayant reçu de la pilocarpine, et 50% des souris contrôle sont décédées (Figure 33E). Il a donc été choisi par la suite de diminuer la dose de 40mg/kg à 10mg/kg. En ne prenant en compte que les souris ayant reçu une dose de ketamine égale à 10mg/kg, les taux de mortalité passent à 0% pour les souris *contrôle*, 16.7% pour les souris du groupe *single*, et 55.6% pour les souris du groupe *kindling* (Figure 33E). Ces résultats démontrent donc que, contrairement à ce qui est présenté dans la littérature, le modèle pilocarpine en injection unique montre à la fois une meilleure efficacité à induire un *SE* chez la souris C57Bl6/J, et entraîne une mortalité inférieure. C'est donc ce modèle qui a été retenu pour la suite de ma thèse.

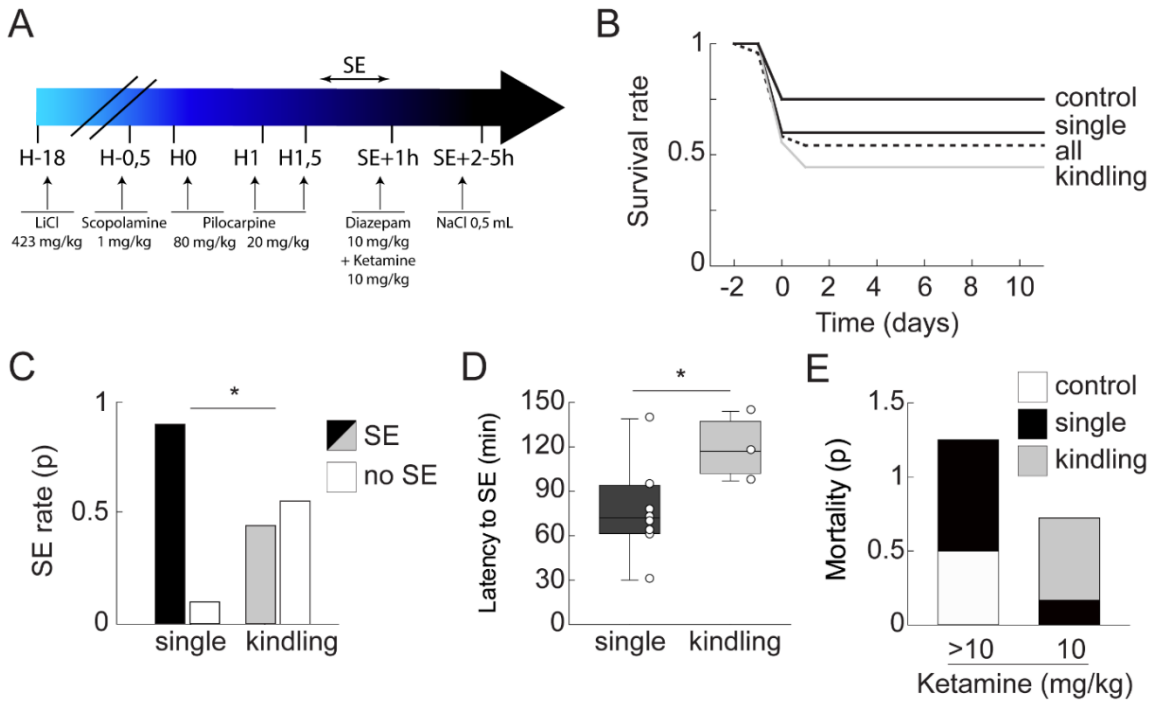


Figure 33. Comparaison de l'efficacité de deux protocoles d'induction d'épilepsie, basés sur l'injection de pilocarpine (*single* vs *kindling*).

A- Protocole pilocarpine single retenu pour l'expérimentation. Une injection unique n'est cependant pas toujours suffisante pour induire un *status epilepticus* (SE), et une à deux autres injections supplémentaires sont parfois nécessaires. **B**- Courbe de survie (taux) des souris selon le type de protocole. **C**- Graphe représentant le taux de succès de SE (en proportion) en fonction du protocole (n=10 single et 9 kindling, *p<0.05 test du Chi2). **D**- Graphe représentant le délai d'apparition du SE en fonction du protocole (Mann Whitney rank sum test p=0.025 n=9 single et 4 kindling). **E**- Graphe représentant la proportion de mortalité des souris en fonction du type de protocole et de la posologie de la ketamine. 50% des souris contrôle et 75% des souris single sont mortes sous ketamine>10 mg/kg, et 0% des souris contrôle, 17% des souris single et 55% des souris kindling sont mortes sous ketamine 10 mg/kg. LiCl : chlorure de lithium. *p<0,05.

Résultats

Article 1 :

KCC2 régule l'homéostasie neuronale des ions Cl^- de manière similaire entre les interneurones à parvalbumine et les cellules pyramidales de l'hippocampe.

Introduction

KCC2 et NKCC1 jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'homéostasie neuronale des ions Cl^-, et par conséquent dans le contrôle de la polarité de la transmission GABAergique. Il a ainsi été montré que l'expression progressive de KCC2 au cours du développement contribue à un changement progressif du Cl^- intraneuronal et de la polarité de la signalisation GABAergique dans les cellules pyramidales (CP) corticales *in vitro* (Rivera et al., 1999). Il a aussi été démontré *in vivo* que le GABA dépolarise les CP immatures tout en exerçant une action inhibitrice, via un effet de « shunt » de la résistance de membrane (Kirmse et al., 2015).

En plus d'être exprimé dans les CPs, KCC2 est également exprimé dans la plupart des sous-types d'interneurones dans l'hippocampe adulte de rat (Gulyás et al., 2001). Cependant, le contrôle de l'homéostasie neuronale des ions Cl^- dans ce type cellulaire reste peu étudié, et les résultats obtenus entre différentes études sont parfois contradictoires. Il a été suggéré qu'E_{GABA} est plus dépolarisé dans les interneurones du stratum radiatum de l'hippocampe que dans les CP voisins (Patenaude et al., 2005). De plus, il a été démontré que la force électromotrice des courants médiés par les $GABA_AR$ reste inchangée au cours de la maturation postnatale des interneurones du *stratum oriens* (Banke and McBain, 2006), tandis qu'elle devient hyperpolarisante dans les cellules en panier du gyrus denté (Sauer and Bartos, 2010). Ainsi, même si l'expression et la fonction des CCCs sont bien caractérisées dans les CPs, la manière dont l'expression ou la fonction des CCCs contrôle la polarité et l'efficacité de la signalisation GABAergique dans les interneurones reste à clarifier.

Objectif

L'une des difficultés rencontrées pour répondre à cette question est liée à la diversité des approches expérimentales utilisées pour évaluer l'effet du GABA ou du transport du Cl^- avec une perturbation minimale de l'intégrité neuronale (voir MM.1).

Au cours de ma thèse, j'ai contribué à un article dans lequel nous avons choisi d'utiliser une combinaison d'approches électrophysiologiques *in vitro* invasives et non invasives afin de comparer la contribution de KCC2 et NKCC1 à la signalisation GABAergique, et l'homéostasie neuronale des ions chlorure dans les interneurones parvalbumine (IN PV) et les cellules pyramidales (CP) de l'hippocampe de souris adulte.

Résultats

Dans un premier temps, nous avons confirmé que KCC2 est bien exprimé à la membrane des IN PV dans l'hippocampe de souris adulte, à l'aide d'immunomarquages de KCC2 et des filets périneuronaux qui entourent spécifiquement le corps cellulaire des IN PV.

Nous avons ensuite combiné des enregistrements de patch clamp en configuration cellule-attachée, ainsi que des enregistrements en patch perforé, afin de montrer que la transmission médiée par les $GABA_AR$ est légèrement dépolarisante et pourtant inhibitrice dans les IN PV et les CP.

Des enregistrements en configuration cellule-entière couplés à un décageage de GABA ont ensuite permis de confirmer que KCC2 et NKCC1 sont fonctionnels dans les deux types cellulaires, mais contribuent différemment aux gradients transmembranaires de Cl^- au niveau somatique et dendritique. En effet, ce gradient est plus important dans les CP que dans les IN PV, suggérant que l'extrusion de Cl^- le long des dendrites est moins efficace dans les interneurones PV. Cependant, E_{GABA} somatique est plus hyperpolarisé dans les IN PV que les CP, ce qui suggère que le transport de Cl^- au niveau somatique est plus important dans les interneurones.

Ces différences suggèrent une expression et/ou fonction de KCC2 et NKCC1 (et/ou des $GABA_AR$) différente le long de l'axe somatodendritique entre les deux types cellulaires, avec un ratio fonctionnel KCC2/NKCC1- $GABA_AR$ plus important dans le soma des IN PV.

Enfin, nous montrons que l'activation répétitive à 10 Hz des $GABA_AR$ dans les PV-IN et les PCs entraîne un déclin progressif de la réponse postsynaptique, indépendamment de la direction du flux ionique ou de la fonction de KCC2.

Cette observation suggère que l'accumulation intraneuronale de Cl^-, lors d'une activation synaptique répétée, ne contribue pas de manière prédominante à la plasticité des synapses GABAergiques dans cette gamme de fréquence.

Conclusion

En conclusion, nos données démontrent que, dans l'hippocampe adulte, les IN PV et les PC présentent des mécanismes similaires de régulation de l'homéostasie neuronale des ions Cl^- par les CCCs. Cela suggère donc que la régulation négative de KCC2 dans la pathologie pourrait affecter la signalisation GABAergique dans les deux types cellulaires.

Contribution

Dans cet article, j'ai réalisé les immunomarquages de KCC2 et des filets périneuronaux, afin de confirmer l'expression de KCC2 dans les IN PV.

Check for updates

The Journal of Physiology

Cation–chloride cotransporters and the polarity of GABA signalling in mouse hippocampal parvalbumin interneurons

Yo Otsu[1,2,3], Florian Donneger[1,2,3], Eric J Schwartz[1,2,3] and Jean Christophe Poncer[1,2,3]

[1] *Inserm UMR-S 1270, 75005 Paris, France*
[2] *Sorbonne Université, F75005 Paris, France*
[3] *Institut du Fer à Moulin, F75005 Paris, France*

Edited by: Ole Paulsen & Katalin Toth

Linked articles: This article is highlighted in a Perspectives article by Holthoff. To read this article, visit https://doi.org/10.1113/JP279623.

Key points

- Cation–chloride cotransporters (CCCs) play a critical role in controlling the efficacy and polarity of $GABA_A$ receptor ($GABA_AR$)-mediated transmission in the brain, yet their expression and function in GABAergic interneurons has been overlooked.
- We compared the polarity of GABA signalling and the function of CCCs in mouse hippocampal pyramidal neurons and parvalbumin-expressing interneurons.
- Under resting conditions, $GABA_AR$ activation was mostly depolarizing and yet inhibitory in both cell types. KCC2 blockade further depolarized the reversal potential of $GABA_AR$-mediated currents often above action potential threshold.
- However, during repetitive $GABA_AR$ activation, the postsynaptic response declined independently of the ion flux direction or KCC2 function, suggesting intracellular chloride build-up is not responsible for this form of plasticity.
- Our data demonstrate similar mechanisms of chloride regulation in mouse hippocampal pyramidal neurons and parvalbumin interneurons.

Abstract Transmembrane chloride gradients govern the efficacy and polarity of GABA signalling in neurons and are usually maintained by the activity of cation–chloride cotransporters, such as KCC2 and NKCC1. Whereas their role is well established in cortical principal neurons, it remains poorly documented in GABAergic interneurons. We used complementary electrophysiological approaches to compare the effects of $GABA_A$ receptor ($GABA_AR$) activation in adult mouse hippocampal parvalbumin interneurons (PV-INs) and pyramidal cells (PCs). Loose cell-attached, tight-seal and gramicidin-perforated patch recordings all show $GABA_AR$-mediated transmission

Dr. Yo Otsu obtained his PhD in 1995 from Osaka University Medical School in Japan. He then held several positions at Niigata University, University of British Columbia, Vancouver, Ecole Normale Supérieure and Université René Descartes, Paris. He joined the Institut du Fer à Moulin (INSERM and Sorbonne Université) in Paris as a senior postdoctoral fellow in 2015 to work with Jean Christophe Poncer. His primary research interest is in synaptic physiology and its impact on brain health and disease. He is now at the Kolling Institute, University of Sydney, Australia, where his research focuses on the brain circuits of pain.

This article was first published as a preprint: Otsu Y, Donneger F, Schwartz EJ, Poncer JC. 2019. Cation-chloride cotransporters and the polarity of GABA signaling in mouse hippocampal parvalbumin interneurons. bioRxiv, DOI: 10.1101/823567.

© 2020 The Authors. The Journal of Physiology © 2020 The Physiological Society

DOI: 10.1113/JP279221

is slightly depolarizing and yet inhibitory in both PV-INs and PCs. Focal GABA uncaging in whole-cell recordings reveal that KCC2 and NKCC1 are functional in both PV-INs and PCs but differentially contribute to transmembrane chloride gradients in their soma and dendrites. Blocking KCC2 function depolarizes the reversal potential of $GABA_A$R-mediated currents in PV-INs and PCs, often beyond firing threshold, showing KCC2 is essential to maintain the inhibitory effect of $GABA_A$Rs. Finally, we show that repetitive 10 Hz activation of $GABA_A$Rs in both PV-INs and PCs leads to a progressive decline of the postsynaptic response independently of the ion flux direction or KCC2 function. This suggests intraneuronal chloride build-up may not predominantly contribute to activity-dependent plasticity of GABAergic synapses in this frequency range. Altogether our data demonstrate similar mechanisms of chloride regulation in mouse hippocampal PV-INs and PCs and suggest KCC2 downregulation in the pathology may affect the valence of GABA signalling in both cell types.

(Received 2 November 2019; accepted after revision 13 January 2020; first published online 3 February 2020)
Corresponding author J. C. Poncer: INSERM UMR-S 1270, 17 rue du Fer à Moulin, 75005 Paris, France.
Email: jean-christophe.poncer@inserm.fr

Introduction

Information representation and processing in the cerebral cortex relies on the dynamic interaction between ensembles of glutamatergic principal neurons and local, highly diversified GABAergic interneurons (Buzsaki, 2010). These interneurons mediate feedforward and/or feedback inhibition onto pyramidal cells (PCs) and thereby control their coordinated activity (Klausberger & Somogyi, 2008). In particular, parvalbumin-expressing interneurons (PV-INs) receive excitatory inputs from both local and distant PCs and in turn provide them with fast perisomatic inhibition (Hu *et al.* 2014). Fast inhibitory signalling by PV-INs controls the timing of PC activity (Pouille & Scanziani, 2001) and plays a major role in the generation of rhythmic activities (Klausberger & Somogyi, 2008; Amilhon *et al.* 2015; Gan *et al.* 2017) as well as the segregation of PCs into functional assemblies (Agetsuma *et al.* 2018). However, in addition to excitatory inputs from PCs, PV-INs also receive GABAergic innervation from local interneurons (Chamberland & Topolnik, 2012), including some specialized in interneuron inhibition (Gulyas *et al.* 1996), as well as long-range projecting interneurons (Freund & Antal, 1988). Although GABAergic synapses formed onto PV-INs share many properties with those impinging onto PCs, input- and cell-specific properties were also reported (Chamberland & Topolnik, 2012). For instance, predominant expression of the $GABA_A$ receptor ($GABA_A$R) α1-subunit confers on PV-INs faster postsynaptic current kinetics as compared to PCs (Gao & Fritschy, 1994; Bartos *et al.* 2002).

Since $GABA_A$Rs are predominantly chloride-permeable channels (Bormann *et al.* 1987), transmembrane chloride gradients also represent a major source of variability for GABA signalling. Cation chloride cotransporters (CCCs) play a critical role in regulating chloride gradients in neurons. Thus, the Na^+–K^+–Cl^- transporter NKCC1 and the K^+–Cl^- transporter KCC2 are secondary active transporters that regulate intraneuronal chloride using the Na^+ and K^+ electrochemical gradients generated by the Na^+/K^+-ATPase (Blaesse *et al.* 2009). Delayed, postnatal KCC2 expression has been shown to contribute to a progressive shift in intraneuronal chloride and the polarity of GABA signalling in cortical PCs *in vitro* (Rivera *et al.* 1999). *In vivo*, GABA was shown to depolarize immature PCs and yet exert a predominantly inhibitory action on their activity (Kirmse *et al.* 2015), due to membrane resistance shunting.

However, much less is known regarding chloride handling in GABAergic interneurons. Thus, the reversal potential of $GABA_A$R-mediated currents (E_{GABA}) was suggested to be more depolarized in unidentified hippocampal stratum radiatum interneurons compared with neighbouring PCs (Patenaude *et al.* 2005). In addition, the driving force of $GABA_A$R-mediated currents was shown to remain unchanged during postnatal maturation in stratum oriens interneurons (Banke & McBain, 2006), but appears to exhibit a hyperpolarizing shift in dentate gyrus basket cells (Sauer & Bartos, 2010). Although most interneuron subtypes were shown to strongly express KCC2 in the adult rat hippocampus (Gulyas *et al.* 2001), how CCC expression or function control the polarity and efficacy of GABA signalling in these cells remains unknown. One difficulty in addressing this question relates to the diversity and bias of experimental approaches used to evaluate the effect of GABA or chloride transport with minimal perturbation of the neuronal integrity. Here, we used a combination of both invasive and non-invasive *in vitro* electrophysiological approaches to compare GABA signalling in mouse CA1 PV-INs and PCs in adult mouse hippocampus. Our results reveal that GABA predominantly exerts depolarizing yet inhibitory actions over

© 2020 The Authors. The Journal of Physiology © 2020 The Physiological Society

both cell types. KCC2 and NKCC1 appear to be functional in both PV-INs and PCs even though the two cell types exhibit different somato-dendritic chloride gradients. Finally, we demonstrate that CCCs do not contribute to activity-dependent depression of $GABA_AR$-mediated transmission upon moderate activation frequency (10 Hz). Together our results demonstrate that, in the adult hippocampus, PV-INs and PCs both rely on CCC activity to maintain inhibitory GABA signalling.

Methods

Ethical approval

All procedures conformed to the International Guidelines on the ethical use of animals and the French Agriculture and Forestry Ministry guidelines for handling animals (decree 87849, licence A 75-05-22), and were approved by the Charles Darwin ethical committee (APAFIS no. 4018-2015111011588776 v7).

Animals

Pvalb$^{tm1(cre)Arbr}$/J mice were crossed with *Gt(ROSA)26 Sor*$^{tm14(CAG-tdTomato)Hze}$/J (Ai14) reporter mice expressing the red fluorescent protein tdTomato. The genetic background of both *Pvalb*$^{tm1(cre)Arbr}$/J and Ai14 mice was C57BL/6J and dual homozygous male or female mice typically aged 35–70 days were used in all experiments. Mice were kept under a 12/12 h light–dark photocycle and provided with food and water *ad libitum*. Since we did not observe sex-dependent differences in the biological parameters tested in this study, data from animals of either sex were grouped.

Immunohistochemistry and imaging

Mice were deeply anaesthetized by intraperitoneal injection of ketamine/xylazine (100/20 mg kg^{-1}) and perfused transcardially with oxygenated ice-cold solution containing (in mM): 110 choline-Cl, 2.5 KCl, 1.25 NaH_2PO_4, 25 $NaHCO_3$, 25 glucose, 0.5 $CaCl_2$, 7 $MgCl_2$, 11.6 ascorbic acid, 3.1 sodium pyruvate (~300 mOsm), equilibrated with 95% O_2–5% CO_2. Brains were removed and fixed for 4–5 h at 4°C with 4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer (PB; pH 7.5) and cryoprotected in 30% sucrose in phosphate-buffered saline (PBS) for an additional 24 h. Coronal, 40 µm-thick sections were cut with a cryotome. Free-floating sections were rinsed in PBS and incubated for 4 h in PBS supplemented with 0.5% Triton X-100 and 5% normal goat serum. They were then incubated for 48 h at 4°C with rabbit polyclonal KCC2 antibody (1:400) diluted in PBS supplemented with 0.1% Triton X-100 and 5% normal goat serum before being rinsed in PBS and incubated overnight at 4°C with biotinylated *Wisteria floribunda* agglutinin (WFA) lectin (1:500). The sections were then rinsed in PBS and incubated for 4 h with donkey anti-rabbit Cy5, rinsed in PB and incubated for 40 min with streptavidin Alexa-488. After rinsing in PB, the sections were mounted with Mowiol/Dabco (25 mg ml^{-1}) and stored at 4°C.

KCC2-immunolabeled sections were imaged with a Leica SP5 confocal microscope using a ×63, 1.40 NA objective with ×2 electronic magnification and Ar/Kr laser set at 488, 561 and 633 nm for excitation of Alexa-488, td-tomato and Cy5, respectively. Stacks of 10 optical sections were acquired at a pixel resolution of 0.12 µm and a z-step of 0.29 µm.

Electrophysiological recordings

Mice were deeply anaesthetized by intraperitoneal injection of ketamine/xylazine (100/20 mg kg^{-1}, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) and transcardially perfused with ice-cold solution containing (in mM): 110 choline-Cl, 2.5 KCl, 1.25 NaH_2PO_4, 25 $NaHCO_3$, 25 glucose, 0.5 $CaCl_2$, 7 $MgCl_2$, 11.6 ascorbic acid, 3.1 sodium pyruvate (~300 mOsm), equilibrated with 95% O_2–5% CO_2. Mice were then decapitated and 350 µm-thick parasagittal brain slices were prepared with a vibrating blade microtome (Microm, Thermo Scientific, Les Ulis, France) in the same ice-cold solution and maintained in a humidified interface chamber saturated with 95% O_2–5% CO_2 for 10 min at 34°C and then at room temperature until use. Artificial cerebrospinal fluid (ACSF) for slice maintenance and recording contained (in mM): 126 NaCl, 26 $NaHCO_3$, 10 D-glucose, 3.5 KCl, 1.6 $CaCl_2$, 1.2 $MgCl_2$, 1.25 NaH_2PO_4. For recordings, slices were transferred into a chamber (BadController V; Luigs & Neumann, Ratingen, Germany) maintained at 32°C and mounted on an upright microscope (BX51WI; Olympus, Rungis, France). Slices were superfused with ACSF at a rate of 2.5 $ml.min^{-1}$. All recordings were performed using a Multiclamp 700B amplifier (Molecular Devices, San Jose, Wokingham, UK).

Loose cell-attached recordings (seal resistance: 15–25 MΩ) were made using 4–6 MΩ borosilicate glass pipettes containing normal ACSF or HEPES-buffered saline containing (in mM): 150 NaCl, 3.5 KCl, 1.6 $CaCl_2$, 1.2 $MgCl_2$, 10 HEPES, pH 7.4 with NaOH (300 mOsm) in the presence of excitatory transmission blockers (10 µM 2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide disodium salt (NBQX) and 50 µM D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid (D-APV)) at a holding potential of 0 mV. Recordings were established by gently pushing the pipette against the membrane of the cell. Signals were filtered at 4 kHz and acquired using pCLAMP software (Molecular Devices) in voltage clamp mode at a sampling rate of 10–20 kHz.

© 2020 The Authors. The Journal of Physiology © 2020 The Physiological Society

Tight cell-attached recordings (Perkins, 2006) were performed in the presence of 10 μM NBQX and 50 μM D-APV under current-clamp configuration ($I = 0$ mode) to evaluate the polarity of $GABA_A$R-mediated potentials. Recording pipettes (4–9 MΩ) were filled with the HEPES-buffered saline. Seal resistance in the cell-attached mode was >4 GΩ. Voltage signals were filtered at 4 kHz and sampled at 10–20 kHz.

For whole-cell recordings, pipettes (3–5 MΩ resistance) were filled with a solution containing (in mM): 115 potassium gluconate, 25.4 KCl, 10 HEPES, 10 EGTA, 1.8 $MgCl_2$, 2 Mg-ATP, 0.4 Na_3-GTP, pH 7.4 (290 mOsm) supplemented with Alexa 594 (20 μM) to check cell morphology. Images of the soma and dendrites were acquired at least 15 min after break-in, using 535 nm excitation light (CoolLED, Andover, UK) to prevent RuBi-GABA uncaging. Cells were voltage-clamped at −60 or −70 mV. Voltage was corrected *post hoc* for liquid junction potential (−11 mV) and voltage drop across the series resistance (<25 MΩ) of the pipette. Currents were filtered at 4 kHz and sampled at 10 kHz.

For gramicidin-perforated patch recordings, the tip of the recording pipette was filled with gramicidin-free solution containing (in mM): 120 KCl, 10 HEPES, 11 EGTA, 1 $CaCl_2$, 2 $MgCl_2$, 35 KOH, 30 glucose adjusted to pH 7.3 with KOH (300 mOsm). The pipette was then backfilled with the same solution containing 100 μg ml^{-1} gramicidin and 20 μM Alexa 488 to verify membrane integrity during the recording. Gramicidin was prepared as a stock solution at 50 mg ml^{-1} in dimethyl sulfoxide. Pipette resistance was 4–5 MΩ. Cells were voltage-clamped at −70 mV. Recordings were started once series resistance was less than 100 MΩ (52.5 ± 24.7 MΩ for PV-INs ($n = 10$) and 69.1 ± 23.2 MΩ for PCs ($n = 16$)). The Donnan potential between the pipette solution and cell cytoplasm was measured (Kim & Trussell, 2007) after spontaneous membrane rupture (11.7±2.2 mV; $n = 4$). The Donnan potential was partly offset by a liquid junction potential of −4 mV. Therefore, the holding potential in gramicidin-perforated recordings reads 7.7 mV more hyperpolarized than the actual membrane potential. Potentials were corrected *post hoc* for this residual potential and voltage drop across the series resistance of the pipette. Spontaneous action potentials (APs) and resting membrane potential (V_m) were monitored under current clamp configuration ($I = 0$ mode) while E_{GABA} was measured by RuBi-GABA photolysis under voltage clamp. V_m was estimated by averaging membrane potential every 500 ms for 30–60 s in normal ACSF. Membrane potential in the presence of drugs for photolysis were similarly computed over 30–60 s (Fig. 6*A*). The threshold for action potential initiation was determined from the first peak in the third derivative of action potential waveforms averaged from >4 APs (Henze & Buzsaki, 2001). Currents were filtered at 10 kHz and sampled at 10–20 kHz.

Photolysis

Photolysis of RuBi-GABA (15 μM) onto PV-INs or PCs was performed in the presence of 10 μM NBQX, 50 μM D-APV, 2 μM CGP55845 and 1 μM tetrodotoxin (TTX). A 405 nm laser diode beam (Deepstar, Omicron, Photon Lines, Saint-Germain-en-Laye, France) conducted through a multimode optic fibre and alignment device (Prairie Technologies, Middleton, WI, USA) was set to generate a 3–5 μm spot in the objective focus and directed to the soma or distal dendrites of the recorded neurons. The power of the laser head output was controlled using Omicron Laser Controller v2.97, while trigger and pulse duration were set using pCLAMP software and a Digidata controller. Photolysis was induced by a 0.5–1 ms pulse at 10 mW on the soma or 3–5 ms at 10 mW on distal dendrites. Series of 15 s voltage steps with a 5 mV increment were applied to the pipette with an inter-episode interval of 40 s. Laser pulses were delivered 12 s after the onset of the voltage step to allow for stabilization of the holding current. The amplitude of GABA-evoked currents was computed as the difference between the current measured over a 4 ms window centred on the peak and the baseline current averaged over 3 ms prior to the laser flash. The distance from soma for dendritic uncaging was measured offline with NeuronJ (Meijering *et al.* 2004), based on Alexa 594 fluorescence imaging of the recorded neuron.

Drug application

Isoguvacine (100 μM; Tocris Bioscience, Bristol, UK) was dissolved in normal ACSF supplemented with 2 μM Alexa 488 to detect regions puffed through a patch pipette using a Picosplitzer III (5 s at 10 psi). All other drugs were bath applied: NBQX and D-AP5 were from Hello Bio (Bristol, UK). Isoguvacine, RuBi-GABA trimethylphosphine, CGP55845 and VU0463271 were from Tocris Bioscience. TTX was from Latoxan (Portes-lès-Valence, France). All other drugs were from Sigma-Aldrich France. CGP55845, VU0463271 and bumetanide were dissolved in dimethyl sulfoxide for stock solutions.

Data analysis

Electrophysiological data analysis was performed offline using Clampfit 10 (Molecular Devices) and custom routines written in Igor Pro 6 (WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA).

Statistical analysis

The results are presented as means ± standard deviation throughout the paper and in all figures. For

© 2020 The Authors. The Journal of Physiology © 2020 The Physiological Society

statistical analyses, non-parametric Mann–Whitney or Wilcoxon signed-rank tests were used unless Shapiro–Wilk normality test was passed and Student's *t* test could be used. Multiple linear regression analysis was performed using SigmaPlot 12.5 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA). χ^2 tests were computed using Microsoft Excel spreadsheets. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

KCC2 expression in hippocampal parvalbumin interneurons

Although the expression and function of CCCs are well characterized in hippocampal principal neurons, whether they are expressed and functional in GABAergic interneurons remains largely unexplored. We used immunohistochemistry in *Pvalb*$^{tm1(cre)Arbr/J}$*::Ai14* mice to investigate KCC2 expression in mouse hippocampal parvalbumin interneurons (PV-INs) (Le Roux *et al.*, 2013).

In all hippocampal subfields, KCC2 expression was observed in td-tomato-positive interneurons (Fig. 1*A*). As in PCs, KCC2 immunostaining in PV-INs was mostly pericellular, likely reflecting predominant membrane expression (Fig. 1*B*). However, KCC2 expression in PV-INs was sometimes difficult to distinguish from that in neighbouring PCs. To circumvent this problem, we used extracellular matrix staining to precisely visualize PV-IN contours. Hippocampal PV-INs' somata and proximal dendrites are wrapped by a chondroitin sulfate proteoglycan-rich extracellular matrix, called the perineuronal net (PNN) (Hartig *et al.* 1992). Thus using specific staining of PNNs with WFA, KCC2 immunostaining in PV-INs could be distinguished from that in adjacent principal neurons as it was surrounded by WFA staining, further confirming KCC2 expression in PV-INs (Fig. 1*B*).

These results support the conclusion that KCC2 protein is expressed at the membrane of PV-INs in the adult mouse hippocampus.

Net effect of $GABA_AR$ activation on CA1 pyramidal neurons and parvalbumin interneurons

We next asked whether CCCs are functional in CA1 PV-INs and how they influence $GABA_AR$-mediated signalling in these cells. Loose cell-attached recordings allow detection of action potentials from identified neurons with minimal perturbation of their physiology (Llano & Marty, 1995). We first used this approach to

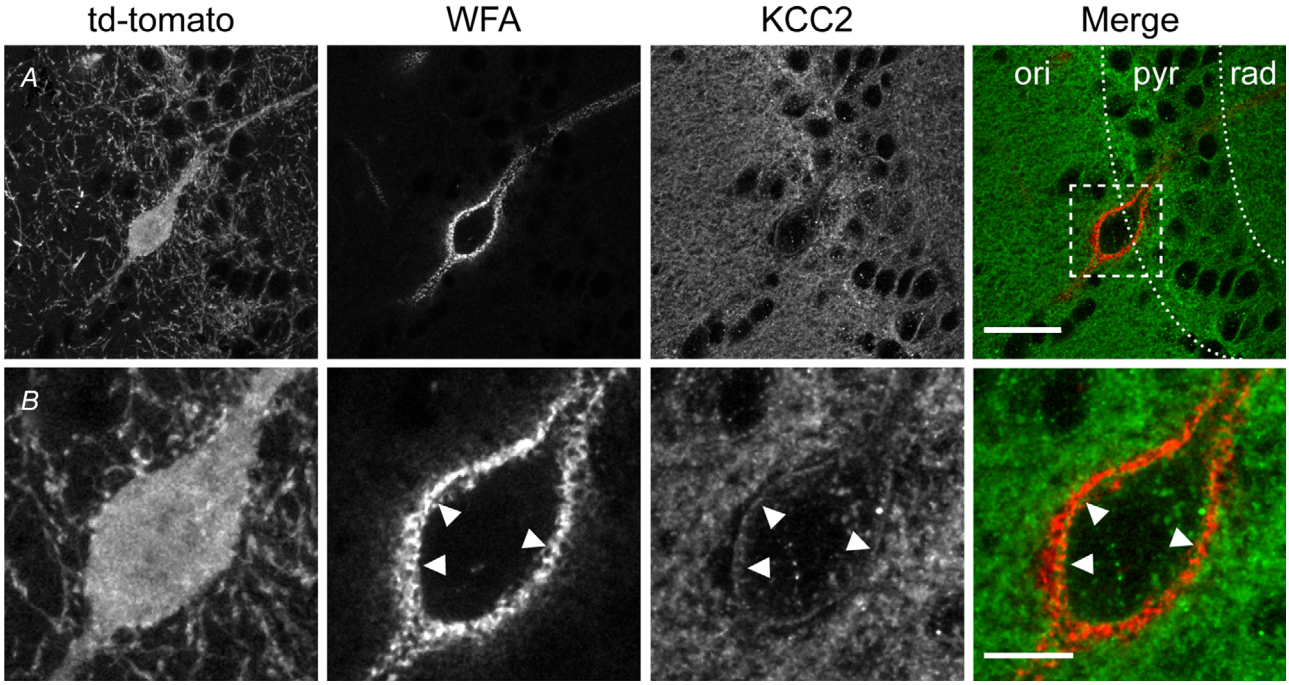


Figure 1. KCC2 labelling of hippocampal CA1 parvalbumin interneurons
A, representative micrograph (maximum projection of 10 confocal sections over 2.6 μm) of area CA1 of an adult *Pvalb*$^{tm1(cre)Arbr/J}$*::Ai14* mouse hippocampal section immunostained for KCC2 (green) and WFA lectin (red), showing td-tomato expression in a PV-IN surrounded by WFA staining on the soma and proximal dendrites. Right, merged images of KCC2 and WFA stainings. Scale, 30 μm. *B*, magnified region boxed in *A*, showing KCC2 immunostaining in td-tomato-expressing PV-IN lies just underneath the perineuronal net stained with WFA (arrowheads). Scale, 10 μm.

© 2020 The Authors. The Journal of Physiology © 2020 The Physiological Society

evaluate the excitatory *vs.* inhibitory nature of GABA transmission in CA1 PV-INs and neighbouring pyramidal neurons (PCs). The effect of $GABA_AR$ activation was tested by locally puffing the $GABA_AR$ agonist isoguvacin (100 μM, 5 s) onto the soma of the recorded cell. In order to prevent the influence of polysynaptic excitatory postsynaptic potentials, recordings were performed in the presence of AMPA and NMDA receptor antagonists. Under these conditions, however, only a few (5 of 27) PV-INs exhibited spontaneous firing (Fig. 2*A*). Out of 27 recorded PV-INs, isoguvacine induced firing in one, blocked firing in five and had no detectable effect in 21 interneurons. The KCC2-specific antagonist VU0463271 (10 μM) significantly increased the proportion of PV-INs that were excited or inhibited by isoguvacine (χ^2 test, $0.01 < P < 0.02$) whereas the NKCC1 antagonist bumetanide (10 μM) had no significant effect on the proportions of each type of response, when applied either alone (χ^2 test, $0.05 < P < 0.1$) or in the presence of VU0463271 (χ^2 test, $0.95 < P < 0.98$). These results suggest the effect of $GABA_A$ receptor activation is predominantly inhibitory in PV-INs and is influenced by the function of KCC2 but not NKCC1.

In neighbouring PCs, isoguvacine had little effect on firing (5 of 23 cells), mostly owing to the fact that most of them were silent (18 of 23 cells) prior to isoguvacine application, making it difficult to assess the inhibitory or excitatory nature of GABA signalling. Again, bumetanide had no significant effect on the proportions of PCs excited (1 of 10 cells), inhibited (1 of 10 cells) or unaffected by isoguvacine (χ^2 test, $0.2 < P < 0.8$), whereas VU0463271 induced a large increase in the proportion of excited

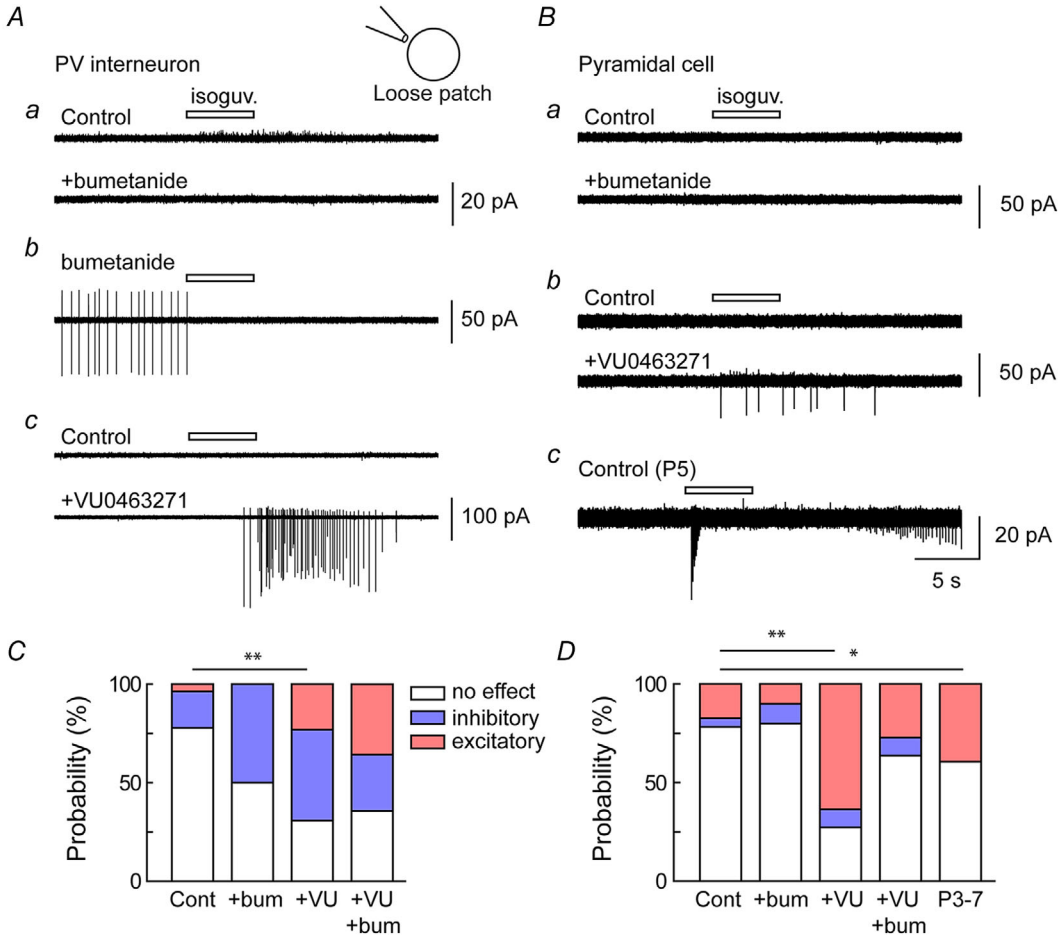


Figure 2. Excitatory and inhibitory actions of $GABA_A$ receptor activation in CA1 parvalbumin interneurons and pyramidal cells
Aa, representative sections of recordings in loose patch mode of a CA1 PV-IN upon brief, focal somatic application of isoguvacine (100 μM, white bar), before and during application of the NKCC1 antagonist bumetanide (10 μM). *b*, same as in *a* in another PV-IN during bumetanide application. *c*, same as in *a* and *b*, before and during application of the KCC2 antagonist VU0463271 (10 μM). *Ba* and *b*, recordings as in *Aa* and *c* from CA1 PCs in P30–P40 mice. *c*, recording showing the effect of somatic isoguvacine application on a CA1 PC from a P5 mouse. *C*, summary graph showing the proportions of each type response (excitatory, inhibitory or none) recorded upon isoguvacine application in PV-INs. *D*, same as *C* for recordings from PCs. χ^2 test: $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.02$.

© 2020 The Authors. The Journal of Physiology © 2020 The Physiological Society

neurons (7 of 11 cells, χ^2 test, $0.01 < P < 0.02$; Fig. 2*D*). In contrast, in slices from younger (3–7 days old) animals, the effect of isoguvacine was significantly more excitatory than in slices from adult mice (χ^2 test, $0.02 < P < 0.05$) and triggered firing in 26 out of 66 neurons under control conditions, suggesting GABA signalling in PCs was clearly excitatory at this age.

Altogether, these results suggest KCC2 is functional in both CA1 PCs and PV-INs and influences the valence of GABA signalling. However, the high proportion of silent neurons under our recording conditions makes it difficult to draw firm conclusions regarding the polarity of GABA transmission in these cells under physiological conditions.

Tight-seal, cell-attached recordings provide another, minimally invasive approach to detect the polarity of synaptic potentials without rupturing the cell membrane and perturbing transmembrane ionic gradients (Perkins, 2006). In particular, gigaseal recordings allow a fairly reliable measurement of the polarity (but not the actual amplitude) of synaptic potentials, as well as of resting membrane potential, provided that series resistance is high relative to patch and cell membrane resistances (Mason *et al.* 2005; Perkins, 2006). We recorded currents evoked by $GABA_AR$ activation with isoguvacine in gigaseal mode from both CA1 PV-INs and PCs (Fig. 3*A*). In both cell types, isoguvacine-induced potentials were predominantly depolarizing (5 of 7 and 5 of 6 cells, respectively). This proportion was similar to recordings from immature (P3–P7) CA1 pyramidal neurons (6 of 9 cells, Fig. 3*B*). Together, these results suggest that, at least in the absence of glutamatergic drive, both CA1 PCs and PV-INs are predominantly depolarized upon $GABA_AR$ activation, even though a significant fraction are functionally inhibited, likely due to shunting of their membrane resistance (Staley & Mody, 1992).

KCC2-mediated chloride extrusion in CA1 parvalbumin interneurons

Transmembrane chloride transport can be directly estimated from whole-cell recordings of GABA-evoked currents while clamping somatic chloride concentration to 29 mM (Khirug *et al.* 2008; Gauvain *et al.* 2011). The gradient of the reversal potential of $GABA_AR$-mediated currents (E_{GABA}) along the somato-dendritic membrane then reflects actual transmembrane chloride extrusion. We compared E_{GABA} gradients in CA1 PV-INs and PCs using local photolysis of RubiGABA (15 µM, 0.5–5 ms laser pulse, see Methods). As in other cortical neurons (Khirug *et al.* 2008; Gauvain *et al.* 2011), E_{GABA} in PV-INs, was always more depolarized for somatically evoked currents, as compared to currents evoked onto dendrites 50–250 µm away from the soma (Fig. 4). This somato-dendritic gradient (ΔE_{GABA}), however, was significantly steeper in neighbouring PCs as compared with PV-INs (-21.1 ± 5.7 *vs.* -12.6 ± 2.8 mV/100 µm; 11 dendritic sites in 8 cells and 17 dendritic sites in 9 cells, respectively, $P < 0.001$; Fig. 5*A* and *B*), suggesting chloride extrusion along dendrites may be less effective in PV-INs. However, the effect of KCC2 and NKCC1 blockers on ΔE_{GABA} was not significantly different between the two cell types. Thus, the KCC2-specific antagonist VU046321 produced similar reduction in the somato-dendritic gradient of E_{GABA} in PV-INs ($-58.5 \pm 11.6\%$, 15 dendritic sites in 9 cells) and PCs ($-57.1 \pm 8.1\%$, 9 dendritic sites in 7 cells, $P = 0.770$; Figs 4*B* and 5*C*). Further application of the NKCC1 antagonist bumetanide also produced similar increase in ΔE_{GABA} in PV-INs and PCs ($+41.5 \pm 23.9\%$ and $+45.7 \pm 28.2\%$, respectively, as compared to VU046321 only; $P = 0.67$, Fig. 5*C*). This suggests NKCC1 activity may significantly contribute to

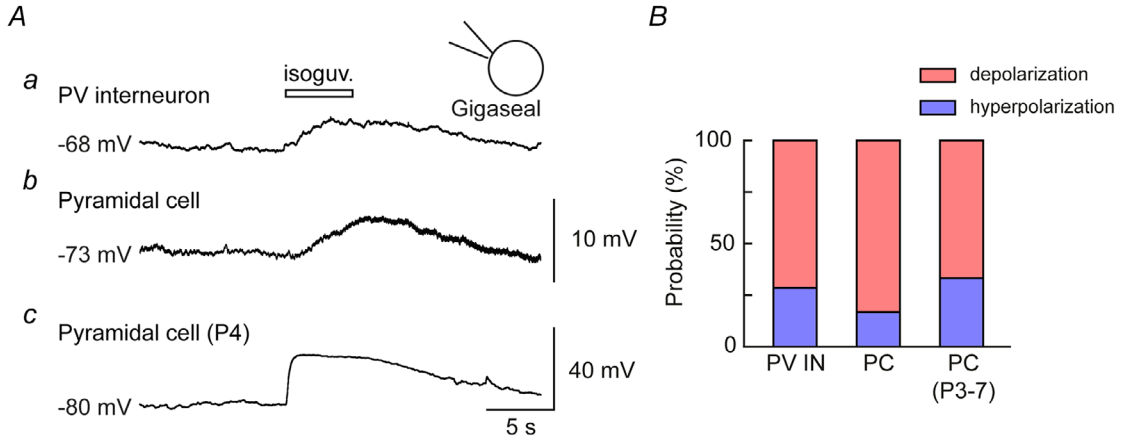


Figure 3. Polarity of $GABA_AR$-mediated potentials in CA1 parvalbumin interneurons and pyramidal cells
A, representative sections of recordings in gigaseal patch mode of a CA1 PV-IN from a P46 mouse (*a*) and a PC from a P33 (*b*) or P4 (*c*) mouse upon brief, focal somatic application of isoguvacine (100 µM, white bar). *B*, summary graph showing the proportions of each type of response (depolarizing, hyperpolarizing) recorded upon isoguvacine application in each cell type.

© 2020 The Authors. The Journal of Physiology © 2020 The Physiological Society

transmembrane chloride gradients in both cell types, at least upon KCC2 blockade. Altogether, these observations demonstrate chloride extrusion is more efficient along the dendrites of PCs as compared with PV-INs and suggest mechanisms other than CCC function may contribute to this difference.

Remarkably, although somatic chloride concentration was expected to be clamped by the internal solution of the pipette, somatic E_{GABA} was more hyperpolarized than that estimated by the Nernst equation (−41.3 mV, dashed line in Fig. 5*D*) and more so in PV-INs than in PCs (53.1 ± 3.4 *vs.* 46.5 ± 2.5 mV, n = 10 and 8 cells, respectively, P = 0. 003; Fig. 5*D*). This suggests that active chloride transport at the plasma membrane (i) may generate intracellular chloride gradients, such that actual transmembrane gradients do not directly reflect the mean intracellular and extracellular concentrations, and (ii) is more efficient in the soma of PV-INs than in PCs. Consistent with this hypothesis, somatic E_{GABA} was more depolarized upon application of VU0463271 in PV-INs than in PCs (+4.9 ± 1.7 *vs.* +2.8 ± 1.6 mV, n = 9 and 7 cells, respectively, P = 0.039; Fig. 5*E*). Further application of bumetanide, however, had no significant effect on E_{GABA} in either cell type, suggesting NKCC1 does not contribute significantly to somatic transmembrane chloride gradients when intracellular chloride concentration is high (−0.43 ± 1.1 *vs.* −0.71 ± 1.9 mV, n = 8 and 7 cells, respectively, P = 0.95; Fig. 5*E*). Altogether, our results demonstrate that KCC2 and NKCC1 are functional in PV-INs and PCs and contribute to establish steady-state transmembrane chloride gradients. The relative contribution of each transporter to somatic transmembrane gradients, however, differ between PV-INs and PCs.

In order to assess both E_{GABA} and V_m while minimizing perturbation of intracellular anion homeostasis, we next used gramicidin-perforated patch recordings. First, we measured V_m and tested the effect of pharmacologically blocking the excitatory drive onto CA1 PV-INs and PCs, as in experiments shown in Figs 2 and 3. Whereas all PV-INs were spontaneously firing at rest (frequency: 4.0 ± 5.2 Hz, n = 14 cells), application of AMPA and NMDAR blockers hyperpolarized their membrane potential by 3.5 ± 2.2 mV (Fig. 6*A* and *Bb*). Most PCs (12 out of 15) were also spontaneously firing but had lower firing frequency (0.23 ± 0.3 Hz, $P < 0.001$) and threshold (P = 0.006) (Fig. 6*A* and *Bc*). Glutamate receptor antagonists also hyperpolarized CA1 PCs, yet to a lesser extent than PV-INs (0.96 ± 1.2 mV, P = 0.001, n = 13 cells of each type, Fig. 6*Bb*), consistent with the latter receiving massive excitatory drive as compared with neighbouring PCs (Gulyas *et al.* 1999; Takacs *et al.* 2012). Remarkably, these values of V_m measured in the presence of glutamate receptor antagonists were very similar to those derived

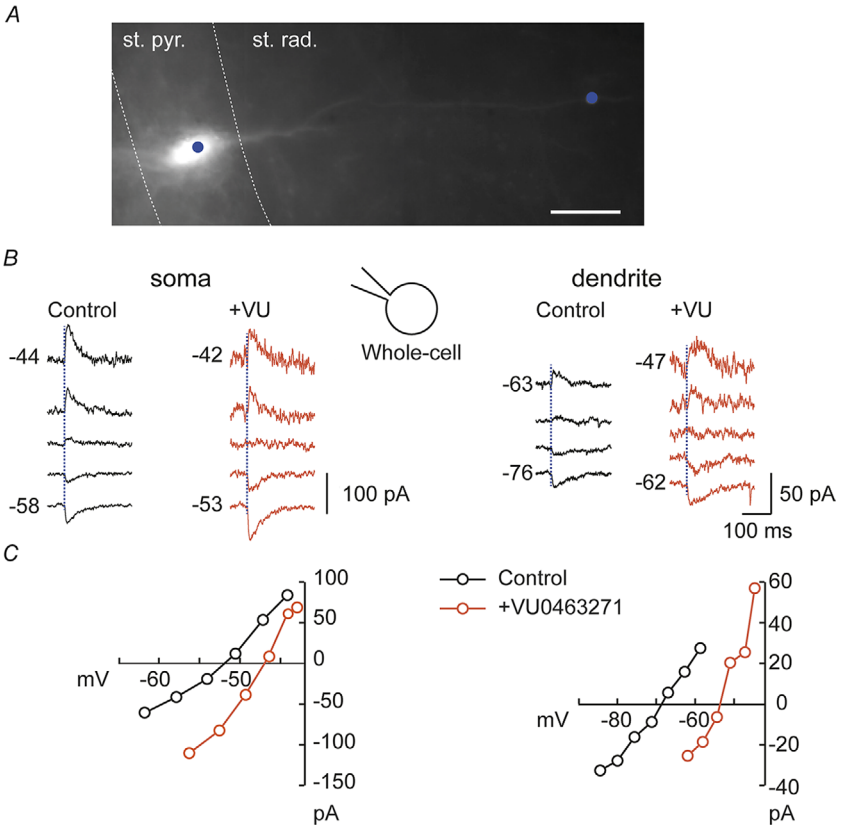


Figure 4. Contribution of KCC2 to transmembrane chloride extrusion in a CA1 parvalbumin interneuron
A, fluorescence micrograph of a CA1 PV-IN from a P37 mouse hippocampal slice, recorded in whole-cell mode and filled with Alex594. The blue circles represent the position and size of the laser beam used for focal RubiGABA photolysis. Scale, 20 μm. *B*, currents evoked at varying potentials by focal somatic (left) or dendritic (right) photolysis of RubiGABA in the cell shown in *A*, before (black) and during (red) application of VU0463271 (10 μM). Numbers to the right represent holding potentials corrected for liquid junction potential and voltage drop across the pipette resistance. *C*, current–voltage relations from recordings shown in *B* showing the different reversal potentials of RubiGABA-evoked currents in the soma *vs.* dendrites and their depolarizing shift upon KCC2 blockade.

© 2020 The Authors. The Journal of Physiology © 2020 The Physiological Society

from gigaseal recordings (-71.6 ± 2.1 *vs.* -74.9 ± 5.2 mV ($n = 7$) for PV-INs and -74.2 ± 2.5 *vs.* -74.9 ± 4.5 mV ($n = 8$) for PCs; Fig. 3). $GABA_A$R-mediated currents were then evoked using focal uncaging of RubiGABA, as above, and E_{GABA} was derived from current–voltage relations of somatically evoked currents (Fig. 6*C* and *D*). E_{GABA} was significantly more depolarized in PV-INs as compared with PCs (-64.1 ± 7.2 *vs.* -71.7 ± 3.0 mV, $P = 0.003$, $n = 10$ and 16 cells, respectively; Fig. 6*E*). However, due to more depolarized V_m in PV-INs (Fig. 6*Ba*), the driving force of $GABA_A$R-mediated currents at rest was similar in the two cell types (3.8 ± 7.0 *vs.* 1.7 ± 3.7 mV, $n = 10$ and 13 cells, respectively; $P = 0.34$; Fig. 6*F*). Also consistent with gigaseal recordings, E_{GABA} was slightly more depolarized than V_m both in PV-INs and PCs. Application of VU0463271 depolarized somatic E_{GABA} in both cell types (by 12.5 ± 2.8 and 16.1 ± 4.2 mV, in PV-INs ($n = 3$) and PCs ($n = 8$), respectively; Fig. 6*G*), whereas further application of bumetanide only slightly hyperpolarized E_{GABA}. This suggests that, under steady-state conditions, E_{GABA} in both PV-INs and PCs is moderately depolarized as compared with V_m and predominantly influenced by the activity of KCC2, whereas NKCC1's contribution is minor. Importantly, however, although GABA may have depolarizing actions in both cell types, its effect is mostly shunting as E_{GABA} is more hyperpolarized than the action potential threshold (Fig. 6*H*). Suppressing KCC2 activity may, however, be sufficient to depolarize E_{GABA} beyond this threshold, thereby promoting firing, as observed in Fig. 2.

Dynamic regulation of GABA signalling in CA1 parvalbumin interneurons and PCs

Repetitive activation of $GABA_A$Rs has been shown in a variety of neurons to result in activity-dependent depression. This depression was attributed to intracellular chloride build-up (Thompson & Gahwiler, 1989*a*; Staley & Proctor, 1999; Jedlicka *et al.* 2011) or to receptor desensitization (Thompson & Gahwiler, 1989*c*; Jones &

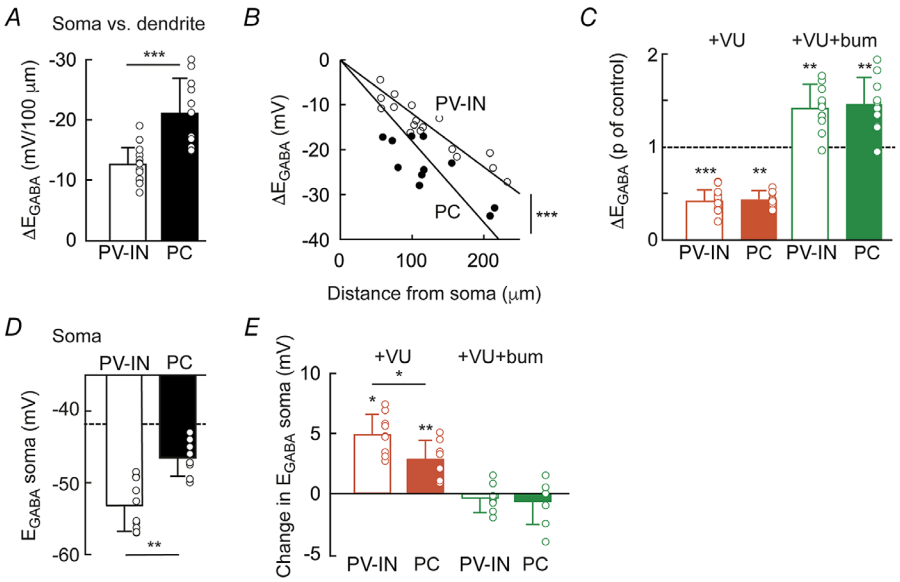


Figure 5. Contribution of KCC2 and NKCC1 to somato-dendritic chloride gradients compared in CA1 parvalbumin interneuron and pyramidal cells
A, summary graph showing E_{GABA} somatodendritic gradient (ΔE_{GABA}) between soma and dendrites normalized by the distance from somatic to dendritic photolysis locations. PV-IN: $n = 17$ dendritic sites in 9 cells; PC: $n = 11$ dendritic sites in 8 cells. Mann–Whitney test: $^{***}P < 0.001$. *B*, somatodendritic E_{GABA} gradient plotted against the distance from somatic to dendritic photolysis locations with superimposed linear regression, showing steeper relation in PCs compared with PV-INs. Same data as in *A*, multiple regression test: $^{***}P < 0.001$. *C*, change in ΔE_{GABA} upon sequential KCC2 (red) and KCC2+NKCC1 blockade (green) by VU0463271 and bumetanide, respectively. The values are normalized to those of the preceding condition (control for VU0463271, VU0463271 for VU0463271+bumetanide). Wilcoxon signed-rank test: $^{**}P < 0.01$ and $^{***}P < 0.001$, respectively. No significant difference was observed in PC *vs.* PV-INs. Same recordings as in *A* and *B*. *D*, reversal potential (E_{GABA}) of currents evoked by somatic RubiGABA uncaging in PV-INs and PCs. Same data as in *A*–*C*. Dashed line: estimated E_{Cl} based on Nernst equation. Mann–Whitney test: $^{**}P < 0.01$. *E*, change in somatic E_{GABA} upon sequential KCC2 (red) and KCC2+NKCC1 blockade (green) by VU0463271 and bumetanide, respectively. The values are normalized to those of the preceding condition (control for VU0463271, VU0463271 for VU0463271+bumetanide). VU0463271 depolarized E_{GABA} more in PV-INs than in PCs. However, further addition of bumetanide had no significant effect. Wilcoxon rank signed-rank test: $^{*}P < 0.05$ and $^{**}P < 0.01$, respectively. *For PV-INs *vs.* PCs, Mann–Whitney test, $P < 0.05$.

© 2020 The Authors. The Journal of Physiology © 2020 The Physiological Society

Westbrook, 1995) or a combination of both. We compared the contribution of these mechanisms upon repetitive activation of $GABA_A$Rs in CA1 PV-INs and neighbouring PCs. In order to exclude presynaptic mechanisms that may contribute to short-term, activity-dependent changes in GABA release (Thompson & Gahwiler, 1989*c*; Zucker & Regehr, 2002), $GABA_A$R activation was achieved by repetitive (10 Hz), focal uncaging of RubiGABA onto the soma or dendrites of neurons recorded in gramicidin-perforated patch mode (Fig. 7*A*). We then compared the dynamics of $GABA_A$R-mediated currents evoked while holding cells below (−8.2 ± 3.3 mV) or above (+9.4 ± 3.6 mV) their reversal potential, such that the absolute amplitude of the first response was similar

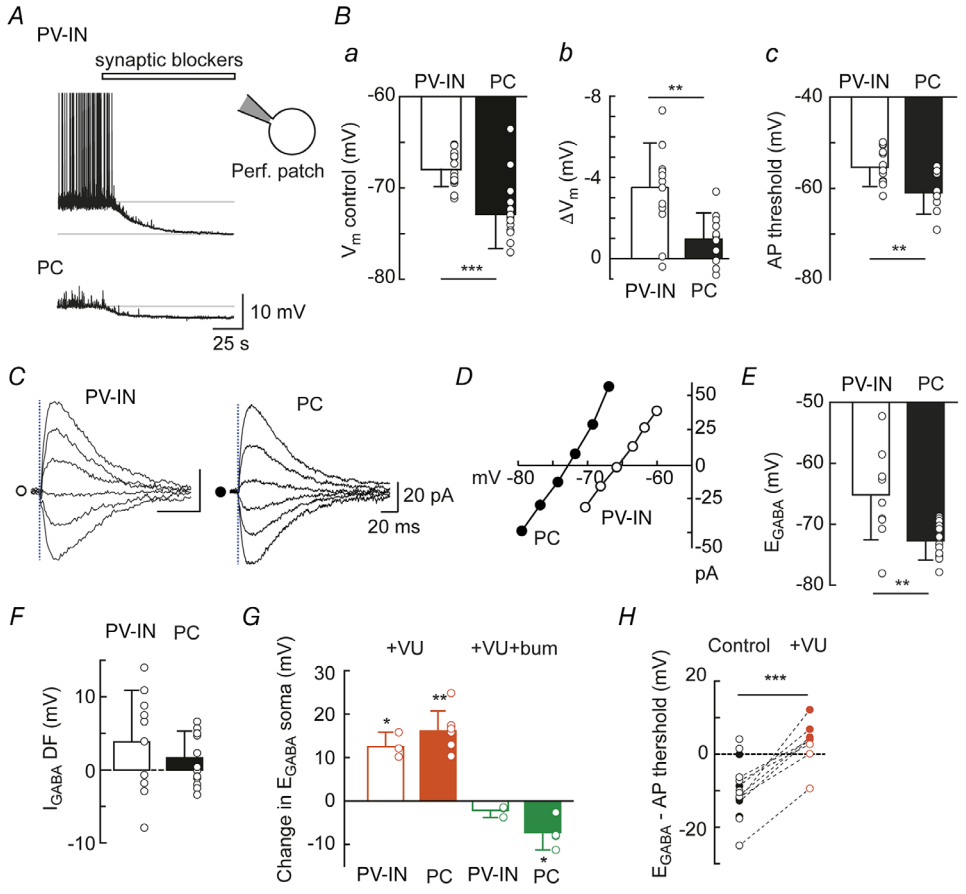


Figure 6. Reversal potential and driving force of GABA currents compared in CA1 parvalbumin interresting neurons and pyramidal cells

A, representative current clamp recordings from a CA1 PV-IN (top) and PC (bottom) in gramicidin-perforated patch mode, showing the effect of synaptic receptor antagonists (APV, NBQX and CGP55845) and TTX (white bar) on membrane potential. Note that the PV-IN but not the PC shows spontaneous firing prior to application of the blockers. *Ba*, resting membrane potential measured in 15 CA1 PV-INs and 15 PCs prior to application of synaptic blockers. Mann–Whitney test: $^{***}P < 0.001$. *b*, change in membrane potential (ΔV_m) upon application of synaptic blockers in the same cells as in *a*. Mann–Whitney test: $^{**}P < 0.01$. *c*, action potential threshold measured in spontaneously firing PV-INs ($n = 15$) and PCs ($n = 9$). Mann–Whitney test: $^{**}P < 0.01$. *C*, currents evoked at varying potentials by focal somatic photolysis of RubiGABA in a PV-IN (left) and a PC (right). The dotted line represents the timing of photolysis. *D*, corresponding current–voltage relation for the recordings shown in *C*. Open circles, PV-IN. Filled circles, PC. *E*, summary graphs showing the reversal potential of somatically evoked $GABA_A$R-mediated currents in 10 CA1 PV-INs and 16 PCs. Mann–Whitney test: $^{**}P < 0.01$. *F*, estimated driving force of somatic $GABA_A$R-mediated currents computed by subtracting V_m from E_{GABA}, showing $GABA_A$Rs have slightly depolarizing actions in both PV-INs and PCs. *G*, summary graph showing the change in somatic E_{GABA} upon sequential KCC2 (red) and KCC2+NKCC1 blockade (green) by VU0463271 and bumetanide, respectively. The values are normalized to those of the preceding condition (control for VU0463271, VU0463271 for VU0463271+bumetanide). Addition of bumetanide after VU0463271 had no significant effect on somatic E_{GABA} in either PV-INs ($n = 3$) or PCs ($n = 4$). Paired *t* test: $^{*}P < 0.05$; Wilcoxon signed rank test: $^{**}P < 0.01$. *H*, difference between E_{GABA} and firing threshold for PV-INs (open circles) and PCs (filled circles), before (black) and during (red) application of VU0463271. Dotted lines represent paired data used for statistical comparison (all cells pooled). Paired *t* test: $^{***}P < 0.001$.

© 2020 The Authors. The Journal of Physiology © 2020 The Physiological Society

for inward and outward currents. Both in PV-INs and in PCs, the peak amplitude of $GABA_AR$-mediated currents decayed with very similar kinetics during the train, independent of their polarity (soma: $\tau_{inward} = 0.11 \pm 0.03$ *vs.* 0.17 ± 0.12 s^{-1}, Mann–Whitney test $P = 0.291$; $\tau_{outward} = 0.10 \pm 0.04$ *vs.* 0.13 ± 0.03 s^{-1}, Mann–Whitney test $P = 0.232$; $n = 6$ and 11 cells, respectively) and their site of initiation (soma *vs.* dendrite; $0.242 < P < 0.695$; Fig. 7*B*). This observation suggests the mechanisms involved in the activity-dependent depression of $GABA_AR$-mediated currents during a train of 10 Hz stimulation is unlikely to primarily involve changes in transmembrane ionic gradients. Consistent with this conclusion, application of the KCC2 antagonist VU0463271 had no detectable effect on the decay of outward $GABA_AR$-mediated currents, either in PV-INs ($\tau_{outward} = 0.13 \pm 0.04$ *vs.* 0.11 ± 0.06 s^{-1}, paired *t* test $P = 0.363$; $n = 2$ cells) or in PCs ($\tau_{outward} = 0.11 \pm 0.02$ *vs.* 0.11 ± 0.01 s^{-1}, paired *t* test $P = 0.848$; $n = 4$ cells; Fig. 7*C*). We conclude that, at least in our range of current amplitude and stimulation frequency, activity-dependent depression of $GABA_AR$-mediated currents is largely independent of CCC function and does not reflect changes in transmembrane chloride gradients.

Discussion

We have used a combination of approaches to assess and compare the polarity of GABA signalling in adult mouse CA1 hippocampal PCs and PV-INs. Our results reveal that the basic mechanisms of steady-state chloride handling controlling GABA transmission are similar in both neuronal types, with a predominantly depolarizing yet inhibitory effect under resting *in vitro* conditions. PV-INs and PCs, however, show different behaviours upon intracellular chloride loading, which may reflect differential distribution, regulation or efficacy of cation–chloride cotransport along their somato-dendritic axis as well as electrotonic properties. Finally, we have shown that activity-dependent depression of GABAR-mediated transmission is largely independent of the polarity of the evoked currents and the activity of the transporters. This suggests this form of plasticity may not predominantly involve postsynaptic chloride loading, at least under moderate regimes of synaptic activation.

Evaluating the net effect of $GABA_AR$ activation in neurons is technically challenging as all experimental approaches may introduce some bias. Classical electrophysiological techniques may induce cell dialysis, compromise membrane integrity or underestimate Donnan potentials between pipette solution and the neuronal cytoplasm (Marty & Neher, 1995). Non-invasive approaches, such as loose-patch recordings, are then often used to assess the polarity and/or the net effect of $GABA_AR$ activation on neuronal activity (Deidda *et al.* 2015; Lozovaya *et al.* 2019). This approach, however, is only valid when recorded cells display spontaneous firing. As focal application of $GABA_AR$ agonists may affect the activity of neighbouring neurons and subsequently modify that of the recorded neuron, we performed these recordings in

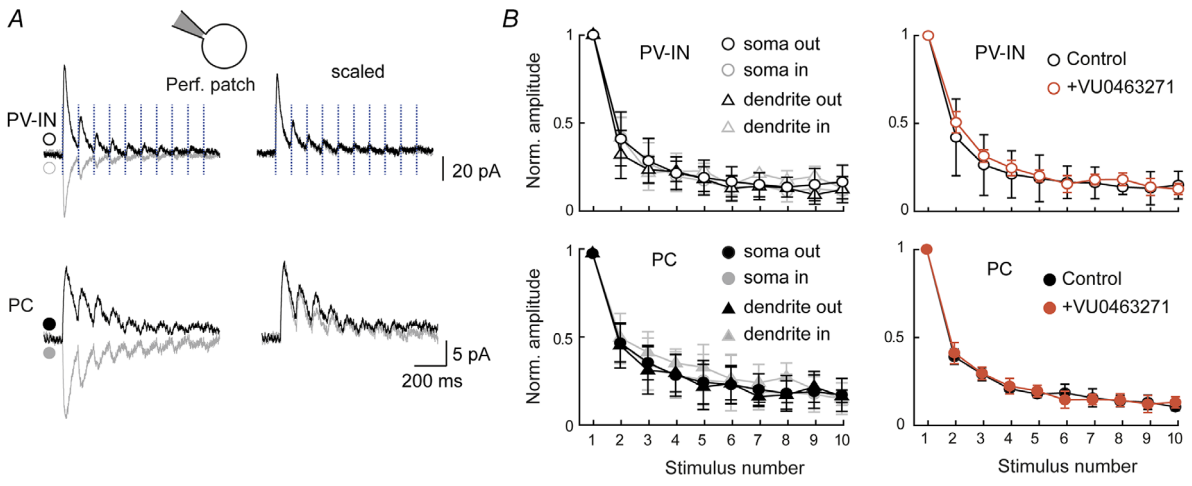


Figure 7. Dynamics of $GABA_AR$-mediated currents in CA1 parvalbumin interneurons and pyramidal cells
A, representative recordings of currents evoked by 10 Hz somatic photolysis of RubiGABA in a CA1 PV-IN and a PC recorded in gramicidin-perforated patch mode and held at potentials above (black) or below (grey) E_{GABA} (PV-IN: −60 and −80 mV; PC: −60 and −77 mV). *B*, summary graphs showing peak current amplitudes normalized to the peak amplitude of the first current, during a train of RubiGABA photolysis on the soma (circles) or dendrites (triangles) of PV-INs (soma: $n = 6$, dendrites: $n = 3$, open symbols) and PCs (soma: $n = 11$, dendrites: $n = 4$, filled symbols). *C*, same as in *B* showing the lack of effect of VU0463271 (10 μM, red symbols) on the decay of the peak amplitude of $GABA_AR$-mediated currents during a 10 Hz somatic RubiGABA photolysis (PV-INs, $n = 2$; PCs, $n = 4$).

© 2020 The Authors. The Journal of Physiology © 2020 The Physiological Society

the presence of glutamate receptor antagonists (Fig. 2). In the absence of excitatory drive, however, most recorded neurons (either PV-INs or PCs) did not exhibit spontaneous firing and the effect of $GABA_AR$ activation could not be tested. These experiments nevertheless showed that GABA agonists mostly inhibit spontaneously firing PV-INs. Cell-attached current clamp recordings provide another, minimally invasive approach to evaluate the polarity of synaptic potentials as well as resting membrane potential (Perkins, 2006; Kirmse *et al.* 2015). Such recordings showed that $GABA_AR$ activation mostly induces membrane depolarization in both PV-INs and PCs in adult mouse hippocampus, as well as in PCs from immature (P3–7) hippocampus. This observation is supported by gramicidin-perforated patch recordings, which revealed a depolarizing driving force for $GABA_AR$-mediated currents (Fig. 6). Although E_{GABA} was more depolarized in CA1 PV-INs than in neighbouring PCs, the driving force of $GABA_AR$-mediated currents was remarkably similar, due to a more depolarized resting membrane potential in PV-INs. This observation is consistent with previous recordings from presumptive basket (fast spiking) and pyramidal (regular spiking) neurons in both amygdala and cortex (Martina *et al.* 2001). Importantly, under control conditions, E_{GABA} was less depolarized than action potential threshold (Fig. 6*H*), consistent with a predominantly shunting and inhibitory effect. This observation is in line with earlier studies on cerebellar interneurons (Chavas & Marty, 2003), unidentified hippocampal interneurons (Verheugen *et al.* 1999; Banke & McBain, 2006) as well as presumptive dentate gyrus PV-INs (Sauer & Bartos, 2010).

Very few studies have explored CCC expression in cortical interneurons and data are somewhat controversial, possibly due to the differential expression of distinct isoforms (Uvarov *et al.* 2007; Markkanen *et al.* 2014). Thus, KCC2 was shown to be expressed in medial ganglionic eminence (MGE)-derived interneurons earlier than in neighbouring PCs during embryogenesis and to control the termination of their migration (Bortone & Polleux, 2009). However, KCC2 expression and function in specific MGE-derived subtypes in postnatal cortex have not been further explored. In the cerebellum, on the contrary, KCC2 expression is very weak in early postnatal presumptive baskets cells and increases postnatally (Simat *et al.* 2007). In the adult rat hippocampus, KCC2 was shown to be strongly expressed in PV-immunopositive interneurons (Gulyas *et al.* 2001), consistent with our immunohistochemical data (Fig. 1). Due to the delayed expression of parvalbumin in PV-INs (Solbach & Celio, 1991), we could not, however, visualize CA1 PV-INs in PVCre::Ai14 mice in early postnatal mice and therefore could not evaluate the temporal profile of KCC2 expression and function in these cells at earlier stages. In addition, the lack of a specific NKCC1 antibody for immunohistochemistry precluded examination of NKCC1 expression in PV-INs and PCs. Our pharmacological data, however, support that both transporters are expressed and functional in both cell types in PV-INs and PCs in the adult mouse hippocampus. Thus, the KCC2 antagonist VU0463271 and the NKCC1 antagonist bumetanide had opposing actions on the efficacy of transmembrane chloride export (Fig. 5) and E_{GABA} (Fig. 6) in both PV-INs and PCs. However, blocking KCC2 was sufficient to promote the excitatory effect of $GABA_AR$ activation whereas blocking NKCC1 had no detectable effect (Fig. 2), suggesting although both transporters are active in PV-INs and PCs, the valence of GABA signalling in both cell types predominantly relies on KCC2 but not NKCC1 function. Moreover, although KCC2 and NKCC1 blockade had similar effects on somatic E_{GABA} in PV-INs and PCs in perforated-patch recordings (Fig. 6*G*), we observed significant differences when cells were loaded with high intracellular chloride in whole-cell mode. Thus, the somato-dendritic gradient of E_{GABA} was more pronounced in PCs than in PV-INs (Fig. 5*A* and *B*) and somatic chloride extrusion was more efficient in PV-INs than in PCs. These differences are consistent with a differential expression and/or function of KCC2 and NKCC1 along the somato-dendritic axis of the two cell types, with a higher KCC2/NKCC1 function ratio in the soma of PV-INs. In addition, differences in the cable properties of PV-IN and PC dendrites may also contribute to this difference. Thus, lower membrane resistance of PV-IN as compared to PC dendrites (Norenberg *et al.* 2010) may induce poorer space clamp of $GABA_AR$-mediated currents evoked onto their distal dendrites. It should also be noted that, whereas the whole-cell evaluation of E_{GABA} gradients is an effective method to assess the efficacy of transmembrane chloride transport (Khirug *et al.* 2008; Gauvain *et al.* 2011), it may tend to overestimate steady-state KCC2/NKCC1 function ratio, as it uses high intracellular chloride concentration. This in turn is expected to inhibit the chloride-sensitive with-no-lysine (WNK) STE20 (sterile 20)-like kinases (SPAK) kinases, resulting in reduced NKCC1 and increased KCC2 function (de Los Heros *et al.* 2014; Friedel *et al.* 2015; Heubl *et al.* 2017).

Activity-dependent depression of $GABA_AR$-mediated transmission is well-documented and likely results from a combination of factors involving both pre- and postsynaptic elements (Thompson & Gahwiler, 1989*a*,*b*,*c*). In particular, several studies suggested repetitive activation of $GABA_ARs$ may lead to postsynaptic chloride loading and a subsequent depolarization of E_{GABA} (Thompson & Gahwiler, 1989*a*; Kaila *et al.* 1997; Staley & Proctor, 1999; Magloire *et al.* 2019). However, these studies used massive chloride loading induced either by multi-quantal IPSCs or prolonged, high-frequency stimulation. Although such intense receptor activation may be relevant to

© 2020 The Authors. The Journal of Physiology © 2020 The Physiological Society

specific, mostly pathological conditions (Magloire *et al.* 2019), it may not represent the receptor activation at individual, somatic or dendritic sites. Our results from gramidicin-perforated patch recordings instead show that, upon 10 Hz focal RubiGABA uncaging for up to 1s, $GABA_AR$-mediated currents decay in amplitude in both PV-INs and PCs largely independent of both the direction of the ion flux and KCC2 function (Fig. 7). These results suggest that chloride accumulation during repetitive (10 Hz) activation at single somatic or dendritic sites is not sufficient to significantly affect the driving force of $GABA_AR$-mediated currents, likely owing to the rapid diffusion of chloride ions inside the postsynaptic cytoplasm (Doyon *et al.* 2011). Instead, since these experiments were performed independent of synaptic stimulation, activity-dependent depression of $GABA_AR$-mediated currents likely reflected receptor desensitization (Jones & Westbrook, 1996; Papke *et al.* 2011; Gielen *et al.* 2015). Our results demonstrate this process occurs with a time constant of about 100–130 ms, consistent with the intermediate component of the desensitization kinetics of recombinant $\alpha_1\beta_{1/2}\gamma_{2L}$ receptors (Papke *et al.* 2011; Brodzki *et al.* 2016). Therefore, under physiological regimes of synaptic activity, $GABA_AR$ desensitization appears as a major postsynaptic factor acting as a low-pass filter with respect to GABA signalling (Jones & Westbrook, 1996).

CCC expression is altered in a variety of neurological and psychiatric conditions including epilepsy (Palma *et al.* 2006; Huberfeld *et al.* 2007; Karlocai *et al.* 2016; Kourdougli *et al.* 2017), chronic stress (MacKenzie & Maguire, 2015), Rett syndrome (Duarte *et al.* 2013; Banerjee *et al.* 2016; Tang *et al.* 2016) and autism spectrum disorders (Tyzio *et al.* 2014). Impaired chloride homeostasis has been suggested to induce paradoxical excitatory GABA signalling and thereby promote anomalous ensemble activities that underlie the pathology. Our data also suggest that KCC2 down-regulation may be sufficient to depolarize E_{GABA} above action potential threshold in PV-INs (Fig. 6*H*). In addition, since KCC2 is involved in a variety of molecular interactions with synaptic proteins (Ivakine *et al.* 2013; Mahadevan *et al.* 2014), ion channels (Goutierre *et al.* 2019) and cytoskeleton-related proteins (Li *et al.* 2007; Gauvain *et al.* 2011; Chevy *et al.* 2015; Llano *et al.* 2015), the loss of its expression also affects several physiological properties beyond the mere control of chloride transport and GABA signalling (Chamma *et al.* 2012). Thus, KCC2 knockdown in cortical PCs was shown to also profoundly perturb neuronal excitability as well as network activity (Kelley *et al.* 2018; Goutierre *et al.* 2019). Since PV-INs exert a critical control over the activity of cortical PCs (Pouille & Scanziani, 2001) and shape their rhythmic activities (Klausberger & Somogyi, 2008; Amilhon *et al.* 2015; Gan *et al.* 2017), altered CCC expression in these cells would be expected to profoundly perturb cortical rhythmogenesis. As most studies on CCC expression in the pathology lacked cell-subtype resolution, whether and how it is affected in PV-INs remain to be fully explored and the consequences on cortical activity should then be further investigated.

References

Agetsuma M, Hamm JP, Tao K, Fujisawa S & Yuste R (2018). Parvalbumin-positive interneurons regulate neuronal ensembles in visual cortex. *Cereb Cortex* **28**, 1831–1845.

Amilhon B, Huh CY, Manseau F, Ducharme G, Nichol H, Adamantidis A & Williams S (2015). Parvalbumin interneurons of hippocampus tune population activity at theta frequency. *Neuron* **86**, 1277–1289.

Banerjee A, Rikhye RV, Breton-Provencher V, Tang X, Li C, Li K, Runyan CA, Fu Z, Jaenisch R & Sur M (2016). Jointly reduced inhibition and excitation underlies circuit-wide changes in cortical processing in Rett syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E7287–E7296.

Banke TG & McBain CJ (2006). GABAergic input onto CA3 hippocampal interneurons remains shunting throughout development. *J Neurosci* **26**, 11720–11725.

Bartos M, Vida I, Frotscher M, Meyer A, Monyer H, Geiger JR & Jonas P (2002). Fast synaptic inhibition promotes synchronized gamma oscillations in hippocampal interneuron networks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13222–13227.

Blaesse P, Airaksinen MS, Rivera C & Kaila K (2009). Cation-chloride cotransporters and neuronal function. *Neuron* **61**, 820–838.

Bormann J, Hamill OP & Sakmann B (1987). Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and γ-aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones. *J Physiol* **385**, 243–286.

Bortone D & Polleux F (2009). KCC2 expression promotes the termination of cortical interneuron migration in a voltage-sensitive calcium-dependent manner. *Neuron* **62**, 53–71.

Brodzki M, Rutkowski R, Jatczak M, Kisiel M, Czyzewska MM & Mozrzymas JW (2016). Comparison of kinetic and pharmacological profiles of recombinant $\alpha_1\gamma_{2L}$ and $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ $GABA_A$ receptors – A clue to the role of intersubunit interactions. *Eur J Pharmacol* **784**, 81–89.

Buzsaki G (2010). Neural syntax: cell assemblies, synapsembles, and readers. *Neuron* **68**, 362–385.

Chamberland S & Topolnik L (2012). Inhibitory control of hippocampal inhibitory neurons. *Front Neurosci* **6**, 165.

Chamma I, Chevy Q, Poncer JC & Levi S (2012). Role of the neuronal K-Cl co-transporter KCC2 in inhibitory and excitatory neurotransmission. *Front Cell Neurosci* **6**, 5.

Chavas J & Marty A (2003). Coexistence of excitatory and inhibitory GABA synapses in the cerebellar interneuron network. *J Neurosci* **23**, 2019–2031.

Chevy Q, Heubl M, Goutierre M, Backer S, Moutkine I, Eugene E, Bloch-Gallego E, Levi S & Poncer JC (2015). KCC2 gates activity-driven AMPA receptor traffic through cofilin phosphorylation. *J Neurosci* **35**, 15772–15786.

© 2020 The Authors. The Journal of Physiology © 2020 The Physiological Society

de Los Heros P, Alessi DR, Gourlay R, Campbell DG, Deak M, Macartney TJ, Kahle KT & Zhang J (2014). The WNK-regulated SPAK/OSR1 kinases directly phosphorylate and inhibit the K^+-Cl^- co-transporters. *Biochem J* **458**, 559–573.

Deidda G, Parrini M, Naskar S, Bozarth IF, Contestabile A & Cancedda L (2015). Reversing excitatory $GABA_A$R signaling restores synaptic plasticity and memory in a mouse model of Down syndrome. *Nat Med* **21**, 318–326.

Doyon N, Prescott SA, Castonguay A, Godin AG, Kroger H & De Koninck Y (2011). Efficacy of synaptic inhibition depends on multiple, dynamically interacting mechanisms implicated in chloride homeostasis. *PLoS Comput Biol* **7**, e1002149.

Duarte ST, Armstrong J, Roche A, Ortez C, Perez A, O'Callaghan Mdel M, Pereira A, Sanmarti F, Ormazabal A, Artuch R, Pineda M & Garcia-Cazorla A (2013). Abnormal expression of cerebrospinal fluid cation chloride cotransporters in patients with Rett syndrome. *PLoS One* **8**, e68851.

Freund TF & Antal M (1988). GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature* **336**, 170–173.

Friedel P, Kahle KT, Zhang J, Hertz N, Pisella LI, Buhler E, Schaller F, Duan J, Khanna AR, Bishop PN, Shokat KM & Medina I (2015). WNK1-regulated inhibitory phosphorylation of the KCC2 cotransporter maintains the depolarizing action of GABA in immature neurons. *Sci Signal* **8**, ra65.

Gan J, Weng SM, Pernia-Andrade AJ, Csicsvari J & Jonas P (2017). Phase-locked inhibition, but not excitation, underlies hippocampal ripple oscillations in awake mice in vivo. *Neuron* **93**, 308–314.

Gao B & Fritschy JM (1994). Selective allocation of $GABA_A$ receptors containing the α_1 subunit to neurochemically distinct subpopulations of rat hippocampal interneurons. *Eur J Neurosci* **6**, 837–853.

Gauvain G, Chamma I, Chevy Q, Cabezas C, Irinopoulou T, Bodrug N, Carnaud M, Levi S & Poncer JC (2011). The neuronal K-Cl cotransporter KCC2 influences postsynaptic AMPA receptor content and lateral diffusion in dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 15474–15479.

Gielen M, Thomas P & Smart TG (2015). The desensitization gate of inhibitory Cys-loop receptors. *Nat Commun* **6**, 6829.

Goutierre M, Al Awabdh S, Donneger F, Francois E, Gomez-Dominguez D, Irinopoulou T, Menendez de la Prida L & Poncer JC (2019). KCC2 regulates neuronal excitability and hippocampal activity via interaction with Task-3 channels. *Cell Rep* **28**, 91–103.e7.

Gulyas AI, Hajos N & Freund TF (1996). Interneurons containing calretinin are specialized to control other interneurons in the rat hippocampus. *J Neurosci* **16**, 3397–3411.

Gulyas AI, Megias M, Emri Z & Freund TF (1999). Total number and ratio of excitatory and inhibitory synapses converging onto single interneurons of different types in the CA1 area of the rat hippocampus. *J Neurosci* **19**, 10082–10097.

Gulyas AI, Sik A, Payne JA, Kaila K & Freund TF (2001). The KCl cotransporter, KCC2, is highly expressed in the vicinity of excitatory synapses in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* **13**, 2205–2217.

Hartig W, Brauer K & Bruckner G (1992). Wisteria floribunda agglutinin-labelled nets surround parvalbumin-containing neurons. *Neuroreport* **3**, 869–872.

Henze DA & Buzsaki G (2001). Action potential threshold of hippocampal pyramidal cells in vivo is increased by recent spiking activity. *Neuroscience* **105**, 121–130.

Heubl M, Zhang J, Pressey JC, Al Awabdh S, Renner M, Gomez-Castro F, Moutkine I, Eugène E, Russeau M, Kahle KT, Poncer JC & Lévi S (2017). $GABA_A$ receptor dependent synaptic inhibition rapidly tunes KCC2 activity via the Cl^--sensitive WNK1 kinase. *Nat Commun* **8**, 1776.

Hu H, Gan J & Jonas P (2014). Interneurons. Fast-spiking, parvalbumin$^+$ GABAergic interneurons: from cellular design to microcircuit function. *Science* **345**, 1255263.

Huberfeld G, Wittner L, Clemenceau S, Baulac M, Kaila K, Miles R & Rivera C (2007). Perturbed chloride homeostasis and GABAergic signaling in human temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* **27**, 9866–9873.

Ivakine EA, Acton BA, Mahadevan V, Ormond J, Tang M, Pressey JC, Huang MY, Ng D, Delpire E, Salter MW, Woodin MA & McInnes RR (2013). Neto2 is a KCC2 interacting protein required for neuronal Cl^- regulation in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 3561–3566.

Jedlicka P, Deller T, Gutkin BS & Backus KH (2011). Activity-dependent intracellular chloride accumulation and diffusion controls $GABA_A$ receptor-mediated synaptic transmission. *Hippocampus* **21**, 885–898.

Jones MV & Westbrook GL (1995). Desensitized states prolong $GABA_A$ channel responses to brief agonist pulses. *Neuron* **15**, 181–191.

Jones MV & Westbrook GL (1996). The impact of receptor desensitization on fast synaptic transmission. *Trends Neurosci* **19**, 96–101.

Kaila K, Lamsa K, Smirnov S, Taira T & Voipio J (1997). Long-lasting GABA-mediated depolarization evoked by high-frequency stimulation in pyramidal neurons of rat hippocampal slice is attributable to a network-driven, bicarbonate-dependent K^+ transient. *J Neurosci* **17**, 7662–7672.

Karlocai MR, Wittner L, Toth K, Magloczky Z, Katarova Z, Rasonyi G, Eross L, Czirjak S, Halasz P, Szabo G, Payne JA, Kaila K & Freund TF (2016). Enhanced expression of potassium-chloride cotransporter KCC2 in human temporal lobe epilepsy. *Brain Struct Funct* **221**, 3601–3615.

Kelley MR, Cardarelli RA, Smalley JL, Ollerhead TA, Andrew PM, Brandon NJ, Deeb TZ & Moss SJ (2018). Locally reducing KCC2 activity in the hippocampus is sufficient to induce temporal lobe epilepsy. *EBioMedicine* **32**, 62–71.

Khirug S, Yamada J, Afzalov R, Voipio J, Khiroug L & Kaila K (2008). GABAergic depolarization of the axon initial segment in cortical principal neurons is caused by the Na-K-2Cl cotransporter NKCC1. *J Neurosci* **28**, 4635–4639.

© 2020 The Authors. The Journal of Physiology © 2020 The Physiological Society

Kim Y & Trussell LO (2007). Ion channels generating complex spikes in cartwheel cells of the dorsal cochlear nucleus. *J Neurophysiol* **97**, 1705–1725.

Kirmse K, Kummer M, Kovalchuk Y, Witte OW, Garaschuk O & Holthoff K (2015). GABA depolarizes immature neurons and inhibits network activity in the neonatal neocortex in vivo. *Nat Commun* **6**, 7750.

Klausberger T & Somogyi P (2008). Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science* **321**, 53–57.

Kourdougli N, Pellegrino C, Renko JM, Khirug S, Chazal G, Kukko-Lukjanov TK, Lauri SE, Gaiarsa JL, Zhou L, Peret A, Castren EP, Tuominen RKP, Crepel V & Rivera CP (2017). Depolarizing GABA contributes to glutamatergic network rewiring in epilepsy. *Ann Neurol* **81**, 251–265.

Li H, Khirug S, Cai C, Ludwig A, Blaesse P, Kolikova J, Afzalov R, Coleman SK, Lauri S, Airaksinen MS, Keinanen K, Khiroug L, Saarma M, Kaila K & Rivera C (2007). KCC2 interacts with the dendritic cytoskeleton to promote spine development. *Neuron* **56**, 1019–1033.

Le Roux N, Cabezas C, Bohm UL & Poncer JC (2013). Input-specific learning rules at excitatory synapses onto hippocampal parvalbumin-expressing interneurons. *The Journal of physiology* **591**, 1809–1822.

Llano I & Marty A (1995). Presynaptic metabotropic glutamatergic regulation of inhibitory synapses in rat cerebellar slices. *J Physiol* **486**, 163–176.

Llano O, Smirnov S, Soni S, Golubtsov A, Guillemin I, Hotulainen P, Medina I, Nothwang HG, Rivera C & Ludwig A (2015). KCC2 regulates actin dynamics in dendritic spines via interaction with β-PIX. *J Cell Biol* **209**, 671–686.

Lozovaya N, Nardou R, Tyzio R, Chiesa M, Pons-Bennaceur A, Eftekhari S, Bui TT, Billon-Grand M, Rasero J, Bonifazi P, Guimond D, Gaiarsa JL, Ferrari DC & Ben-Ari Y (2019). Early alterations in a mouse model of Rett syndrome: the GABA developmental shift is abolished at birth. *Sci Rep* **9**, 9276.

MacKenzie G & Maguire J (2015). Chronic stress shifts the GABA reversal potential in the hippocampus and increases seizure susceptibility. *Epilepsy Res* **109**, 13–27.

Magloire V, Cornford J, Lieb A, Kullmann DM & Pavlov I (2019). KCC2 overexpression prevents the paradoxical seizure-promoting action of somatic inhibition. *Nat Commun* **10**, 1225.

Mahadevan V, Pressey JC, Acton BA, Uvarov P, Huang MY, Chevrier J, Puchalski A, Li CM, Ivakine EA, Airaksinen MS, Delpire E, McInnes RR & Woodin MA (2014). Kainate receptors coexist in a functional complex with KCC2 and regulate chloride homeostasis in hippocampal neurons. *Cell Rep* **7**, 1762–1770.

Markkanen M, Karhunen T, Llano O, Ludwig A, Rivera C, Uvarov P & Airaksinen MS (2014). Distribution of neuronal KCC2a and KCC2b isoforms in mouse CNS. *J Comp Neurol* **522**, 1897–1914.

Martina M, Royer S & Pare D (2001). Cell-type-specific GABA responses and chloride homeostasis in the cortex and amygdala. *J Neurophysiol* **86**, 2887–2895.

Marty A & Neher E (1995). Tight-seal whole-cell recording. In *Single-Channel Recording*, ed. Sakmann B & Neher E, pp. 31–52. Springer US, Boston, MA.

Mason MJ, Simpson AK, Mahaut-Smith MP & Robinson HP (2005). The interpretation of current-clamp recordings in the cell-attached patch-clamp configuration. *Biophys J* **88**, 739–750.

Meijering E, Jacob M, Sarria JC, Steiner P, Hirling H & Unser M (2004). Design and validation of a tool for neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images. *Cytometry A* **58**, 167–176.

Norenberg A, Hu H, Vida I, Bartos M & Jonas P (2010). Distinct nonuniform cable properties optimize rapid and efficient activation of fast-spiking GABAergic interneurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 894–899.

Palma E, Amici M, Sobrero F, Spinelli G, Di Angelantonio S, Ragozzino D, Mascia A, Scoppetta C, Esposito V, Miledi R & Eusebi F (2006). Anomalous levels of Cl- transporters in the hippocampal subiculum from temporal lobe epilepsy patients make GABA excitatory. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 8465–8468.

Papke D, Gonzalez-Gutierrez G & Grosman C (2011). Desensitization of neurotransmitter-gated ion channels during high-frequency stimulation: a comparative study of Cys-loop, AMPA and purinergic receptors. *J Physiol* **589**, 1571–1585.

Patenaude C, Massicotte G & Lacaille JC (2005). Cell-type specific GABA synaptic transmission and activity-dependent plasticity in rat hippocampal stratum radiatum interneurons. *Eur J Neurosci* **22**, 179–188.

Perkins KL (2006). Cell-attached voltage-clamp and current-clamp recording and stimulation techniques in brain slices. *J Neurosci Methods* **154**, 1–18.

Pouille F & Scanziani M (2001). Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition. *Science* **293**, 1159–1163.

Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K, Pirvola U, Saarma M & Kaila K (1999). The K^+/Cl^- co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* **397**, 251–255.

Sauer JF & Bartos M (2010). Recruitment of early postnatal parvalbumin-positive hippocampal interneurons by GABAergic excitation. *J Neurosci* **30**, 110–115.

Simat M, Ambrosetti L, Lardi-Studler B & Fritschy JM (2007). GABAergic synaptogenesis marks the onset of differentiation of basket and stellate cells in mouse cerebellum. *Eur J Neurosci* **26**, 2239–2256.

Solbach S & Celio MR (1991). Ontogeny of the calcium binding protein parvalbumin in the rat nervous system. *Anat Embryol (Berl)* **184**, 103–124.

Staley KJ & Mody I (1992). Shunting of excitatory input to dentate gyrus granule cells by a depolarizing $GABA_A$ receptor-mediated postsynaptic conductance. *J Neurophysiol* **68**, 197–212.

Staley KJ & Proctor WR (1999). Modulation of mammalian dendritic $GABA_A$ receptor function by the kinetics of Cl^- and HCO_3^- transport. *J Physiol* **519**, 693–712.

© 2020 The Authors. The Journal of Physiology © 2020 The Physiological Society

Takacs VT, Klausberger T, Somogyi P, Freund TF & Gulyas AI (2012). Extrinsic and local glutamatergic inputs of the rat hippocampal CA1 area differentially innervate pyramidal cells and interneurons. *Hippocampus* **22**, 1379–1391.

Tang X, Kim J, Zhou L, Wengert E, Zhang L, Wu Z, Carromeu C, Muotri AR, Marchetto MC, Gage FH & Chen G (2016). KCC2 rescues functional deficits in human neurons derived from patients with Rett syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 751–756.

Thompson SM & Gahwiler BH (1989*a*). Activity-dependent disinhibition. I. Repetitive stimulation reduces IPSP driving force and conductance in the hippocampus in vitro. *J Neurophysiol* **61**, 501–511.

Thompson SM & Gahwiler BH (1989*b*). Activity-dependent disinhibition. II. Effects of extracellular potassium, furosemide, and membrane potential on E_{Cl-} in hippocampal CA3 neurons. *J Neurophysiol* **61**, 512–523.

Thompson SM & Gahwiler BH (1989*c*). Activity-dependent disinhibition. III. Desensitization and $GABA_B$ receptor-mediated presynaptic inhibition in the hippocampus in vitro. *J Neurophysiol* **61**, 524–533.

Tyzio R, Nardou R, Ferrari DC, Tsintsadze T, Shahrokhi A, Eftekhari S, Khalilov I, Tsintsadze V, Brouchoud C, Chazal G, Lemonnier E, Lozovaya N, Burnashev N & Ben-Ari Y (2014). Oxytocin-mediated GABA inhibition during delivery attenuates autism pathogenesis in rodent offspring. *Science* **343**, 675–679.

Uvarov P, Ludwig A, Markkanen M, Pruunsild P, Kaila K, Delpire E, Timmusk T, Rivera C & Airaksinen MS (2007). A novel N-terminal isoform of the neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2. *J Biol Chem* **282**, 30570–30576.

Verheugen JA, Fricker D & Miles R (1999). Noninvasive measurements of the membrane potential and GABAergic action in hippocampal interneurons. *J Neurosci* **19**, 2546–2555.

Zucker RS & Regehr WG (2002). Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* **64**, 355–405.

Additional information

Author's present address

Y. Otsu: Pain Management Research Institute, Kolling Institute of Medical Research, Northern Clinical School, The University of Sydney and Royal North Shore Hospital, St. Leonards, New South Wales, Australia.

Competing interests

The authors declare no conflict of interest.

Author contributions

Y.O. and J.C.P. conceived and designed the research. Y.O. performed all electrophysiological recordings and data analysis with the help of E.J.S., who also maintained the mouse colony. F.D. performed immunohistochemistry, confocal imaging and analysis. Y.O. and J.C.P. prepared the figures and wrote the paper. All authors approved the final version of the manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. All persons designated as authors qualify for authorship, and all those who qualify for authorship are listed.

Funding

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Sorbonne Université, LabEx Bio-Psy through the *Investissements d'Avenir* program managed by Agence Nationale de La Recherche under reference ANR-11-IDEX-0004-02 (postdoctoral fellowship to Y.O.), Fondation pour la Recherche Médicale (grant DEQ20140329539 to J.C.P.), Fédération pour la Recherche sur le Cerveau and Fondation Française pour la Recherche sur l'Epilespie (grants to J.C.P.) as well as ERANET-Neuron (ACRoBAT project, funded by Agence Nationale pour la Recherche to J.C.P.). F.D. is the recipient of a doctoral fellowship from Sorbonne Université. The Poncer lab is affiliated with the Paris School of Neuroscience (ENP) and the Bio-Psy Laboratory of excellence.

Acknowledgements

We thank X. Marques for expert assistance with confocal imaging, which was performed at the 'Photonic Imaging and Image Analysis Platform' of the Institut du Fer à Moulin. We also thank Peter Blaesse for critical reading of the manuscript.

Keywords

chloride, GABA, hippocampus, KCC2, synaptic transmission, transporters

Supporting information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Statistical Summary Document.

© 2020 The Authors. The Journal of Physiology © 2020 The Physiological Society

Article 2 :

La géphyrine interagit avec KCC2 et régule l'expression membranaire et la fonction du transporteur dans les neurones corticaux.

Introduction

KCC2, en régulant l'homéostasie neuronale des ions Cl^-, contrôle la force et la polarité de la transmission GABAergique. En plus de son rôle canonique de transport d'ion Cl^-, KCC2 présente de nombreuses fonctions non canoniques et régule par exemple la synaptogenèse, ainsi que la force et la plasticité synaptique via son interaction avec divers partenaires moléculaires (Awad et al., 2018; Chevy et al., 2015; Fiumelli et al., 2013; Gauvain et al., 2011; H. Li et al., 2007). Ces effets impliquent l'interaction du domaine C-terminal de KCC2 avec des protéines liées à l'actine, telles que le domaine FERM, la protéine 4.1N (H. Li et al., 2007), et βPIX (Chevy et al., 2015; Llano et al., 2015), qui contrôle la dynamique de l'actine par la régulation de l'activité de la cofiline. De plus, comme on vient de le voir, KCC2 régule l'excitabilité neuronale via son interaction avec Task-3 (Goutierre et al., 2019a), et est impliqué dans des interactions moléculaires qui régulent son trafic et son expression membranaire (Ivakine et al., 2013; Mahadevan et al., 2017; Pressey et al., 2017).

Bien que KCC2 présente une expression diffuse dans la membrane plasmique somatodendritique (Báldi et al., 2010; Chamma et al., 2013; Gauvain et al., 2011; Gulyás et al., 2001), il est enrichi à proximité des synapses glutamatergiques et GABAergiques (Chamma et al., 2013; Gauvain et al., 2011; Gulyás et al., 2001). L'interaction du CTD de KCC2 avec 4.1N près des synapses glutamatergiques réduit la diffusion membranaire de KCC2 et participe à son agrégation (Chamma et al., 2013). Cet effet a été observé en bloquant l'interaction entre KCC2 et 4.1N par la surexpression du CTD de KCC2, la suppression de l'expression de 4.1N, ou la perturbation pharmacologique de la polymérisation de l'actine. Cependant, ces manipulations n'ont pas d'effet à proximité des synapses GABAergiques, ce qui suggère l'existence d'interactions moléculaires spécifiques.

De plus, bien que KCC2 soit connu pour interagir avec les récepteurs $GABA_A$ (Huang et al., 2012; Wan et al., 2020) et $GABA_B$ (Wright et al., 2017a), les mécanismes moléculaires d'agrégation de KCC2 près des synapses GABAergiques restent inconnus.

Objectif

Dans cette étude, nous avons souhaité identifier de nouveaux partenaires de KCC2 contribuant à l'agrégation du transporteur à proximité des synapses GABAergiques.

Résultats

Nous avons tout d'abord utilisé une approche protéomique pour identifier de nouvelles protéines interagissant avec KCC2 dans le néocortex de rat adulte. Parmi 271 partenaires identifiés, nous avons identifié des partenaires connus et de nouveaux partenaires candidats de KCC2, dont certains sont impliqués dans le développement neuronal et la transmission synaptique. Étant donné l'objectif de cette étude, nous nous sommes concentrés sur la géphyrine, une protéine d'échafaudage connue pour stabiliser les récepteurs $GABA_AR$ et glycinergique au niveau des synapses inhibitrices (Feng et al., 1998; Jacob et al., 2005; Kneussel et al., 1999; Lévi et al., 2004; Yu et al., 2007).

Nous avons d'abord confirmé l'interaction de la géphyrine avec KCC2 via des expériences de co-immunoprécipitation, à partir d'échantillons protéiques issus de cortex de rat ou de cellules Neuro2a.

Nous avons ensuite mis en évidence, en surexprimant le CTD de KCC2 dans des cellules Neuro2a, que cette interaction implique le domaine C-terminal du transporteur.

Nous avons ensuite révélé, par le biais d'immunomarquages sur des cellules Neuro2a surexprimant la géphyrine ou des neurones hippocampiques exprimant ou n'exprimant plus la géphyrine, que l'interaction de la géphyrine avec KCC2 stabilise le transporteur à la membrane et favorise son agrégation, notamment, mais pas exclusivement, près des synapses GABAergiques.

Enfin, nous avons montré, via des expériences d'imagerie au Cl^-, qu'une suppression de l'expression de la géphyrine conduit à une augmentation du Cl^- intracellulaire par rapport à des neurones contrôles. Cependant, ces mesures de Cl^- à l'état d'équilibre ne permettent pas d'évaluer directement la fonction de transport de KCC2 (voir MM.1).

Nous avons donc testé, dans des neurones hippocampiques en culture, la capacité d'extrusion membranaire des ions Cl^-, en mesurant le gradient somatodendritique d'E_{GABA}, et avons mis en évidence une réduction significative de la fonction de KCC2 suite à la perte d'expression de la géphyrine.

Conclusion

En résumé, nos travaux révèlent la géphyrine comme un nouveau partenaire de KCC2 et mettent en évidence son rôle essentiel dans la régulation de l'expression membranaire et de la fonction de KCC2 dans les neurones corticaux.

Contribution

Dans cet article, j'ai effectué les expériences de co-immunoprécipitation et montré que KCC2 interagit avec la géphyrine. J'ai également évalué, par une approche électrophysiologique, la fonction de KCC2 suite à la perte d'expression de la géphyrine.

Cellular/Molecular

Gephyrin Interacts with the K-Cl Cotransporter KCC2 to Regulate Its Surface Expression and Function in Cortical Neurons

Sana Al Awabdh,[1,2,3*] Florian Donneger,[1,2,3*] Marie Goutierre,[1,2,3] Martial Séveno,[4] Oana Vigy,[5] Pauline Weinzettl,[1,2,3,6] Marion Russeau,[1,2,3] Imane Moutkine,[1,2,3] Sabine Lévi,[1,2,3] Philippe Marin,[5] and Jean Christophe Poncer[1,2,3]

[1]INSERM UMR-S 1270, 75005 Paris, France, [2]Sorbonne Université, 75005 Paris, France, [3]Institut du Fer à Moulin, 75005 Paris, France, [4]BCM, Université de Montpellier, CNRS, INSERM, 34094 Montpellier, France, [5]IGF, Université de Montpellier, CNRS, INSERM, 34090 Montpellier, France, and [6]Institute of Biotechnology, University of Applied Sciences, Krems, Austria

The K^+-Cl^- cotransporter KCC2, encoded by the *Slc12a5* gene, is a neuron-specific chloride extruder that tunes the strength and polarity of $GABA_A$ receptor-mediated transmission. In addition to its canonical ion transport function, KCC2 also regulates spinogenesis and excitatory synaptic function through interaction with a variety of molecular partners. KCC2 is enriched in the vicinity of both glutamatergic and GABAergic synapses, the activity of which in turn regulates its membrane stability and function. KCC2 interaction with the submembrane actin cytoskeleton via 4.1N is known to control its anchoring near glutamatergic synapses on dendritic spines. However, the molecular determinants of KCC2 clustering near GABAergic synapses remain unknown. Here, we used proteomics to identify novel KCC2 interacting proteins in the adult rat neocortex. We identified both known and novel candidate KCC2 partners, including some involved in neuronal development and synaptic transmission. These include gephyrin, the main scaffolding molecule at GABAergic synapses. Gephyrin interaction with endogenous KCC2 was confirmed by immunoprecipitation from rat neocortical extracts. We showed that gephyrin stabilizes plasmalemmal KCC2 and promotes its clustering in hippocampal neurons, mostly but not exclusively near GABAergic synapses, thereby controlling KCC2-mediated chloride extrusion. This study identifies gephyrin as a novel KCC2 anchoring molecule that regulates its membrane expression and function in cortical neurons.

Key words: cerebral cortex; chloride; GABA transmission; KCC2; proteomics; synaptic transmission

Significance Statement

Fast synaptic inhibition in the brain is mediated by chloride-permeable $GABA_A$ receptors ($GABA_A$Rs) and therefore relies on transmembrane chloride gradients. In neurons, these gradients are primarily maintained by the K/Cl cotransporter KCC2. Therefore, understanding the mechanisms controlling KCC2 expression and function is crucial to understand its physiological regulation and rescue its function in the pathology. KCC2 function depends on its membrane expression and clustering, but the underlying mechanisms remain unknown. We describe the interaction between KCC2 and gephyrin, the main scaffolding protein at inhibitory synapses. We show that gephyrin controls plasmalemmal KCC2 clustering and that loss of gephyrin compromises KCC2 function. Our data suggest functional units comprising $GABA_A$Rs, gephyrin, and KCC2 act to regulate synaptic GABA signaling.

Received Nov. 17, 2020; revised Aug. 31, 2021; accepted Oct. 17, 2021.

Author contributions: S.A.A., M.S., S.L., P.M., and J.C.P. designed research; S.A.A., F.D., and M.G. performed research; M.R. and I.M. contributed unpublished reagents/analytic tools; S.A.A., F.D., M.S., O.V., P.W., M.R., I. M., S.L., P.M., and J.C.P. analyzed data; S.A.A., P.M., and J.C.P. wrote the paper.

This work was supported in part by Fondation pour la Recherche Médicale (Grant DEQ20140329539 to J.C. P.), ERANET-Neuron (funded by Agence Nationale de la Recherche; to J.C.P.), and the Fondation Française pour la Recherche sur l'Epilepsie–Fédération pour la Recherche sur le Cerveau (to J.C.P.). F.D. and M.G. were recipients of fellowships from Sorbonne University. The Poncer-Lévi laboratory is affiliated with the Sorbonne University *i-Bio* Initiative. We thank Jean-Antoine Girault for advice on protein extraction, and Kai Kaila for discussions while preparing the manuscript. We also thank the Proteomics Platform of Biocampus Montpellier and the Photonic Imaging Platform of Institut du Fer à Moulin, where mass spectrometry experiments and image acquisition, respectively, were carried out.

*S.A.A. and F.D. contributed equally to this work.

The authors declare no competing financial interests.

Correspondence should be addressed to Jean Christophe Poncer at jean-christophe.poncer@inserm.fr.

https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2926-20.2021

Copyright © 2022 the authors

Introduction

Fast inhibitory synaptic transmission in the brain is mediated by chloride-permeable $GABA_A$ and glycine receptors. To maintain a hyperpolarizing driving force for transmembrane chloride fluxes through these receptors, neurons are equipped with a unique chloride extrusion capacity mediated by the K/Cl cotransporter KCC2, a member of the *Slc12* cation-coupled chloride transporters (Chamma et al., 2012; Kaila et al., 2014a). The delayed expression onset of KCC2 is responsible for the progressive hyperpolarizing shift in the polarity of GABA signaling in the developing brain (Rivera et al., 1999). Conversely, downregulation of KCC2 expression in a variety of neurologic and neuropsychiatric conditions is associated with paradoxical, depolarizing actions of GABA signaling that may underlie pathologic network activities (Cohen et al., 2002; Coull et al., 2003; Huberfeld et al., 2007; Kahle et al., 2008; Boulenguez et al., 2010; Pallud et al., 2014; Tyzio et al., 2014; Kaila et al., 2014a; Banerjee et al., 2016).

In addition to its canonical role in regulating transmembrane chloride gradients, KCC2 is involved in numerous biological processes, independently of its ion transport function (Chamma et al., 2012; Blaesse and Schmidt, 2015; Chevy et al., 2020). Thus, KCC2 expression is required for spinogenesis during neuronal maturation (Li et al., 2007; Fiumelli et al., 2013; Awad et al., 2018), controls the confinement of postsynaptic glutamate receptors within dendritic spines (Gauvain et al., 2011), and gates long-term potentiation at glutamatergic synapses (Chevy et al., 2015). These effects involve the interaction of the large C-terminal domain (CTD) of KCC2 with actin-related proteins, such as the FERM domain, spectrin/actin-binding protein 4.1N (Li et al., 2007), and the Rac1-specific guanine nucleotide exchange factor βPIX (Chevy et al., 2015; Llano et al., 2015), which controls actin dynamics through regulation of cofilin activity. In addition, KCC2 regulates neuronal excitability through interaction with the two-pore leak potassium channel Task-3 (Goutierre et al., 2019) and is involved in molecular interactions that regulate its traffic and membrane expression (Ivakine et al., 2013; Mahadevan et al., 2017; Pressey et al., 2017).

The multiple functions of KCC2 imply that its membrane expression is tightly regulated at the subcellular level. Although KCC2 shows diffuse expression throughout the somatodendritic plasma membrane (Gulyás et al., 2001; Baldí et al., 2010; Gauvain et al., 2011; Chamma et al., 2013), it also forms perisynaptic but not postsynaptic aggregates near both GABAergic (Gulyás et al., 2001; Chamma et al., 2013) and glutamatergic (Gulyás et al., 2001; Gauvain et al., 2011) synapses. Such clustering may be directly related to KCC2 function, as its specific disruption with no change in total membrane expression results in a loss of KCC2 transport activity in hippocampal neurons (Watanabe et al., 2009). The interaction of KCC2-CTD with 4.1N near glutamatergic synapses hinders KCC2 membrane diffusion and likely participates in its clustering. Blocking KCC2-4.1N interaction by overexpressing KCC2-CTD, knocking down 4.1N expression, or pharmacologically disrupting actin polymerization results in reduced dwell time of KCC2 in the vicinity of glutamatergic synapses (Chamma et al., 2013). However, these manipulations do not affect KCC2 dwell time near GABAergic synapses, suggesting the existence of synapse-specific molecular interactions contributing to the formation of perisynaptic KCC2 clusters. Although KCC2 was shown to interact with both $GABA_A$ (Huang et al., 2012; Wan et al., 2020) and $GABA_B$ (Wright et al., 2017) receptors, the molecular mechanisms of KCC2 clustering near GABAergic synapses remain to be identified. Here, we addressed this issue using proteomic analysis of the KCC2 interactome in cortical principal neurons. Of the 271 candidate KCC2 partners identified, we focused on the scaffolding protein gephyrin, which is known to stabilize $GABA_A$ and glycine receptors at inhibitory synapses (Feng et al., 1998; Kneussel et al., 1999; Lévi et al., 2004; Jacob et al., 2005; Yu et al., 2007). We confirmed gephyrin interaction with native KCC2 in cortical neurons and showed that gephyrin tightly regulates KCC2 membrane expression and clustering, notably but not exclusively near GABAergic synapses. Furthermore, gephyrin knockdown was associated with a significant reduction in transmembrane chloride extrusion. These results identify gephyrin as a major KCC2 interacting protein that regulates its membrane expression and function in cortical neurons.

Materials and Methods

Animals. Adult male Sprague Dawley rats were obtained from Janvier Labs. All procedures conformed to the International Guidelines on the ethical use of animals and to the French Agriculture and Forestry Ministry guidelines for handling animals (decree 87 849, license A 75–05-22), and were approved by the Charles Darwin Ethics Committee (APAFIS2015111011588776v3). All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used.

Virus and stereotaxic viral injection. Rat KCC2-Flag sequence (Chamma et al., 2013) was introduced in a pAAV vector under CaMKII promoter (pAAV-CW3SL-EGFP; plasmid #61463, Addgene) and used to produce purified adenoviral particles (Atlantic Gene Therapy).

The 4- to 5-week-old rats were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine/xylazine (75/10 mg/kg) and subcutaneous injection of buprenorphine (0.05 mg/kg) for analgesia. Animals were then head fixed in a stereotaxic apparatus. One microliter of adeno-associated virus (AAV) suspension (concentrated at 7.3×10^{12} transduction units/ml) was injected unilaterally in the cortex at four injection sites [(1) anteroposterior (AP), +2 mm; mediolateral (ML), ±2.5 mm; dorsoventral (DV), −2 mm; (2) AP, −0.5 mm; ML, ±2.5 mm; DV, −1.8 mm; (3) AP, −3 mm; ML, ±2.5 mm; DV, −1.2 mm; (4) AP, −5.5 mm; ML, ±2.5 mm; DV, −1.2 mm] at a rate of 125 nl/min.

Immunohistochemistry. KCC2-Flag expression was verified at least 2 weeks following viral injections. Rats were anesthetized by intraperitoneal ketamine/xylazine injection (110/15 mg/kg) and perfused transcardially with ice-cold choline-based solution containing the following (in mM): 110 choline Cl, 25 glucose, 25 $NaHCO_3$, 11.6 ascorbic acid, 3.1 pyruvic acid, 1.25 NaH_2PO_4, 2.5 KCl, 0.5 $CaCl_2$, and 7 $MgCl_2$ saturated with 95% O_2/5% CO_2. Brains were removed, postfixed in 4% paraformaldehyde for 48 h and stored at 4°C in 30% sucrose PBS. Parasagittal sections (40 µm thick) were obtained using a cryotome. After washes, brain slices were incubated for 3 h with 0.3% Triton X-100 and 10% goat serum in PBS, and then for 48 h at 4°C with primary antibodies: KCC2 (rabbit, 2.5 µg/ml; catalog #07–432, Merck) and Flag (mouse, 2.5 µg/ml; M2 clone, catalog #F3165, Merck). After washing in PBS, slices were incubated for 3 h with secondary antibodies (Cy3-coupled goat anti-mouse and Alexa Fluor 647-coupled goat anti-rabbit, 3 µg/ml; Jackson ImmunoResearch), washed with PBS and mounted with Mowiol/Dabco (25 mg/ml). Images were acquired with a DM6000-2 upright epifluorescence microscope with a 12 bit cooled CCD camera (Micromax, Roper Scientific) run with MetaMorph software (Roper Scientific).

Ex vivo *KCC2 coimmunoprecipitation.* Rat cortices were dissected and homogenized by sonication in coimmunoprecipitation buffer (1 ml/100 mg tissue) containing (in mM): 50 Tris-HCl pH 7.4, 150 NaCl, 1 EDTA, as well as 1% Triton X-100 and protease inhibitors, and solubilized by rotation for 4–6 h at 4°C. After centrifugation at 20,000 × *g* for 40 min at 4°C, the protein content of the supernatant was measured by BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific). Solubilized proteins (10 mg) were incubated overnight at 4°C with 50 µl of anti-Flag magnetic beads (Sigma-Aldrich). After two 30 min washes at 4°C with coimmunoprecipitation buffer containing 1% Triton X-100, beads were washed twice with detergent-free coimmunoprecipitation buffer, first for 30 min at 4°C and then overnight at 4°C. Immunoprecipitated proteins were

gently eluted by rotating beads for 1 h at room temperature in 57 µl of elution buffer containing 250 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS, 20% glycerol, and bromophenol blue, to limit the amount of bait in the eluate (EL), reduce the concomitant elution of IgGs and avoid interference with subsequent identification of partners by MS. Eluates were transferred in a new tube where SDS and β-mercaptoethanol were added for a 1 h denaturation at 37°C. A control Western blot was performed with 50 µg of lysate as input (IN), 10% of the EL, 5% of the total flow-through (FT) fraction, and all material remaining bound to the beads after mild elution. The latter was obtained by denaturing solubilization for 1 h at 37°C in Laemmli buffer.

Mass spectrometry analysis. Proteins were separated by SDS-PAGE (4–15% polyacrylamide; Mini-PROTEAN TGX Precast Gels, BIO-RAD) and stained with Protein Staining Solution (Euromedex). Gel lanes were cut into five gel pieces and destained with 50 mM triethylammonium bicarbonate/50% acetonitrile and three washes in 100% acetonitrile. Proteins were digested In-Gel using trypsin (1 µg/band; Gold, Promega) as described previously (Thouvenot et al., 2008).

The generated peptides were analyzed online by nano-flow liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) using a Quadrupole-Orbitrap mass spectrometer (Q-Exactive +, Thermo Fisher Scientific) coupled to an Ultimate RSLC (Thermo Fisher Scientific). Peptides were introduced onto the column in buffer A (0.1% formic acid) and separated with a 103 min gradient of 5–40% of buffer B (80% acetonitrile, 0.1% formic acid), both at a flow rate of 300 nl/min. Eluted peptides were electrosprayed online at a voltage of 1.8 kV into the Q-Exactive+ programmed in data-dependent acquisition mode. Full scans [375–1500 mass/charge ratio (m/z)] were acquired in the Orbitrap mass analyzer with a resolution of 70,000 at 200 m/z. For the full scans, 3E6 ions were accumulated within a maximum injection time of 60 ms and detected in the Orbitrap analyzer. The 12 most intense ions with charge states $\geq$2 were sequentially isolated to a target value of 1e5 with a maximum injection time of 45 ms and fragmented by HCD in the collision cell (normalized collision energy, 28%) and detected in the Orbitrap analyzer at 17,500 resolution.

Raw MS spectra were processed using the MaxQuant environment (version 1.5.5.1; Cox and Mann, 2008) and Andromeda for database search (Cox et al., 2011). The MS/MS spectra were matched against the UniProt Reference Proteome (Proteome ID UP000002494) of *Rattus norvegicus* (release 2017_12; http://www.uniprot.org) and 250 frequently observed contaminants, as well as reversed sequences of all entries. The following settings were applied: spectra were searched with a mass tolerance of 7 ppm (MS) and 0.5 m/z (MS/MS). Enzyme specificity was set to trypsin/P, and the search included oxidation of methionine and acetylation (protein N-term) as variable modifications. Up to two missed cleavages were allowed for protease digestion. The false discovery rate was set at 0.01 for peptides and proteins, and the minimal peptide length was set at 7.

The representative protein ID in each protein group was automatically selected using the in-house developed Leading tool (version 3.2; Raynaud et al., 2018). Experiments were repeated three times to assess biological reproducibility. Only proteins with a greater than twofold enrichment (based on the MS/MS ratio) and one unique peptide per protein were considered as potential partners of KCC2 (Table 1).

Venn diagrams were generated using the Venny tool (http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/). Gene ontology enrichment in the KCC2 interactome (271 candidate partners) was analyzed using the Cytoscape (version 3.6.1) ClueGO plugin (version 2.5.0; Shannon et al., 2003; Bindea et al., 2009), and the 2464 proteins identified in the three biological replicates as a reference dataset. The GO domains (GO Biological Processes, GO Cellular Components, and GO Molecular Functions) from EBIQuickGO-GOA (updated on April 4, 2018) were used. The UniProt identifiers were mapped to the selected annotations (GO evidence without inference from electronic annotations) with default ClueGO options in addition to the following selection criteria: 3–8 GO tree interval, a minimum of 10 genes from the list of 271 KCC2 candidate partners found to be associated to a term and that these genes represent at least 13% from the total number of associated genes. The statistical test used was an enrichment right-sided hypergeometric test with the Benjamini–Hochberg correction method.

Coimmunoprecipitation from rat cortical homogenates. Cortices were dissected from adult Sprague Dawley male rats and homogenized by sonication in coimmunoprecipitation buffer (1 ml/100 mg tissue) containing the following (in mM): 50 Tris-HCl, pH 7.4, 150 NaCl, 1 EDTA, 1% Triton X-100, and protease inhibitors, and solubilized by rotation for 4–6 h at 4°C. After centrifugation at 20,000 × g for 40 min at 4°C, the protein content of the supernatant was measured using the BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific). Solubilized proteins (5 mg/assay) were incubated with 5 μg of primary antibody [mouse anti-KCC2 (Merck); or mouse anti-gephyrin (Synaptic System)] or nonimmune IgG from the same species (Jackson ImmunoResearch) overnight at 4°C under rotation and immune complexes were precipitated with 20 µl of protein-G magnetic beads (Thermo Fisher Scientific) for 2 h at 4°C. Beads were then washed twice with 1 ml coimmunoprecipitation buffer and once with Triton-free coimmunoprecipitation buffer. Immunoprecipitated proteins were eluted in Novex NuPAGE LDS (4×) sample buffer for 1 h at 37°C separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting.

Transfection of Neuro2a cells. Neuro2a cells were grown in DMEM GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 1 g/L glucose and 10% fetal bovine serum. For biochemical assays, cells (60–70% confluent) were cotransfected using a ratio of 1:3 DNA and polyethyleneimine (PEI), respectively (5 µg of DNA and 15 µg of PEI; Polysciences), with plasmids encoding full-length, Flag-tagged rat KCC2b or KCC2$^-$CTD (Chamma et al., 2013; Chevy et al., 2015) and EGFP-tagged rat gephyrin (1:1 ratio; Battaglia et al., 2018) or EGFP as control (4:1 ratio). For immunocytochemistry, cells at 60–70% confluence were cotransfected using transfectin (BIO-RAD) according to manufacturer instructions with plasmids encoding full-length Flag-tagged rat KCC2 and either EGFP-tagged rat gephyrin (1:1 ratio) or EGFP (3:1 ratio). Coimmunoprecipitation and immuncytochemistry experiments were performed 2 d post-transfection.

Coimmunoprecipitation from Neuro2a cells. Forty-eight hours after transfection, cells were homogenized by brief sonication in coimmunoprecipitation buffer containing the following (in mM): 50 Tris-HCl, pH 7.4, 150 NaCl, 1 EDTA, 0.5% Triton X-100, and protease inhibitors. Cells were then solubilized by rotation for 2 h at 4°C and centrifuged at 20,000 × g for 30 min at 4°C. Solubilized proteins were incubated with 20 µl of prewashed anti-GFP-coupled beads (Chromoteck) overnight at 4°C under rotation. Beads were then washed twice with 1 ml of coimmunoprecipitation buffer and once with Triton-free coimmunoprecipitation buffer. Immunoprecipitated proteins were eluted in Novex NuPAGE LDS (4×) sample buffer for 1 h at 37°C, separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting.

Western blotting. Proteins were separated on a 4–12% SDS polyacrylamide gradient gel (Invitrogen) and transferred onto a nitrocellulose membrane (GE Healthcare). For coimmunoprecipitation assays from rat cortical homogenates, blots were probed with antibodies against KCC2 (rabbit, 1 µg/ml; catalog #MABN88, Merck) and gephyrin (mouse, 2 µg/ml; clone 3B11, Synaptic Systems). For coimmunoprecipitation assays from Neuro2a cells, blots were probed with GFP (mouse, 1 µg/ml; 4B10 clone, Cell Signaling Technology) and KCC2 (rabbit, 1 µg/ml; Merck) antibodies. Primary antibodies were detected with fluorescent secondary antibodies (0.3–1 µg/ml; DyLight 700 or 800, Rockland; or 0.07 µg/ml; IR700 or 800, LI-COR) using an Odyssey infrared imaging system (LI-COR). All biochemical assays were repeated at least three times on independent cortical extracts or cultures.

Immunocytochemistry. Immunocytochemistry was used to determine the surface/total KCC2 ratio. To stain the surface pool of KCC2, Neuro2a cells were incubated with anti-Flag antibody (mouse, 1 µg/ml; Merck) at 4°C for 30 min in HEPES-based medium, fixed with paraformaldehyde (4% w/v) supplemented with 4% (w/v) sucrose in PBS and incubated for 30 min in blocking buffer (10% normal goat serum in PBS). Then cells were incubated with goat anti-mouse Cy3 for 1 h at room temperature (0.75 µg/ml; Jackson ImmunoResearch) in blocking buffer. To reveal total (surface + intracellular) KCC2 pools, cells were then permeabilized for 4 min with 0.25% (v/v) Triton X-100 in PBS. After washes in PBS, cells were incubated for 30 min in blocking buffer and then with the anti-Flag antibody (mouse, 1 µg/ml; Merck) for 1 h at

Table 1. KCC2 Protein partners identified by MS

Gene name	UniProt ID	Protein name	TM	Ratio KCC2/sham MS-MS count N1	N2	N3	Mean ratio KCC2/sham. MS-MS count
*Slc12a5	Q63633	Solute Carrier Family 12 Member 5	x	214.0	11.7	77.4	101.0
*Canx	P35565	Calnexin	x	4.4	1.9	27.0	11.1
Npepps	F1M9V7	Aminopeptidase Puromycin Sensitive	x	3.0	1.7	28.0	10.9
Dpysl5	Q9JHU0	Dihydropyrimidinase-Like 5		2.0	1.5	21.0	8.2
*Jagn1	Q4KM64	Jagunal Homolog 1	x	5.0	17.0	2.0	8.0
Tkt	G3V826	Transketolase		1.7	2.1	20.0	7.9
Opa1	Q2TA68	Opa1, Mitochondrial Dynamin Like Gtpase	x	2.5	1.0	20.0	7.8
*Sfpq	A0A0G2K8K0	Splicing Factor Proline and Glutamine Rich		4.0	1.1	18.0	7.7
Immt	A0A0G2JVH4	Inner Membrane Mitochondrial Protein	x	2.0	1.0	20.0	7.7
Slc3a2	A0A0H2UHQ0	Solute Carrier Family 3 Member 2		2.7	1.3	19.0	7.6
*Cpsf6	D3ZPL1	Cleavage and Polyadenylation Specific factor 6		4.0	1.6	15.0	6.9
Hsp90b1	Q66HD0	Heat Shock Protein 90 β Family Member 1		5.0	1.1	14.0	6.7
Eef2	P05197	Eukaryotic Translation Elongation factor 2		3.5	1.6	14.0	6.4
Qars	Q66H61	Glutaminyl-Trna Synthetase		2.0	1.0	16.0	6.3
Ptprs	Q64605	Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type, S	x	1.6	3.3	14.0	6.3
Jup	Q6P0K8	Junction Plakoglobin		3.0	0.7	15.0	6.2
Slc25a12	F1LX07	Solute Carrier Family 25 Member 12	x	2.5	0.8	15.0	6.1
Adam22	F1M542	Adam Metallopeptidase Domain 22		3.0	1.0	14.0	6.0
Uggt1	Q9JLA3	Udp-Glucose Glycoprotein Glucosyltransferase 1		3.0	1.0	13.0	5.7
Hspa4l	F7F2F3	Heat Shock Protein 4-Like		3.5	1.4	12.0	5.6
Acsl6	P33124	Acyl-Coa Synthetase Long-Chain Family Member 6	x	3.0	1.3	12.0	5.4
Gucy1b3	P20595	Guanylate Cyclase 1 Soluble Subunit β 3		4.0	1.2	11.0	5.4
Gys1	A2RRU1	Glycogen Synthase 1		4.0	0.9	11.0	5.3
Dhx36	D4A2Z8	Deah-Box Helicase 36		6.0	1.4	8.0	5.1
*Slc8a2	P48768	Solute Carrier Family 8 Member A2	x	7.0	1.3	7.0	5.1
Slc27a1	Q6GMM8	Solute Carrier Family 27 Member 1		3.0	1.3	11.0	5.1
Letm1	Q5XIN6	Leucine Zipper and Ef-Hand Containing Transmembrane Protein 1	x	1.0	2.1	12.0	5.0
Aldh1l1	P28037	Aldehyde Dehydrogenase 1 Family, Member L1		5.0	1.1	9.0	5.0
Mars	D3Z941	Methionyl-Trna Synthetase		2.0	0.9	12.0	5.0
*Sec23a	A0A0G2JZM2	Sec23 Homolog A, Coat Complex II Component		2.0	0.9	12.0	5.0
Rph3a	F1LPB9	Rabphilin 3A		3.7	0.9	10.0	4.9
Sirpa	P97710	Signal-Regulatory Protein α	x	2.0	3.8	8.0	4.6
Trim28	O08629	Tripartite Motif-Containing 28		1.0	2.5	10.0	4.5
Kpnb1	F2Z3Q8	Karyopherin Subunit β 1		1.3	2.0	10.0	4.4
Ago1	D4AC38	Argonaute 1, Risc Catalytic Component		3.3	0.8	9.0	4.4
Elob	P62870	Transcription Elongation factor B Subunit 2		10.0	2.3	0.7	4.3
Slitrk5	M0R9U3	Slit and Ntrk-Like Family, Member 5		3.0	0.9	9.0	4.3
Exoc3	Q62825	Exocyst Complex Component 3		3.0	0.8	9.0	4.3
Syn3	O70441	Synapsin III		2.0	0.8	10.0	4.3
Sf3b1	G3V7T6	Splicing factor 3B, Subunit 1		4.0	0.7	8.0	4.2
Scyl1	Q5M9F8	Scy1 Like Pseudokinase 1		2.7	0.9	9.0	4.2
Srp72	D4A7R0	Signal Recognition Particle 72		2.0	1.5	9.0	4.2
*Gls	P13264	Glutaminase		4.0	1.4	7.0	4.1
Pspc1	Q4KLH4	Paraspeckle Component 1		1.0	2.0	9.0	4.0
Mta2	B2GV01	Metastasis Associated 1 Family, Member 2		4.0	0.9	7.0	4.0
Dlg4	P31016	Discs Large Maguk Scaffold Protein 4		2.0	0.9	9.0	4.0
Rpn2	P25235	Ribophorin II	x	4.0	1.4	6.0	3.8
N/A	A0A0G2JY03	Uncharacterized protein		2.0	1.2	8.0	3.7
$Fbxo_21$	F1M5Q6	F-Box Protein 21		4.5	0.7	6.0	3.7
Trim32	Q66H79	Tripartite Motif-Containing 32		2.0	1.2	8.0	3.7
Cadm2	Q1WIM2	Cell Adhesion Molecule 2	x	4.0	3.0	4.0	3.7
Copg1	Q4AEF8	Coatomer Protein Complex, Subunit γ 1		2.0	1.0	8.0	3.7
Pygm	G3V8V3	Phosphorylase, Glycogen, Muscle		2.0	0.9	8.0	3.6
Hnrnpl	F1LQ48	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein L		4.0	0.7	6.0	3.6
Rap1gap	F1LV89	Rap1 Gtpase-Activating Protein		2.7	0.8	7.0	3.5
Cttn	Q66HL2	Cortactin		3.5	0.9	6.0	3.5
Plaa	P54319	Phospholipase A2, Activating Protein		6.0	1.4	3.0	3.5
Vps33a	Q63615	Vps33A Corvet/Hops Core Subunit		2.3	0.9	7.0	3.4
Khsrp	Q99PF5	Kh-type Splicing Regulatory Protein		2.0	1.1	7.0	3.4
Upf1	A0A0U1RS25	Upf1, Rna Helicase and Atpase		2.0	1.1	7.0	3.4
Ndufs2	Q641Y2	Nadh Dehydrogenase Ubiquinone Fe-S Protein 2		6.0	2.0	2.0	3.3
Hyou1	Q63617	Hypoxia Up-Regulated 1		1.0	2.0	7.0	3.3

(*Table continues*.)

Table 1 Continued

Gene name	UniProt ID	Protein name	TM	Ratio KCC2/sham MS-MS count N1	N2	N3	Mean ratio KCC2/sham. MS-MS count
Iars	A0A0G2JVL8	Isoleucyl-Trna Synthetase		2.0	1.0	7.0	3.3
Mut	D3ZKG1	Methylmalonyl Coa Mutase		2.0	1.0	7.0	3.3
Faah	P97612	Fatty Acid Amide Hydrolase	x	1.0	3.0	6.0	3.3
**Adgrl2*	O88923	Adhesion G Protein-Coupled Receptor L2	x	1.0	3.0	6.0	3.3
Eif2ak3	Q9Z1Z1	Eukaryotic Translation Initiation factor 2 Alpha Kinase 3	x	4.0	0.9	5.0	3.3
Rangap1	F1MAA5	Ran Gtpase Activating Protein 1		2.0	0.7	7.0	3.2
**Prrt2*	D3ZFB6	Proline-Rich Transmembrane Protein 2	x	2.0	2.6	5.0	3.2
Aak1	P0C1X8	Ap2 Associated Kinase 1		2.0	1.8	5.8	3.2
Palm	Q920Q0	Paralemmin		3.0	1.1	5.5	3.2
Apoe	P02650	Apolipoprotein E		3.0	6.0	0.3	3.1
Ivns1abp	A0A0G2K427	Influenza Virus Ns1A Binding Protein		2.4	0.8	6.0	3.1
Slain2	G3V6A2	Slain Motif Family, Member 2		2.0	3.0	4.0	3.0
Dnm3	Q08877	Dynamin 3		1.0	2.0	6.0	3.0
Sdha	Q920L2	Succinate Dehydrogenase Complex Flavoprotein Subunit A		3.0	0.9	5.0	3.0
Slc6a11	P31647	Solute Carrier Family 6 Member 11	x	1.0	3.7	4.0	2.9
Madd	O08873	Map-Kinase Activating Death Domain		1.0	2.6	5.0	2.9
Ptpn11	P41499	Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor type 11		4.0	1.6	3.0	2.9
Camk2b	P08413	Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Beta		5.3	1.2	2.0	2.8
**Actn4*	Q9QXQ0	Actinin α 4		2.5	1.0	5.0	2.8
Mccc1	Q5I0C3	Methylcrotonoyl-Coa Carboxylase 1		2.0	0.4	6.0	2.8
Gps1	P97834	G Protein Pathway Suppressor 1		4.0	1.3	3.0	2.8
Vps45	O08700	Vacuolar Protein Sorting 45		2.0	1.3	5.0	2.8
Dlg1	Q62696	Discs Large Maguk Scaffold Protein 1		3.0	1.3	4.0	2.8
Sort1	O54861	Sortilin 1	x	3.0	1.3	4.0	2.8
Ubxn6	A0A0G2K012	Ubx Domain Protein 6		4.0	1.2	3.0	2.7
Edf1	P69736	Endothelial Differentiation-Related factor 1		4.0	2.8	1.4	2.7
**Ndufs1*	Q66HF1	Nadh Dehydrogenase Ubiquinone Fe-S Protein 1		2.0	1.1	5.0	2.7
Soga3	D4A0A1	Soga Family Member 3		2.3	0.8	5.0	2.7
Cops3	Q68FW9	Cop9 Signalosome Subunit 3		5.0	2.3	0.8	2.7
Cds2	Q91XU8	Cdp-Diacylglycerol Synthase 2		3.0	2.0	3.0	2.7
Syt2	P29101	Synaptotagmin 2	x	2.0	2.0	4.0	2.7
Hint1	P62959	Histidine Triad Nucleotide Binding Protein 1		2.0	5.0	1.0	2.7
Psmb6	P28073	Proteasome Subunit β 6		1.0	3.0	4.0	2.7
**Dhx9*	D4A9D6	Dexh-Box Helicase 9		5.0	1.0	2.0	2.7
Lmna	G3V8L3	Lamin A/C		2.0	1.0	5.0	2.7
Rpl12	P23358	Ribosomal Protein L12		4.0	1.0	3.0	2.7
Pank4	Q923S8	Pantothenate Kinase 4		2.0	1.0	5.0	2.7
Cul1	B1WBY1	Cullin 1		3.0	1.0	4.0	2.7
Psma3	P18422	Proteasome Subunit Alpha 3		3.0	3.5	1.5	2.7
Epb41l2	D3ZAY7	Erythrocyte Membrane Protein Band 4.1-Like 2		2.0	1.7	4.3	2.7
Mpp2	D3ZAA9	Membrane Palmitoylated Protein 2		2.3	1.5	4.2	2.7
Napb	F8WFM2	Nsf Attachment Protein β		5.0	2.3	0.4	2.6
Cntn1	Q63198	Contactin 1		1.5	2.7	3.5	2.6
Ehd1	Q641Z6	Eh-Domain Containing 1		2.0	2.7	3.0	2.6
Add1	Q63028	Adducin 1		2.0	1.0	4.6	2.5
Usp15	A0A0A0MY07	Ubiquitin Specific Peptidase 15		2.3	0.8	4.5	2.5
Synj1	Q62910	Synaptojanin 1		3.0	1.7	2.8	2.5
Rbmx	Q4V898	Rna Binding Motif Protein, X-Linked		5.0	2.0	0.5	2.5
Slc24a2	O54701-2	Sodium/potassium/calcium exchanger 2	x	1.0	4.5	2.0	2.5
Hepacam	D3ZEI4	Hepatic and Glial Cell Adhesion Molecule		2.0	1.5	4.0	2.5
Brsk2	D3ZML2-2	Serine/threonine-protein kinase BRSK2		2.0	1.4	4.0	2.5
Epb41l3	G3V874	Erythrocyte Membrane Protein Band 4.1-Like 3		2.0	1.3	4.0	2.4
Klhl22	D3ZZC3	Kelch-Like Family Member 22		2.0	1.3	4.0	2.4
Map3k7	P0C8E4	Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase 7		2.0	1.3	4.0	2.4
Wdr48	D3Z8C7	Wd Repeat Domain 48		3.0	1.3	3.0	2.4
Acadvl	P45953	Acyl-Coa Dehydrogenase, Very Long Chain		2.0	1.3	4.0	2.4
Gpd1	O35077	Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase 1		3.0	3.3	0.9	2.4
Krt77	Q6IG01	Keratin 77		5.0	2.0	0.2	2.4
Gphn	Q03555	Gephyrin		2.0	1.2	4.0	2.4
Ppm1e	Q80Z30	Protein Phosphatase, Mg2+/Mn2+ Dependent, 1E		2.0	1.1	4.0	2.4
Cadm3	Q1WIM3	Cell Adhesion Molecule 3	x	2.0	3.0	2.0	2.3

(*Table continues*.)

Table 1 Continued

Gene name	UniProt ID	Protein name	TM	Ratio KCC2/sham MS-MS count N1	N2	N3	Mean ratio KCC2/sham. MS-MS count
Acyp2	P35745	Acylphosphatase 2		2.0	3.0	2.0	2.3
Aplp1	F1LRS5	Amyloid Beta Precursor Like Protein 1	x	2.0	3.0	2.0	2.3
Poldip2	E9PT51	Dna Polymerase δ Interacting Protein 2		2.0	3.0	2.0	2.3
Brcc3	B2RYM5	Brca1/Brca2-Containing Complex, Subunit 3		3.0	2.0	2.0	2.3
Gria2	P19491	Glutamate Ionotropic Receptor Ampa type Subunit 2	x	1.0	2.0	4.0	2.3
Ggt7	Q99MZ4	γ-Glutamyltransferase 7	x	1.0	2.0	4.0	2.3
Cpne7	H1UBN0	Copine 7		1.0	3.0	3.0	2.3
Mtmr9	Q5XIN4	Myotubularin Related Protein 9		3.0	1.0	3.0	2.3
Gsta3	P04904	Glutathione *S*-Transferase β 1		1.0	2.0	4.0	2.3
Lrpprc	Q5SGE0	Leucine-Rich Pentatricopeptide Repeat Containing		4.0	0.7	2.3	2.3
Phgdh	O08651	Phosphoglycerate Dehydrogenase		2.0	3.7	1.2	2.3
Plec	Q6S399	Plectin		4.0	0.8	2.0	2.3
Eif5	Q07205	Eukaryotic Translation Initiation factor 5		4.0	2.0	0.8	2.3
Gap43	P07936	Growth Associated Protein 43		3.2	1.3	2.3	2.3
Pde1a	A0A0G2JZX9	Phosphodiesterase 1A		3.0	2.5	1.3	2.3
Sel1l	Q80Z70	Sel1L Erad E3 Ligase Adaptor Subunit	x	2.0	1.7	3.0	2.2
Rab3d	Q63942	Rab3D, Member Ras Oncogene Family		3.0	2.0	1.7	2.2
Ndrg2	Q8VBU2-2	Protein NDRG2		4.0	2.3	0.3	2.2
Prag1	D3ZMK9	Pragma Of Rnd2		4.0	0.5	2.0	2.2
Kcnj10	P49655	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily J Member 10	x	1.5	2.0	3.0	2.2
Ngef	Q5BKC9	Neuronal Guanine Nucleotide Exchange Factor		2.5	1.0	3.0	2.2
Rps5	P24050	Ribosomal Protein S5		3.0	3.0	0.4	2.1
Wasf3	M0R7F3	Was Protein Family, Member 3		3.0	0.4	3.0	2.1
Tnrc6b	A0A0G2K6R0	Trinucleotide Repeat Containing 6B		4.0	0.3	2.0	2.1
Dnajb12	Q5FVC4	Dnaj Heat Shock Protein Family Hsp40 Member B12	x	3.0	2.0	1.3	2.1
Dnajc5	P60905	Dnaj Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member C5		3.0	2.7	0.6	2.1
Gdap1	D4A5X7	Ganglioside-Induced Differentiation-Associated-Protein 1		2.0	3.5	0.7	2.1
Aldh2	P11884	Aldehyde Dehydrogenase 2 Family Mitochondrial		3.0	2.5	0.7	2.1
Copg2	D4ABY2	Coatomer Protein Complex, Subunit γ 2		2.0	1.2	3.0	2.1
Phactr1	P62024	Phosphatase and Actin Regulator 1		2.5	1.0	2.7	2.1
Nipsnap2	Q5RK08	Glioblastoma Amplified Sequence		3.0	1.1	2.0	2.0
Lsm4	D4A2C6	Lsm4 Homolog, U6 Small Nuclear Rna and Mrna Degradation Associated		2.0	2.0	2.0	2.0
Dnajb14	A0A0G2JTM9	Dnaj Heat Shock Protein Family Hsp40 Member B14	x	2.0	2.0	2.0	2.0
Lin7b	Q9Z252	Lin-7 Homolog B, Crumbs Cell Polarity Complex Component		1.0	3.0	2.0	2.0
Ndrg3	Q6AYR2	Ndrg Family Member 3		1.0	3.0	2.0	2.0
Hspa2	P14659	Heat Shock Protein Family A Member 2		2.0	3.0	1.0	2.0
Zwint	Q8VIL3	Zw10 Interacting Kinetochore Protein		3.0	2.0	1.0	2.0
Synm	A0A096MK54	Synemin		2.0	3.0	1.0	2.0
Gad2	Q05683	Glutamate Decarboxylase 2		1.0	2.0	3.0	2.0
**Fasn*	P12785	Fatty Acid Synthase		2.0	0.8	3.0	2.0
Vars	Q04462	Valyl-Trna Synthetase		2.0	1.6	2.3	1.9
Aspscr1	A0A0G2JWF4	Aspscr1, Ubx Domain Containing Tether For Slc2A4		2.0	0.8	3.0	1.9
**Lgi3*	D3ZN61	Leucine-Rich Repeat Lgi Family, Member 3		2.0	3.0	0.8	1.9
Rtn1	Q64548	Reticulon 1	x	2.1	1.2	2.4	1.9
Pitpna	P16446	Phosphatidylinositol Transfer Protein, α		2.0	3.3	0.4	1.9
Dync1i2	Q62871	Dynein cytoplasmic 1 intermediate chain 2		2.0	0.7	3.0	1.9
Magi2	A0A0G2JXR9	Membrane Associated Guanylate Kinase, Ww AND Pdz Domain Containing 2		2.5	0.2	3.0	1.9
Ubxn2b	P0C627	Ubx Domain Protein 2B		2.0	1.7	2.0	1.9
Vps16	Q642A9	Vps16 Corvet/Hops Core Subunit		2.0	0.6	3.0	1.9
Vsnl1	P62762	Visinin-Like 1		3.0	2.1	0.4	1.8
Adgrl1	O88917	Adhesion G Protein-Coupled Receptor L1	x	2.0	0.9	2.6	1.8
Gatad2b	Q4V8E1	Gata Zinc Finger Domain Containing 2B		2.0	0.5	3.0	1.8
Fbxl16	Q5MJ12	F-Box and Leucine-Rich Repeat Protein 16		3.0	2.0	0.5	1.8
**Ddx17*	E9PT29	Dead-Box Helicase 17		2.0	0.5	3.0	1.8
Mgp	P08494	Matrix Gla Protein		2.0	1.0	2.5	1.8
Abi1	Q9QZM5	Abl-Interactor 1		2.0	1.5	2.0	1.8
**Cct5*	Q68FQ0	Chaperonin Containing Tcp1 Subunit 5		2.2	1.1	2.1	1.8
Elavl1	B5DF91	Elav Like Rna Binding Protein 1		3.0	2.0	0.4	1.8
Sec22b	Q4KM74	Sec22 Homolog B, Vesicle Trafficking Protein	x	2.0	1.3	2.0	1.8
Rap1gds1	A0A0G2K1D2	Rap1 Gtpase-Gdp Dissociation Stimulator 1		2.3	2.2	0.8	1.8
Serpinh1	Q5RJR9	Serpin Family H Member 1		2.0	2.7	0.5	1.7

(*Table continues*.)

Table 1 Continued

Gene name	UniProt ID	Protein name	TM	Ratio KCC2/sham MS-MS count N1	N2	N3	Mean ratio KCC2/sham. MS-MS count
Tmx1	Q52KJ9	Thioredoxin-Related Transmembrane Protein 1		1.0	2.0	2.0	1.7
LOC367746	F1LPW6	Similar To Spindlin-Like Protein 2, Spin-2		2.0	1.0	2.0	1.7
Fn3k	D3ZZU8	Fructosamine 3 Kinase		2.0	2.0	1.0	1.7
Purb	Q68A21	Purine Rich Element Binding Protein B		2.0	1.0	2.0	1.7
Gstm5	Q9Z1B2	Glutathione *S*-Transferase, Mu 5		2.0	0.8	2.0	1.6
Napg	A0A0G2K350	Nsf Attachment Protein γ		2.0	2.2	0.5	1.6
Rab10	Q5RKJ9	Rab10, member Ras oncogene family		2.0	2.0	0.6	1.5
Naca	B2RYX0	Nascent Polypeptide-Associated Complex α Subunit		2.0	2.0	0.6	1.5
**Ina*	G3V8Q2	Internexin Neuronal Intermediate Filament Protein, α		2.0	0.5	2.0	1.5
Cpsf7	Q5XI29	Cleavage and Polyadenylation Specific Factor 7		2.0	0.5	2.0	1.5
Habp4	A1L1K8	Hyaluronan Binding Protein 4		2.0	0.3	2.2	1.5
Vps26b	B1WBS4	Vps26 Retromer Complex Component B		2.0	2.0	0.4	1.5
Hapln4	D3Z9H2	Hyaluronan and Proteoglycan Link Protein 4		2.0	2.0	0.3	1.4
Tst	P24329	Thiosulfate Sulfurtransferase		2.0	2.0	0.3	1.4
Acsm3	Q6SKG1	Acyl-Coa Synthetase Medium-Chain Family Member 3		0.0	12.0	5.0	5.7
Acly	P16638	Atp Citrate Lyase		0.0	2.5	10.0	4.2
Ezr	P31977	Ezrin		0.0	5.0	7.0	4.0
Acad9	B1WC61	Acyl-Coa Dehydrogenase Family, Member 9		0.0	2.0	9.0	3.7
Fip1l1	Q5U317	Factor Interacting With Papola and Cpsf1		0.0	3.0	8.0	3.7
Ehd4	Q8R3Z7	Eh-Domain Containing 4		0.0	6.0	4.0	3.3
Dpp10	Q6Q629	Dipeptidylpeptidase 10	x	0.0	2.0	8.0	3.3
Pdia3	P11598	Protein Disulfide Isomerase Family A, Member 3		0.0	2.8	7.0	3.3
Uba1	Q5U300	Ubiquitin-Like Modifier Activating Enzyme 1		0.0	2.8	7.0	3.3
Tf	A0A0G2QC06	Transferrin		0.0	2.5	7.0	3.2
Plxnb1	D3ZDX5	Plexin B1	x	0.0	3.0	6.0	3.0
Nomo1	D3ZSA9	Nodal Modulator 1		0.0	5.0	4.0	3.0
Stxbp5	Q9WU70	Syntaxin Binding Protein 5		0.0	2.0	7.0	3.0
Ogt	P56558	O-Linked *N*-Acetylglucosamine Glcnac Transferase		0.0	2.3	6.0	2.8
Cspg5	Q9ERQ6-2	Chondroitin Sulfate Proteoglycan 5	x	0.0	2.3	6.0	2.8
Efr3b	F1LTW9	Efr3 Homolog B		0.0	5.0	3.0	2.7
Kif21a	D4A1V5	Kinesin Family Member 21A		0.0	2.0	6.0	2.7
Tpp2	Q64560	Tripeptidyl Peptidase 2		0.0	3.7	4.0	2.6
Alcam	O35112	Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule	x	0.0	2.3	5.0	2.4
Lingo1	G3V881	Leucine Rich Repeat and Ig Domain Containing 1		0.0	4.0	3.0	2.3
ATP8	P11608	Atpase Subunit 8	x	0.0	3.0	4.0	2.3
Itfg1	Q5U355	Integrin Alpha Fg-Gap Repeat Containing 1	x	0.0	2.0	5.0	2.3
Pik3r4	P0C0R5	Phosphoinositide-3-Kinase, Regulatory Subunit 4		0.0	3.0	4.0	2.3
Scamp5	Q9JKE3	Secretory Carrier Membrane Protein 5	x	0.0	3.0	4.0	2.3
Mogs	O88941	Glucosidase 1	x	0.0	2.0	5.0	2.3
Cd200	A0A5D0	Cd200 Molecule		0.0	5.0	2.0	2.3
Gpm6b	Q9JJK1	Glycoprotein M6B	x	0.0	4.0	2.5	2.2
Pithd1	D4ABS5	Pith Domain Containing 1		0.0	2.5	4.0	2.2
S100b	P04631	S100 Calcium Binding Protein B		0.0	4.0	2.5	2.2
Pak1	P35465	P21 Activated Kinase 1		0.0	3.0	3.0	2.0
Abcb7	Q704E8	Atp Binding Cassette Subfamily B Member 7	x	0.0	4.0	2.0	2.0
**Hk1*	M0RAQ6	Hexokinase 1		0.0	4.0	2.0	2.0
Arl3	P37996	Adp Ribosylation factor Like Gtpase 3		0.0	4.0	2.0	2.0
Pfkl	P30835	Phosphofructokinase, Liver Type		0.0	2.0	4.0	2.0
Pex5l	Q925N3	Peroxisomal Biogenesis factor 5-Like		0.0	2.0	4.0	2.0
Llgl1	Q8K4K5	Llgl1, Scribble Cell Polarity Complex Component		0.0	4.0	2.0	2.0
RGD1307235	D3ZJ01	Similar to Riken Cdna 2310035C23		0.0	2.5	3.5	2.0
Ppp2r5d	F1MAA3	Serine/Threonine-Protein Phosphatase 2A 56 kDa Regulatory Subunit δ Isoform-Like		0.0	2.0	4.0	2.0
Hgs	Q9JJ50	Hepatocyte Growth Factor-Regulated Tyrosine Kinase Substrate		0.0	4.0	2.0	2.0
Tgm3	D4A5U3	Transglutaminase 3		4.0	2.0	0.0	2.0
Cadps	Q62717	Calcium Dependent Secretion Activator		0.0	2.0	3.3	1.8
Cd9	P40241	Cd9 Molecule	x	0.0	3.0	2.0	1.7
Map2k6	Q925D6	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 6		0.0	3.0	2.0	1.7
Vps33b	Q63616	Vps33B, Late Endosome and Lysosome Associated		0.0	2.0	3.0	1.7
Ccdc47	Q5U2X6	Coiled-Coil Domain Containing 47		0.0	2.0	3.0	1.7
Acyp1	D4A6X4	Acylphosphatase 1		0.0	2.0	3.0	1.7
Trappc8	F1M9W9	Trafficking Protein Particle Complex 8		0.0	2.0	3.0	1.7

(*Table continues*.)

Table 1 Continued

Gene name	UniProt ID	Protein name	TM	Ratio KCC2/sham MS-MS count N1	N2	N3	Mean ratio KCC2/sham. MS-MS count
Nup85	Q4QQS8	Nucleoporin 85		3.0	2.0	0.0	1.7
Stxbp5l	D3ZU84	Syntaxin Binding Protein 5-Like		0.0	3.0	2.0	1.7
Hectd3	F1LVZ9	Hect Domain E3 Ubiquitin Protein Ligase 3		0.0	3.0	2.0	1.7
Rtca	Q68FS8	Rna Terminal Phosphate Cyclase Domain 1		0.0	3.0	2.0	1.7
Slc12a2	E9PTX9	Solute Carrier Family 12 Member 2	x	0.0	3.0	2.0	1.7
Hbs1l	Q6AXM7	Hbs1-Like Translational Gtpase		0.0	2.0	3.0	1.7
Pi4k2a	Q99M64	Phosphatidylinositol 4-Kinase type 2 α		2.0	3.0	0.0	1.7
Padi2	P20717	Peptidyl Arginine Deiminase 2		0.0	2.0	3.0	1.7
Lypla1	P70470	Lysophospholipase I		0.0	2.0	2.5	1.5
Gnpnat1	B1H249	Glucosamine-Phosphate *N*-Acetyltransferase 1		0.0	2.0	2.0	1.3
Nub1	F7ES73	Negative Regulator of Ubiquitin-Like Proteins 1		0.0	2.0	2.0	1.3
Nolc1	P41777	Nucleolar and Coiled-Body Phosphoprotein 1		2.0	2.0	0.0	1.3
Pkp1	D3ZY51	Plakophilin 1		2.0	0.0	2.0	1.3
Ddt	P80254	D-Dopachrome Tautomerase		0.0	2.0	2.0	1.3
Ptpn9	Q641Z2	Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 9		0.0	2.0	2.0	1.3
Exoc8	O54924	Exocyst Complex Component 8		0.0	2.0	2.0	1.3
Carm1	Q4AE70	Coactivator-Associated Arginine Methyltransferase 1		0.0	2.0	2.0	1.3
Rapgef2	F1M386	Rap Guanine Nucleotide Exchange Factor 2		0.0	2.0	2.0	1.3
**Acat1*	P17764	Acetyl-Coa Acetyltransferase 1		0.0	2.0	2.0	1.3
Dnajc19	M0R6L8	Dnaj Heat Shock Protein Family Hsp40 Member C19		0.0	2.0	2.0	1.3
Shoc2	Q6AYI5	Shoc2 Leucine-Rich Repeat Scaffold Protein		0.0	2.0	2.0	1.3
Nrbp2	A0A0G2JT23	Nuclear Receptor Binding Protein 2		0.0	2.0	2.0	1.3
Cul4a	B2RYJ3	Cullin 4A		0.0	2.0	2.0	1.3
Anxa6	P48037	Annexin A6		0.0	2.0	2.0	1.3
Fabp3	P07483	Fatty Acid Binding Protein 3		0.0	2.0	2.0	1.3
Wasl	O08816	Wiskott-Aldrich Syndrome-Like		0.0	2.0	2.0	1.3

Gene name, corresponding UniProt ID, and protein name are indicated for each candidate. TM, Single or multiple predicted transmembrane domains, based on UniProt (04/2020). Only candidate protein partners with MS/MS ratio KCC2/sham >2 in at least two of the three replicates are shown, ranked first by the number of replicates in which they were identified and then by the descending mean MS-MS count in the three replicates.
*Candidates identified in the previous KCC2 interactome (Mahadevan et al., 2017).

room temperature. After washes in PBS, cells were incubated with secondary antibodies (goat anti-mouse Alexa Fluor 647; 1.5 µg/ml; Jackson ImmunoResearch) for 1 h at room temperature. Coverslips were washed in PBS and mounted in Mowiol/Dabco (25 mg/ml) solution. Quantification of surface (Cy3) to total (A647) KCC2 integrated immunofluorescence ratio was computed after background subtraction using ImageJ.

Primary hippocampal cultures. Neurons were prepared as described previously (Gauvain et al., 2011). Briefly, hippocampi were dissected from embryonic day 18–19 Sprague Dawley rats of both sexes. Tissue was then trypsinized (0.25% v/v), and mechanically dissociated in 1× HBSS (Thermo Fisher Scientific) containing 10 mM HEPES (Invitrogen). Neurons were plated at a density of 120×10^3 cells/ml onto 18-mm-diameter glass coverslips (Assistent) precoated with 55 µg/ml poly-D,L-ornithine (Sigma-Aldrich) in plating medium composed of Minimum Essential Medium (Sigma-Aldrich) supplemented with horse serum (10% v/v; Thermo Fisher Scientific), L-glutamine (2 mM), and Na-pyruvate (1 mM; Thermo Fisher Scientific). After attachment to coverslips for 3–4 h, cells were incubated in culture medium composed of Neurobasal Medium supplemented with B27 (1×), L-glutamine (2 mM), and antibiotics (penicillin, 200 U/ml; streptomycin, 200 µg/ml; Thermo Fisher Scientific) for up to 4 weeks at 37°C in a 5% CO_2 humidified incubator. Each week, one-third of the culture medium was renewed. For pharmacological silencing (see Figs. 3, 4), tetrodotoxin (TTX, 1 μM; Latoxan), (RS)-α-methyl-4-carboxyphenylglycine (MCPG; 500 μM), 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfonyl-benzo[*f*]quinoxaline (NBQX; 10 μM), and D-2-amino-7-phosphonovalerate (D-APV; 50 μM; all from HelloBio) were directly added to the culture medium, and neurons were used 12–16 h later for immunocytochemistry or electrophysiology.

Transfection of primary hippocampal cultures. Transfections were conducted at day *in vitro* (DIV_ 13–14 using transfectin, according to the manufacturer instructions (DNA/transfectin ratio, 1 µg:3 µl), with 1 µg of plasmid DNA per 20 mm well. Plasmids encoding Flag-KCC2 (Chamma et al., 2013), EGFP, and shRNA sequences (either nontarget or gephyrin specific; Battaglia et al., 2018) were cotransfected in a ratio of 0.4:0.2:0.4 μg. Immunocytochemistry experiments were performed 8 d post-transfection. For chloride imaging, neurons were cotransfected with a vector expressing cyan fluorescent protein (CFP)-yellow fluorescent protein (YFP)-based chloride sensor (a gift from P. Bregestovski, Institut de Neurosciences des Systèmes, Marseille, France; Markova et al., 2008; Chamma et al., 2013) and shRNA plasmids as above, at a ratio of 1:3 for Cl-sensor and shRNA vectors, respectively.

Immunocytochemistry of KCC2 surface clusters in neurons. For KCC2 surface immunostaining, neurons were incubated with anti-Flag antibody (mouse; 1 µg/ml; Merck) at 13°C for 20 min in conditioned culture medium (Friedel et al., 2015), rinsed with HEPES-based buffer, fixed with paraformaldehyde (4% w/v) supplemented with 4% (w/v) sucrose in PBS, and incubated for 30 min in blocking buffer (10% v/v normal goat serum in PBS). Then cells were incubated with goat anti-mouse Cy3 for 1 h at room temperature (0.75 µg/ml; Jackson ImmunoResearch) in blocking buffer and permeabilized with 0.25% (v/v) Triton X-100 in PBS. After washing in PBS, cells were incubated for 30 min in blocking buffer and then with anti-Flag antibody (mouse; 1 µg/ml; Merck), anti-VGAT antibody (rabbit; 2 µg/ml; catalog #131002, Synaptic Systems), and anti-GFP antibody (chicken; 2 µg/ml; catalog #AB16901, Merck) at 4°C overnight. After washing in PBS, cells were incubated with secondary antibodies [donkey anti-mouse 7-amino-4-methylcoumarin-3-acetate (AMCA), goat anti-rabbit Alexa Fluor 647, and donkey anti-chicken Alexa Fluor 488, all at 1.5 µg/ml; Jackson ImmunoResearch] for 1 h at room temperature. Coverslips were washed in PBS and mounted in Mowiol-DABCO (25 mg/ml) solution.

Fluorescence image acquisition and analysis. Image acquisition was performed using an upright epifluorescence microscope (model

DM6000 or DM6000-2, Leica) equipped with a 63× objective [numerical aperture (NA), 1.32] and a 12 bit cooled CCD camera (Micromax, Roper Scientific) run by MetaMorph software (Roper Scientific). For analysis, image exposure time was set on bright cells to maximize fluorescence to noise ratio and avoid saturation. All cells from the same culture were then imaged using these acquisition parameters. For illustration, stacks (*z*-step: 0.2 µm) of immunofluorescence images were acquired with an upright confocal microscope (Leica TCS SP5), using a 63× 1.40–N.A (zoom, 5–6×) objective and lasers set at 405, 488, 561 and 633 nm for excitation of DAPI or AMCA, EGFP, Cy3 and Alexa 647, respectively.

Analysis of VGAT and KCC2 clusters was performed using MetaMorph software (Roper Technologies). Image files were first randomized before analysis. For each neuron, a well focused dendrite was chosen and a region of interest (ROI) surrounding the dendrite was manually selected. Only primary dendrites were considered. The region of interest started after the cell body and, when possible, the entire dendrite (~20–130 µm) was considered so that no cluster was excluded from the analysis. Images were then flattened, background filtered (core size, 3 × 3 × 2) to enhance cluster contours, and a user-defined intensity threshold was applied to select clusters and avoid their coalescence. A VGAT cluster was only considered if it exceeded a size of three pixels. This excluded most of the mobile, nonsynaptic VGAT clusters or background. Clusters were then delineated, and the corresponding regions were transferred to the raw images to determine the average number of clusters, and their area and fluorescence intensity. For quantification of perisynaptic KCC2 clusters, only clusters comprising at least three pixels and colocalized over at least 1 pixel with clusters of VGAT were considered. Then, the ROI area was measured to determine the number of clusters per unit area. For each culture, we analyzed ~10 cells per experimental condition. Because of variability in synapse density between cultures, cluster density in each culture was normalized to control values, allowing for comparisons between cultures. The density, area, and integrated intensity of all clusters in the ROI was then computed. For surface/total KCC2 ratios, 2–5 dendritic sections per neuron were selected using ImageJ based on GFP fluorescence of transfected neurons. These ROIs were then copied to Cy3 (surface KCC2) or Cy5 (total KCC2) images to extract mean fluorescence intensities that were then corrected for background.

Chloride imaging. Transfected neurons were imaged 7–10 d post-transfection in extracellular medium containing the following (in mM): NaCl 120, D-glucose 20, HEPES 10, $MgCl_2$ 3, KCl 2, $CaCl_2$ 2, pH 7.4, in a temperature-controlled open chamber maintained at 31°C, mounted onto an Olympus IX71 inverted microscope equipped with a 60× objective (1.42 NA; Olympus). CFP and YFP were detected using a Lambda DG-4 monochromator (Sutter Instruments) coupled to the microscope through an optic fiber with appropriate filters (excitation, D436/10× and HQ485/15×; dichroic, 505DCXR; emission, HQ510lp; CFP and YFP filters; Chroma Technology). Images were acquired using an ImagEM EMCCD camera (Hamamatsu Photonics) and MetaFluor software (Roper Scientific). The mean fluorescence intensity was measured in the somatic area, and a dendritic section on the last 10 consecutive frames. Mean background fluorescence was subtracted and the ratio F_{440}/F_{480} was computed using ImageJ software.

Cellular electrophysiology. Neurons were maintained at 33°C in an extracellular medium containing the following (in mM): NaCl 120, D-glucose 20, HEPES 10, $MgCl_2$ 3, KCl 2, $CaCl_2$ 2, pH 7.4, D-APV 0.05 (HelloBio), NBQX 0.01 (HelloBio), CGP54626 0.1 (Tocris Bioscience), MCPG 0.5 (HelloBio), and TTX 0.001 (Latoxan) in a recording chamber (Luigs & Neumann) equipping an upright microscope (model BX51WI, Olympus). Neurons were patch clamped in whole-cell configuration, with a borosilicate glass pipette containing (in mM): K-gluconate 104, KCl 25.4, HEPES 10, EGTA 10, MgATP 2, Na_3GTP 0.4, and $MgCl_2$ 1.8, pH 7.4, and held at −65 mV. GABAergic currents were induced at the somatic or dendritic level (~50–100 µm from the soma), by local photolysis 4 ms/10–50 mW on the soma, 8 ms/60–90 mW on the distal dendrites of caged GABA (30 µM; RuBi-GABA, Abcam). The photolysis was performed using the beam (3–5 µm) of a laser diode digitally modulated at 405 nm (Deepstar, Omicron; Photon Lines) and focused through the lens using a photolysis module (Prairie Technologies). Since the low concentration of RuBi-GABA is unlikely to activate synaptic receptors, we did not attempt to specifically target GABAergic synapses. Neurons were voltage clamped from −85 to −5 mV with 3.5 s step increments of 10 mV. The current–voltage relation (*I–V*) of somatic and dendritic currents was then calculated from the peak amplitude of GABAergic currents recorded at each potential, corrected for the liquid junction potential (−15.2 mV in our conditions) and voltage drop across the access resistance.

Statistics. Data were compared using the nonparametric Mann–Whitney test using SigmaPlot13 (SPSS). If normality (Shapiro-Wilk test) and equal variance tests passed, means were instead compared using a *t* test (two tailed). Significance was determined as $p < 0.05$.

Results

KCC2 interactome in rat neocortex

We used an affinity-purification coupled to MS proteomic strategy to identify KCC2 protein partners in rat neocortical neurons. As antibodies raised against intracellular KCC2 domains may prevent interaction with multiple known partners (Inoue et al., 2004; Li et al., 2007; Mahadevan et al., 2017), we infected rat neocortex with an AAV vector expressing a recombinant, extracellularly Flag-tagged KCC2b construct previously validated for normal membrane traffic and expression in hippocampal neurons *in vitro* (Fig. 1*A*,*B*; Chamma et al., 2013). Expression was restricted to principal neurons by the use of a CaMKII promoter. Two weeks after infection, infected rat cortices showed robust expression of recombinant KCC2, as detected by Western blotting using a Flag antibody (Fig. 1*C*). Immunoprecipitation with Flag antibody yielded concentrated recombinant KCC2, in both monomeric (150 kDa) and oligomeric (>300 kDa) forms (Fig. 1*D*).

The immunoprecipitated fraction was then processed for LC-MS/MS, and detected peptides were matched to the protein database (see Materials and Methods). We observed peptides corresponding to both KCC2 isoforms a and b with a mean MS/MS ratio >100 in extracts from Flag-KCC2-expressing cortices compared with sham rat cortices (Fig. 1*E*, Table 1). A total of 2464 proteins were identified with at least one unique peptide from the three biological replicates. Of these, 271 proteins showed at least a twofold enrichment, assessed by spectral count, in protein extracts from Flag-KCC2-expressing cortices, compared with sham in at least two of three replicates, and 17 proteins were enriched in KCC2 immunoprecipitates in the three replicates (Fig. 1*F*, Table 1). The latter included the amyloid precursor protein Aplp1 recently identified as a regulator of KCC2 expression (Doshina et al., 2017) as well as the chaperone protein Calnexin (Canx) and the endoplasmic reticulum transmembrane protein Jagunal Homolog 1 (Jagn1), both identified in a KCC2 interactome study under native conditions using a multiepitope strategy (Mahadevan et al., 2017), thus validating the experimental strategy used in the current study.

Gene ontology analysis of the KCC2 interactome shows enrichment in "integral component of plasma membrane" GO annotation and, more interestingly, in "synaptic transmission" and "dendritic spine development" annotations (Fig. 1*G*), two major known functions of KCC2 in neurons (Chamma et al., 2012; Blaesse and Schmidt, 2015). In particular, several members of the 4.1 family known to interact with KCC2 (Li et al., 2007) were identified in the latter. We also identified many proteins enriched in biological processes related to vesicular trafficking,

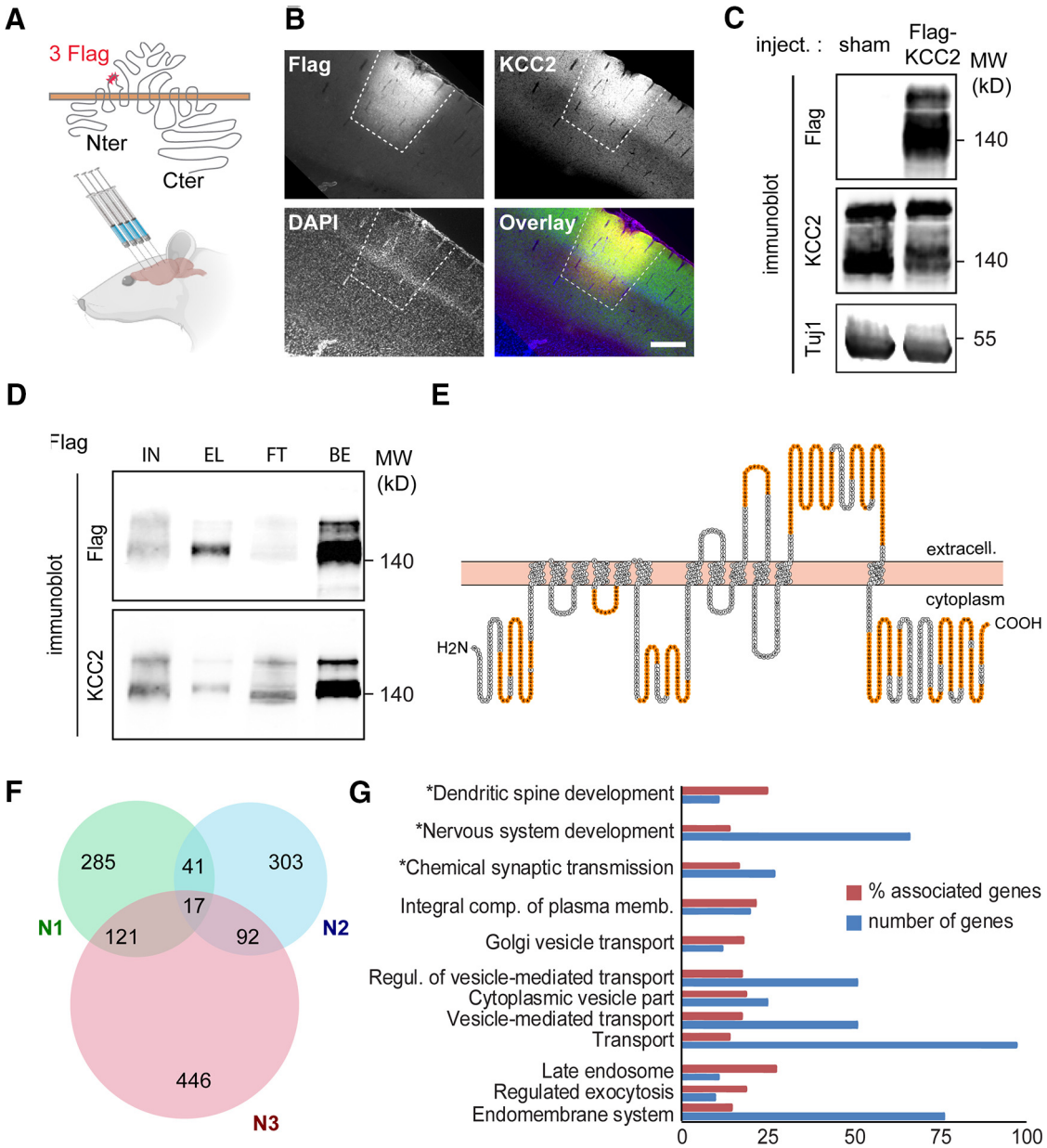


Figure 1. Recombinant Flag-tagged KCC2 *ex vivo* interactome. ***A***, Experimental paradigm. An AAV2.1 vector expressing an extracellularly Flag-tagged, full-length rat KCC2b construct was stereotaxically injected in the cortex of young adult rats (four injection sites per animal). Sham animals received carrier (PBS) injection. ***B***, Confocal fluorescent micrographs (and overlay, with DAPI staining, blue) of cortical slices of an infected rat, immunostained with Flag (red) and KCC2 (green) antibodies, showing widespread expression of recombinant Flag-KCC2 at one virus injection site (dashed lines). Scale bar, 250 μm. ***C***, Western blots of protein extracts from cortices of rats infected with Flag-KCC2 expressing AAV (Flag-KCC2) or sham animals (sham), using Flag and KCC2 antibodies, showing massive expression of recombinant KCC2 in the former. ***D***, Western blots of protein extracts from cortices of rats infected with Flag-KCC2-expressing AAV (KCC2), immunoprecipitated with Flag antibody, and probed with Flag (top) and KCC2 (bottom) antibodies, showing specific enrichment of recombinant KCC2 in the EL used for LC-MS/MS analysis. Most of solubilized Flag-KCC2 present in the total lysate (IN, here 50 μg proteins) was immunoprecipitated (EL), as evidenced by the very low Flag signal in the FT fraction. BS, Flag-KCC2 (bait) fraction bound to the beads on elution. ***E***, KCC2 amino acid sequence (from Protter; Omasits et al., 2014) with peptides identified by LC-MS/MS in orange. ***F***, Venn diagram showing the total number of Flag-KCC2 interacting proteins in the three biological replicates (N1, N2, and N3). Proteins identified in at least two of three replicates ($n = 271$) were considered for further analysis. ***G***, Gene ontology enrichment analysis of the 271-protein list using all identified proteins as a reference list performed with ClueGO. Number of genes, Number of genes from our list that were associated with the GO term; % associated genes, number of genes from our list associated with the GO term divided by the total number of genes associated with the term. Only GO terms with a significant enrichment (right-sided hypergeometric test, $p < 0.05$) are shown. GO terms comprising KCC2 are marked with an asterisk.

such as "Golgi vesicle transport," "late endosome,"and "regulated exocytosis." These include exocyst complex component 8 (Exoc8), actinin α 4 (Actn4), and Ras-associated binding protein 10 (Rab10), as well as proteins involved in intracellular microtubule-dependent transport such as dynein cytoplasmic 1 intermediate chain 2 (Dync1i2), and kinesin family member 21A (Kif21a). Those may be of great interest for dissecting molecular and cellular mechanisms of KCC2 trafficking.

KCC2 interacts with gephyrin via its cytoplasmic C-terminal domain

Candidate KCC2 interacting proteins also included gephyrin (Table 1), the main scaffolding protein of $GABA_A$ and glycine receptors at inhibitory synapses (Tyagarajan and Fritschy, 2014). We therefore evaluated KCC2–gephyrin interaction in coimmunoprecipitation assays of native proteins using protein lysates from adult rat cortices. We showed that an anti-KCC2 antibody

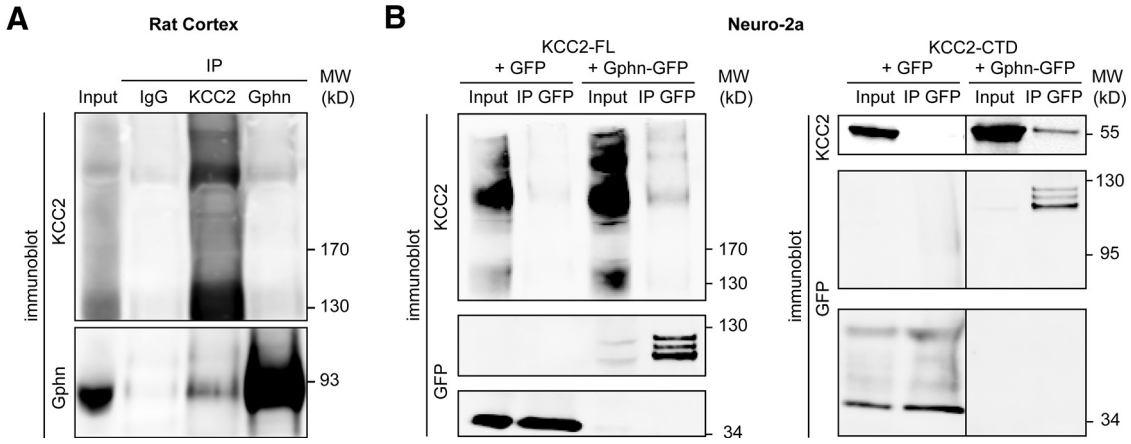


Figure 2. KCC2 interacts with gephyrin via its C-terminal domain. ***A***, Immunoblot of coimmunoprecipitation samples prepared from adult rat cortex. Solubilized membrane homogenates (input) were immunoprecipitated with antibodies raised against gephyrin (Gphn), KCC2 or with control IgG. Input and immunoprecipitated proteins were probed with both KCC2 (top) and gephyrin (bottom) antibodies. ***B***, Immunoblots of immunoprecipitates from Neuro2a cell homogenates coexpressing either Flag-tagged full-length KCC2 (KCC2-FL, left) or KCC2-CTD (right) and either GFP-tagged gephyrin (Gphn-GFP) or GFP. Input and immunoprecipitated proteins were probed with both KCC2 (top) and GFP (bottom) antibodies. Immunoprecipitation with GFP antibody pulled down full-length KCC2 and KCC2-CTD in cells expressing Gphn-GFP but not GFP only. Representative blots from four and three independent experiments are shown in ***A*** and ***B***, respectively.

pulled down gephyrin (Fig. 2*A*), indicating an interaction between the endogenous proteins in cortical neurons. However, just like gephyrin interaction with $GABA_A$ receptors ($GABA_A$Rs; Kasaragod and Schindelin, 2018), interaction with KCC2 may be relatively weak, and we did not always observe KCC2 immunoprecipitation using gephyrin antibody (Fig. 2*A*). However, to further characterize KCC2–gephyrin interaction, we also performed coimmunoprecipitation assays from proteins extracts from Neuro2a cells expressing recombinant Flag-tagged KCC2 and EGFP-tagged gephyrin (Fig. 2*B*). In lysates from cotransfected cells, the anti-GFP nanobodies coupled to agarose (GFP-Trap) pulled down Flag-KCC2 in EGFP-gephyrin-expressing cells but not in cells expressing EGFP only.

KCC2 interaction with the FERM-domain, spectrin/actin binding protein 4.1N and brain-type creatine kinase has been shown to involve the long KCC2-CTD (Inoue et al., 2004; Li et al., 2007). We then tested whether this cytoplasmic domain (KCC2-CTD) was also sufficient to recruit gephyrin. Reminiscent of the results obtained in cells expressing full-length KCC2, EGFP immunoprecipitation pulled down KCC2-CTD in protein extracts from cells expressing EGFP-gephyrin but not cytosolic EGFP (Fig. 2*B*). This result demonstrates that KCC2 interacts with gephyrin at least in part via its C-terminal cytoplasmic domain.

Gephyrin regulates KCC2 surface expression and clustering near GABAergic synapses

Whereas the mechanisms of KCC2 clustering near glutamatergic synapses have been partly identified (Chamma et al., 2013), those involved near GABAergic synapses remain unknown. We therefore asked whether interaction with gephyrin may contribute to KCC2 aggregation near GABAergic synapses.

We first overexpressed recombinant, Flag-tagged KCC2 together with either recombinant EGFP-tagged gephyrin or cytosolic EGFP alone in Neuro2a cells. We performed dual immunostaining of both plasmalemmal and total Flag-KCC2 (see Materials and Methods). Quantification of plasmalemmal and total Flag-KCC2 immunofluorescent signals showed that surface/total KCC2 immunostaining was twice as elevated in Neuro2a cells coexpressing EGFP-gephyrin compared with cells expressing EGFP (Fig. 3*A*,*B*; $p < 0.01$). In addition, KCC2 and gephyrin clusters were observed and often colocalized in cells coexpressing recombinant EGFP-gephyrin and Flag-KCC2 (Fig. 3*A*, arrowheads). These results suggest that gephyrin interaction with KCC2 may act to promote KCC2 membrane expression in heterologous cells.

To further characterize the role of gephyrin on KCC2 plasma membrane localization and clustering, we then explored the impact of chronic gephyrin knockdown on KCC2 plasmalemmal expression in hippocampal neurons. Primary hippocampal cultures were transfected with nontarget shRNA (shNT) or a previously validated gephyrin-directed shRNA (shGphn; Yu et al., 2007; Battaglia et al., 2018) together with EGFP. Gephyrin immunostaining revealed an ~40% reduction in immunofluorescence in gephyrin knock-down neurons compared with controls (Fig. 4*A*,*B*; $p < 0.001$). However, this may underestimate the actual reduction in gephyrin expression, since the dendrites of transfected neurons were often overlapping with those of nontransfected neurons expressing gephyrin. Since gephyrin knockdown may reduce the inhibitory synaptic drive onto hippocampal neurons (Lévi et al., 2004) and promote hyperexcitability, transfected cultures were kept for 24 h in the presence of blockers of glutamatergic transmission and TTX (see Materials and Methods). In these conditions, neurons expressing nontarget shRNA showed surface KCC2 immunostaining typical of mature hippocampal neurons, with numerous clusters in apposition to the vesicular transporters VGAT (Fig. 4*C*, inset). The mean area of KCC2 clusters facing VGAT-immunopositive terminals in primary dendrites of hippocampal neurons was 0.57 ± 0.14 μm^2 ($n = 28$ neurons). In gephyrin knock-down neurons, the density of KCC2 clusters apposed to VGAT-immunopositive terminals was reduced by ~45% ($p = 0.002$), suggesting that KCC2 clustering near GABAergic synapses depends on gephyrin. In addition, mean cluster intensity and area were reduced by ~44% and 40%, respectively ($p = 0.004$ and 0.006, respectively; Fig. 4*D*). These changes were not associated with a significant change in the area of VGAT-immunopositive terminals ($p = 0.62$; Fig. 4*E*) and were also observed, yet to a lesser extent, for KCC2 clusters not facing VGAT-positive terminals. Thus, the mean

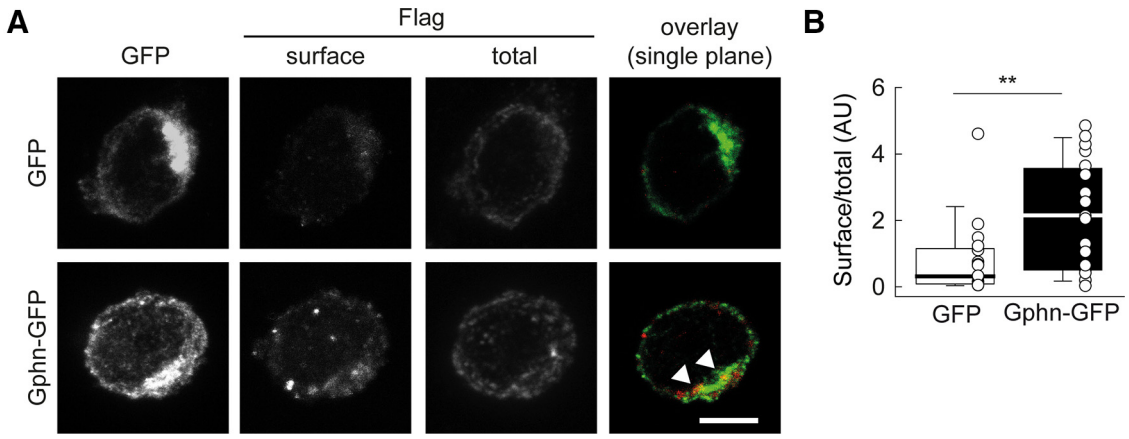


Figure 3. Gephyrin regulates KCC2 membrane expression and clustering in Neuro2a cells. ***A***, Representative confocal maximum projection images of Neuro2a cells cotransfected with plasmids encoding either GFP or GFP-tagged gephyrin (Gphn-GFP) and a plasmid encoding Flag-tagged KCC2. Cells were immunostained for surface and total KCC2 using anti-Flag antibodies. Right, Single confocal image showing overlay of surface Flag (red) and GFP (green) immunostainings. Note the colocalization of surface Flag-KCC2 and GFP-gephyrin immunofluorescent clusters (arrowheads). Scale bar, 5 μm. ***B***, Summary boxplots showing normalized surface/total Flag immunofluorescence intensity ratios (GFP, $n = 18$; GFP-gephyrin, $n = 20$ cells; three independent experiments). $^{**}p < 0.01$, Mann–Whitney rank-sum test.

intensity of recombinant KCC2 clusters not colocalized with VGAT-immunopositive clusters was also reduced by ~30% ($p = 0.048$; Fig. 4*D*). Finally, the ratio of plasmalemmal over total recombinant KCC2 ratio was not affected in gephyrin knock-down neurons compared with controls, suggesting that the lack of gephyrin may prevent clustering of plasmalemmal KCC2 without reducing its total membrane expression. These results demonstrate that KCC2 clustering in the plasma membrane, both near and outside GABAergic synapses, is strongly regulated by gephyrin expression in hippocampal neurons.

Gephyrin expression controls chloride extrusion in hippocampal neurons

KCC2 plasma membrane expression and clustering are tightly correlated with its ion transport function (Watanabe et al., 2009; Chamma et al., 2013; Heubl et al., 2017). We, therefore, examined whether gephyrin expression also regulates KCC2-dependent chloride extrusion in hippocampal neurons. This was first tested by measuring steady-state intracellular chloride concentrations using a ratiometric CFP/YFP-based chloride sensor (Markova et al., 2008; Chamma et al., 2013). In gephyrin knock-down neurons, F_{440}/F_{480} ratio (which we previously showed positively correlates with intracellular chloride concentration in the 5–100 mM range; Chamma et al., 2013), increased by ~30% ($p = 0.016$; Fig. 5*A*,*B*), suggesting that gephyrin knockdown led to increased intracellular chloride compared with control neurons.

However, such steady-state chloride measurements do not provide a direct evaluation of the efficacy of KCC2-mediated chloride extrusion (as discussed in the review by Virtanen et al., 2021). We thus tested transmembrane chloride export by comparing the reversal potential of $GABA_AR$-mediated currents (E_{GABA}) evoked by local photolysis of RuBi-GABA onto the soma and dendrite of hippocampal neurons whole-cell recorded with high-chloride (29 mM) intracellular solution. We and others had shown that the somatodendritic gradient of E_{GABA} measured in these conditions provides a reliable estimate of KCC2 function as it is nearly abolished by a specific KCC2 antagonist (Khirug et al., 2008; Gauvain et al., 2011; Otsu et al., 2020; Fig. 5*C*). Under these recording conditions, somatic E_{GABA} in neurons transfected with nontarget shRNA was more hyperpolarized than estimated E_{Cl} derived from the Nernst equation (approximately −40 mV; Fig. 5*E*), as previously observed (Otsu et al., 2020). Dendritic E_{GABA} was likewise consistently more hyperpolarized than somatic E_{GABA} by ~5 mV/100 μm (Fig. 5*D*). In neurons expressing the shRNA against gephyrin, somatic E_{GABA} was depolarized by ~7 mV ($p < 0.01$) compared with neurons expressing nontarget shRNA, while the somatodendritic E_{GABA} gradient (ΔE_{GABA}) was significantly reduced and nearly abolished ($p < 0.001$; Fig. 5*E*). These observations were independent of whether cultures were chronically silenced with TTX and glutamate receptor antagonists, suggesting that they do not reflect changes in synaptic or intrinsic activity induced by gephyrin knockdown. Together, these results demonstrate that gephyrin expression strongly regulates membrane KCC2 expression and aggregation as well as its ion transport function in hippocampal neurons.

Discussion

Our data provide a novel KCC2 interactome confirming previously demonstrated protein partners and identifying new ones. They demonstrate for the first time the critical role of gephyrin in regulating KCC2 membrane expression and function in hippocampal neurons. We show that endogenous KCC2 interacts with gephyrin *ex vivo* and that recombinant tagged gephyrin and KCC2 interact in heterologous cells. This interaction regulates KCC2 plasma membrane localization in both Neuro2a and hippocampal neurons *in vitro*. In the latter, gephyrin is not strictly required for the formation of plasmalemmal KCC2 clusters but strongly regulates their size and content. Finally, we show that gephyrin expression critically regulates KCC2-mediated chloride extrusion in mature hippocampal neurons, revealing gephyrin as a novel key KCC2 regulator.

A novel KCC2 interactome

KCC2 forms macromolecular complexes with protein partners that control both its membrane expression and function, and, reciprocally, that are regulated through their interaction with KCC2. Thus, identifying KCC2 protein partners has shed light on novel modalities of KCC2 regulation as well as unsuspected roles for KCC2 in neurons. Most interactions have been identified using yeast two-hybrid screens and coimmunoprecipitation assays. For example, the clathrin-binding AP-2 (adaptor protein-

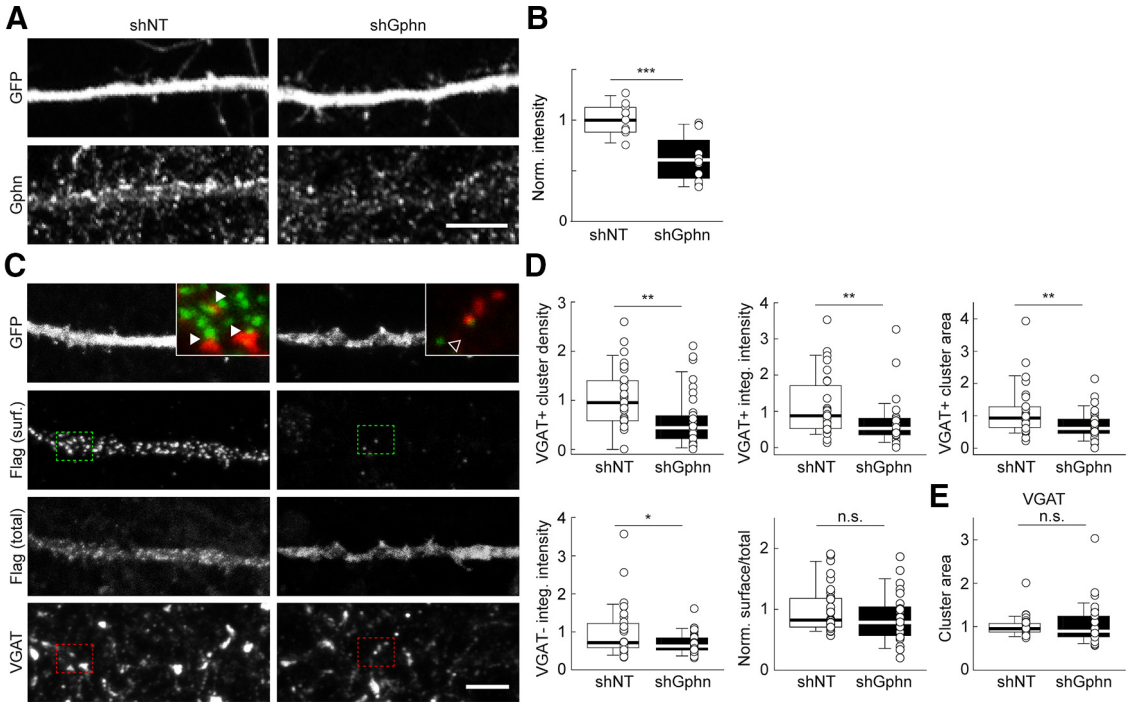


Figure 4. Gephyrin regulates plasmalemmal KCC2 clustering in hippocampal neurons. ***A***, Representative confocal maximum projection images of dendritic sections of hippocampal neurons transfected with a plasmid encoding GFP and either shNT or shGphn, and immunostained for GFP and gephyrin. Note that dendrites of neighboring, nontransfected neurons display gephyrin immunostaining overlapping with that of transfected neurons. Scale bar, 10 μm. ***B***, Summary boxplots showing the intensity of gephyrin immunofluorescence of neurons transfected with shNT and shGphn, normalized to that of shNT-expressing neurons. $^{***}p < 0.001$, Mann–Whitney rank-sum test. ***C***, Representative confocal maximum projection images of hippocampal neurons as in ***A***, after live immunostaining for Flag to probe plasmalemmal recombinant KCC2 [Flag (surf.)] and postfixation immunostaining for Flag [Flag (total)] and VGAT. Insets, overlays of live Flag-KCC2 (red) and postfixation VGAT (green) immunostaining from areas boxed in full-scale images. Note the apposition of surface Flag-KCC2 and VGAT immunofluorescent clusters (arrowheads) in control but not gephyrin knock-down neurons (open arrowhead). Scale bar, 5 μm. ***D***, Summary boxplots showing the properties of Flag-KCC2-immunopositive clusters colocalizing ($VGAT^+$, top three plots) or not ($VGAT^-$, lower left boxplot) with VGAT-immunopositive clusters, all normalized to control (shNT). Gephyrin knock-down neurons showed reduced Flag-KCC2 $VGAT^+$ and $VGAT^-$ mean cluster density, intensity, and area. This effect was not accompanied by significant changes in surface/total Flag-KCC2 immunofluorescence (bottom middle boxplot). ***E***, No change in the mean area of VGAT clusters was observed on gephyrin knockdown. shNT, $n = 32$ cells; shGphn, $n = 35$ cells; from three independent experiments for cluster analysis ($n = 39$ and $n = 25$ cells from three independent experiments for surface/total Flag-KCC2). $^{**}p < 0.01$, $^{*}p < 0.05$; Mann–Whitney rank-sum tests.

2; Zhao et al., 2008), Rab11b (Ras-associated binding protein 11b; Roussa et al., 2016), and the actin-associated protein 4.1N (Li et al., 2007) were shown to interact with KCC2 and control its endocytosis, recycling, and clustering, respectively. Conversely, KCC2 interaction with the guanylyl exchange factor βPIX controls Rac1 and cofilin activity (Chevy et al., 2015; Llano et al., 2015), while its interaction with the two-pore leak potassium channel Task-3 regulates its trafficking (Goutierre et al., 2019).

A first native KCC2 interactome recently identified several known partners such as ATPase subunits, as well as unsuspected ones like the endocytic adaptor protein PACSIN1 (Mahadevan et al., 2017). Twenty putative partners identified in this study were also identified in our analysis (Table 1). These include the chaperone Canx, the transmembrane protein Jagn1, Prrt2 (proline-rich transmembrane protein 2), Slc8a2 (Na^+-Ca^{2+} exchanger 2), and Actn4. In addition, we found several partners identified in previous studies that were not recovered in the proteomic analysis of Mahadevan et al. (2017), like members of the 4.1 (Li et al., 2007) and amyloid precursor protein families (Chen et al., 2017). Finally, our study identified several novel putative interactors, including the scaffolding molecule gephyrin and the NKCC1 transporter. Although we did not further examine this interaction in the present study, the occurrence of both NKCC1 and Na/K-ATPase in our interactome supports the notion that cation chloride cotransporters and ATPases may be part of a functional macromolecular complex, or metabolon (Kaila et al., 2014b).

Apparent discrepancies between our new KCC2 interactome and the previously reported one (Mahadevan et al., 2017) likely reflect differences in experimental approaches. First, Mahadevan et al. (2017) used the nonionic detergent $C_{12}E_9$ and nondenaturing conditions that may better preserve native, higher-order multiprotein complexes than the Triton X-100 used in our study. Although $C_{12}E_9$ is usually preferred to stabilize transmembrane proteins, it is, however, remarkable that extraction with Triton X-100 yielded a comparable transmembrane/total protein ratio (17% and 22% in this study and in the study by Mahadevan et al., 2017, respectively). In addition, the previous study used endogenous KCC2 as bait and antibodies against various domains of the protein to immunoprecipitate KCC2. Instead, we used recombinant Flag-tagged KCC2 as bait to promote antibody access to critical interaction regions, such as the C-terminal domain involved in KCC2 dimerization (Agez et al., 2017); and interaction with 4.1N (Li et al., 2007), βPIX (Chevy et al., 2015; Llano et al., 2015), and gephyrin (this study; Fig. 2). This may explain why 4.1N and gephyrin were not identified in the previously described interactome. Our approach also allowed us to restrict our interactome to the KCC2b isoform, the major isoform in the adult brain (Uvarov et al., 2009), whereas KCC2 antibody-based pull-down indistinctly recovered KCC2a and KCC2b interacting proteins. It also let us restrict our analysis to principal cortical neurons (using CaMKII promoter to drive Flag-KCC2b expression in the isocortex), whereas whole-brain extracts were previously used. Since KCC2 is expressed in

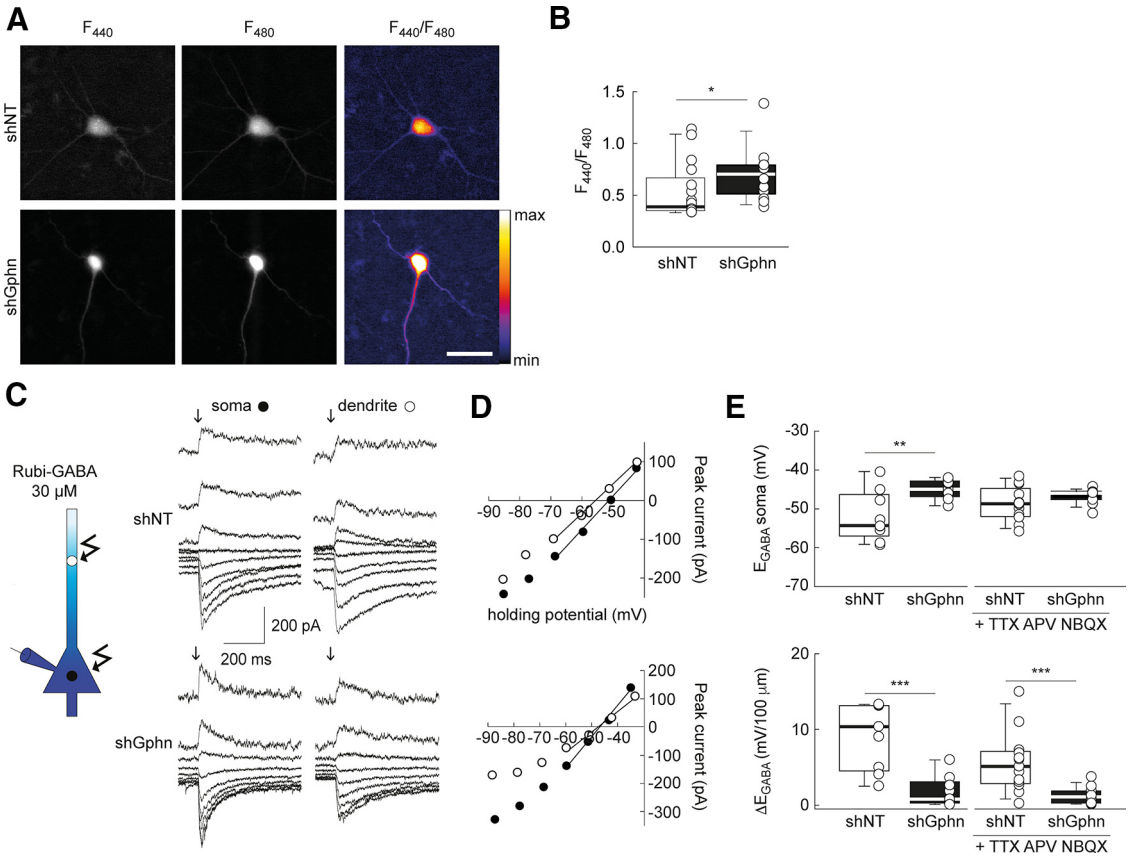


Figure 5. Gephyrin expression is essential for chloride extrusion in hippocampal neurons. ***A***, Representative widefield images of Cl-sensor fluorescence of hippocampal neurons expressing Cl-sensor and either shNT or shGphn, on excitation at 440 and 480 nm. Right, Ratio of the two images at 440 and 480 nm illumination. ***B***, Summary boxplots showing F_{440}/F_{480} ratios from 17 (shNT) and 14 (shGphn) neurons from two independent experiments. $^{*}p < 0.05$, Mann–Whitney rank-sum test. ***C***, Left, Representation of experimental setting. RuBi-GABA (30 μM) was locally photolyzed onto the soma or dendrite of transfected neurons whole-cell patch clamped with a high-chloride intracellular solution. Right, Representative recordings of GABA-evoked currents evoked at varying potentials by RuBi-GABA photolysis on the soma or dendrite of hippocampal neurons (DIV 21–24) expressing either shNT or shGphn. ***D***, *I–V* relations corresponding to traces shown in ***C***. ***E***, Summary graphs showing reversal potential (E_{GABA}, top) and somatodendritic E_{GABA} gradient (ΔE_{GABA}, bottom) in shNT- and shGphn-expressing neurons either in basal culture conditions ($n = 9$ neurons each, two independent cultures) or on 24 h treatment with TTX and glutamate receptor antagonists (D-APV, NBQX, and MCPG; see Materials and Methods; $n = 15$ neurons each, $n = 2$ independent cultures). $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$; Mann–Whitney rank-sum tests.

various neuron subtypes and brain regions where its noncanonical functions, which rely on molecular interactions, substantially differ (e.g., spinogenesis; Li et al., 2007; Seja et al., 2012; Fiumelli et al., 2013; Awad et al., 2018), interactomics studies performed from whole-brain extracts may reveal interactions that do not occur in cortical principal neurons.

Gephyrin interacts with KCC2 and regulates its membrane clustering and function

KCC2 has been shown to form clusters near both glutamatergic and GABAergic synapses (Gulyás et al., 2001; Gauvain et al., 2011; Chamma et al., 2013), and these clusters were suggested to represent the ion transport active pool of KCC2 in the plasma membrane (Watanabe et al., 2009). By analogy to postsynaptic receptors, plasmalemmal KCC2 clustering is likely to reflect a diffusion-capture behavior (Choquet and Triller, 2013), with free diffusion in the membrane and local molecular constraints promoting clustering in the vicinity of synaptic zones (Chamma et al., 2013; Côme et al., 2019). The nature of these constraints is not fully elucidated. Whereas KCC2 interaction with 4.1N was shown to hinder KCC2 membrane diffusion near glutamatergic synapses in dendritic spines, it does not seem to fulfill a similar role near GABAergic synapses. KCC2 has been reported to interact with $GABA_A$ (Huang et al., 2012) and $GABA_B$ (Wright et al., 2017) receptor subunits, but these interactions were not found in KCC2 interactomics studies (Mahadevan et al., 2017; this study), and no evidence supports the idea that KCC2 interaction with these receptors controls its membrane expression.

Gephyrin acts as the main scaffolding protein that anchors $GABA_A$ receptors to the submembrane cytoskeleton (Tyagarajan and Fritschy, 2014) and was therefore considered a promising partner for KCC2 clustering near GABAergic synapses. KCC2 interaction with gephyrin was confirmed in coimmunoprecipitation assays on native proteins. As reported for 4.1N binding with KCC2 (Li et al., 2007), KCC2–gephyrin interaction involved the KCC2 C-terminal domain since coimmunoprecipitation was preserved in cells expressing only this intracellular domain. Gephyrin subdomains involved in this interaction remain to be identified. Whereas the N-terminal G domain is primarily involved in the trimerization of gephyrin, the central C domain and C-terminal E domain were shown to mediate most interactions with $GABA_A$ receptor subunits and other protein partners (Fritschy et al., 2008) and are candidates for mediating interaction with KCC2.

Our results demonstrate that gephyrin promotes plasmalemmal KCC2 clustering in hippocampal neurons. In this context, it is remarkable that gephyrin expression is maximal around the onset of KCC2 expression in rodent isocortex (Clayton et al., 1998; Pinto et al., 2013). The density, size, and intensity of

KCC2-immunopositive clusters facing VGAT-immunopositive terminals were all reduced on gephyrin knockdown, supporting the idea that KCC2–gephyrin interaction strongly promotes KCC2 aggregation near GABAergic synapses. However, as described previously, KCC2 clusters are mostly formed at the periphery of both GABAergic and glutamatergic synapses (Chamma et al., 2013). Exclusion of KCC2 from the postsynapse may reflect a higher affinity of gephyrin for α1/2-containing synaptic $GABA_A$ receptors, steric hindrance (Kokolaki et al., 2020) or stronger interaction with other extrasynaptic partners. Thus, α5-containing $GABA_A$ receptors are excluded from the postsynapse in part because of stronger interaction with radixin (Hausrat et al., 2015). Super-resolution microscopy may help resolve the nanoscopic organization of gephyrin, $GABA_AR$, and KCC2 clusters at GABAergic synapses.

Interestingly, gephyrin knockdown resulted in reduced surface KCC2 cluster intensity not only near but also, to a lesser extent, outside GABAergic synapses (Fig. 3). This observation suggests that gephyrin promotes KCC2 clustering not only near GABAergic synapses but also throughout the dendritic shaft membrane. This effect likely reflects the presence of gephyrin and gephyrin clusters outside GABAergic synapses, as recently revealed by PALM (photoactivated localization microscopy) imaging (Pennacchietti et al., 2017). Finally, although plasmalemmal/total KCC2 expression was increased in N2a cells on coexpression of gephyrin, no significant change in this ratio was observed in hippocampal neurons on gephyrin knockdown. This observation suggests that KCC2 membrane trafficking is not compromised by gephyrin knockdown in hippocampal neurons and that the lack of gephyrin may instead promote a redistribution of plasmalemmal KCC2, from a clustered to a more diffuse state. This effect is somewhat reminiscent of that observed on dephosphorylation of tyrosine residues of the C-terminal domain of KCC2 (Watanabe et al., 2009), which was associated with reduced ion transport.

Indeed, reduced plasmalemmal KCC2 clustering on gephyrin knockdown was associated with a significant increase in intracellular chloride concentration, as detected using Cl-sensor imaging. More importantly, a striking reduction in transmembrane chloride extrusion capacity, as demonstrated in our electrophysiological assay, was observed on gephyrin knockdown. In this assay, neurons are loaded through the patch pipette with a high and fixed concentration of chloride such that the reversal potential of $GABA_AR$-mediated responses at dendritic sites distant from the soma directly reflects chloride cytosolic diffusion and transmembrane extrusion (Khirug et al., 2008; Gauvain et al., 2011). Suppressing KCC2 function or expression has been shown to largely compromise somatodendritic E_{GABA} gradient in such an experimental setting (Gauvain et al., 2011). Our observation that gephyrin knockdown also strongly reduces the E_{GABA} gradient, therefore, suggests that even a partial reduction of KCC2 dendritic clustering is sufficient to profoundly compromise chloride extrusion in cortical neurons. Interestingly, preventing KCC2 interaction with 4.1N perturbed KCC2 clustering near glutamatergic synapses by promoting its lateral diffusion (Chamma et al., 2013). This manipulation, however, had no detectable effect on the somatodendritic E_{GABA} gradient (Gauvain et al., 2011). Together, these results suggest that dendritic, KCC2-mediated chloride export in cortical neurons primarily relies on gephyrin-dependent, but not on 4.1N-dependent, plasmalemmal KCC2 clustering. Whether KCC2 clustering in dendritic spines specifically controls the efficacy of GABAergic synapses they harbor (Kubota et al., 2007; Virtanen et al., 2018) remains to be explored.

Finally, KCC2 clustering and function are tightly controlled by neuronal and synaptic activity (Woodin et al., 2003; Rivera et al., 2004; Lee et al., 2011; Chamma et al., 2012, 2013; Medina et al., 2014; Heubl et al., 2017). In particular, glutamatergic (Chamma et al., 2013) and GABAergic (Heubl et al., 2017) synaptic transmission exert opposing control over KCC2 by regulating its lateral diffusion and clustering, resulting in a reduced or enhanced KCC2-mediated chloride export, respectively. This regulation relies on signaling cascades involving, at least in part, phosphorylation/dephosphorylation of specific serine and threonine residues in the KCC2 C-terminal domain (Kahle et al., 2005; Lee et al., 2011; Chamma et al., 2013; de Los Heros et al., 2014; Friedel et al., 2015; Heubl et al., 2017). It seems improbable, however, that reduced synaptic $GABA_A$ receptor function induced by gephyrin knockdown may significantly contribute to reduce KCC2 membrane clustering. Thus, complete genetic ablation of gephyrin resulted in only 20% reduction in the amplitude of miniature IPSCs with no change in frequency (Lévi et al., 2004). In contrast, complete blockade of $GABA_A$ receptors by gabazine reduced KCC2 cluster intensity by only 20% (compared with >40% in our experiments; Heubl et al., 2017). Instead, by analogy with activity-dependent regulation of postsynaptic receptor aggregation (Choquet and Triller, 2013), it is then tempting to speculate that changes in the phosphorylation state of KCC2 and/or its scaffolding partners including gephyrin (Battaglia et al., 2018) and 4.1N may induce conformational modifications that may act to perturb KCC2–scaffold interactions and reduce clustering and/or membrane anchoring of the transporter.

In conclusion, our study identified gephyrin as a novel key KCC2 partner that regulates its membrane clustering and function. Our results further illustrate the importance of functional macromolecular complexes regulating KCC2 membrane clustering and function. KCC2 clustering near glutamatergic synapses involves anchoring to the submembrane actin cytoskeleton via 4.1N (Li et al., 2007; Chamma et al., 2013), which in turn binds to the AMPAR GluA1 subunit (Lin et al., 2009). Similarly, near GABAergic synapses, coclustering of $GABA_A$ receptors and KCC2 with gephyrin may involve interaction with subsynaptic microtubule cytoskeleton (Kirsch et al., 1991) and promote the formation of a stable, functional macromolecular complex acting to regulate GABA signaling in cortical neurons (Heubl et al., 2017; Côme et al., 2020).

References

Agez M, Schultz P, Medina I, Baker DJ, Burnham MP, Cardarelli RA, Conway LC, Garnier K, Geschwindner S, Gunnarsson A, McCall EJ, Frechard A, Audebert S, Deeb TZ, Moss SJ, Brandon NJ, Wang Q, Dekker N, Jawhari A (2017) Molecular architecture of potassium chloride co-transporter KCC2. Sci Rep 7:16452.

Awad PN, Amegandjin CA, Szczurkowska J, Carrico JN, Fernandes do Nascimento AS, Baho E, Chattopadhyaya B, Cancedda L, Carmant L, Di Cristo G (2018) KCC2 regulates dendritic spine formation in a brain-region specific and BDNF dependent manner. Cereb Cortex 28:4049–4062.

Baldí R, Varga C, Tamás G (2010) Differential distribution of KCC2 along the axo-somato-dendritic axis of hippocampal principal cells. Eur J Neurosci 32:1319–1325.

Banerjee A, Rikhye RV, Breton-Provencher V, Tang X, Li C, Li K, Runyan CA, Fu Z, Jaenisch R, Sur M (2016) Jointly reduced inhibition and excitation underlies circuit-wide changes in cortical processing in Rett syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A 113:E7287–E7296.

Battaglia S, Renner M, Russeau M, Côme E, Tyagarajan SK, Lévi S (2018) Activity-dependent inhibitory synapse scaling is determined by gephyrin phosphorylation and subsequent regulation of $GABA_A$ receptor diffusion. eNeuro 5:ENEURO.0203-17.2017.

Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, Charoentong P, Tosolini M, Kirilovsky A, Fridman WH, Pagès F, Trajanoski Z, Galon J (2009) ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. Bioinformatics 25:1091–1093.

Blaesse P, Schmidt T (2015) K-Cl cotransporter KCC2–a moonlighting protein in excitatory and inhibitory synapse development and function. Pflugers Arch 467:615–624.

Boulenguez P, Liabeuf S, Bos R, Bras H, Jean-Xavier C, Brocard C, Stil A, Darbon P, Cattaert D, Delpire E, Marsala M, Vinay L (2010) Down-regulation of the potassium-chloride cotransporter KCC2 contributes to spasticity after spinal cord injury. Nat Med 16:302–307.

Chamma I, Chevy Q, Poncer JC, Lévi S (2012) Role of the neuronal K-Cl co-transporter KCC2 in inhibitory and excitatory neurotransmission. Front Cell Neurosci 6:5.

Chamma I, Heubl M, Chevy Q, Renner M, Moutkine I, Eugène E, Poncer JC, Lévi S (2013) Activity-dependent regulation of the K/Cl transporter KCC2 membrane diffusion, clustering, and function in hippocampal neurons. J Neurosci 33:15488–15503.

Chen M, Wang J, Jiang J, Zheng X, Justice NJ, Wang K, Ran X, Li Y, Huo Q, Zhang J, Li H, Lu N, Wang Y, Zheng H, Long C, Yang L (2017) APP modulates KCC2 expression and function in hippocampal GABAergic inhibition. eLife 6:e20142.

Chevy Q, Heubl M, Goutierre M, Backer S, Moutkine I, Eugène E, Bloch-Gallego E, Lévi S, Poncer JC (2015) KCC2 gates activity-driven AMPA receptor traffic through cofilin phosphorylation. J Neurosci 35:15772–15786.

Chevy Q, Simonnet C, Al Awabdh S, Lévi S, Poncer JC (2020) Transport-dependent and independent functions of KCC2 at excitatory synapses. In: Neuronal chloride transporters in health and disease (Tang X, ed), pp 33–158. Amsterdam: Academic.

Choquet D, Triller A (2013) The dynamic synapse. Neuron 80:691–703.

Clayton GH, Owens GC, Wolff JS, Smith RL (1998) Ontogeny of cation-Cl- cotransporter expression in rat neocortex. Brain Res Dev Brain Res 109:281–292.

Cohen I, Navarro V, Clemenceau S, Baulac M, Miles R (2002) On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. Science 298:1418–1421.

Côme E, Heubl M, Schwartz EJ, Poncer JC, Lévi S (2019) Reciprocal regulation of KCC2 trafficking and synaptic activity. Front Cell Neurosci 13:48.

Côme E, Marques X, Poncer JC, Lévi S (2020) KCC2 membrane diffusion tunes neuronal chloride homeostasis. Neuropharmacology 169:107571.

Coull JA, Boudreau D, Bachand K, Prescott SA, Nault F, Sík A, De Koninck P, De Koninck Y (2003) Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. Nature 424:938–942.

Cox J, Mann M (2008) MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. Nat Biotechnol 26:1367–1372.

Cox J, Neuhauser N, Michalski A, Scheltema RA, Olsen JV, Mann M (2011) Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. J Proteome Res 10:1794–1805.

de Los Heros P, Alessi DR, Gourlay R, Campbell DG, Deak M, Macartney TJ, Kahle KT, Zhang J (2014) The WNK-regulated SPAK/OSR1 kinases directly phosphorylate and inhibit the K+-Cl- co-transporters. Biochem J 458:559–573.

Doshina A, Gourgue F, Onizuka M, Opsomer R, Wang P, Ando K, Tasiaux B, Dewachter I, Kienlen-Campard P, Brion JP, Gailly P, Octave JN, Pierrot N (2017) Cortical cells reveal APP as a new player in the regulation of GABAergic neurotransmission. Sci Rep 7:370.

Feng G, Tintrup H, Kirsch J, Nichol MC, Kuhse J, Betz H, Sanes JR (1998) Dual requirement for gephyrin in glycine receptor clustering and molybdoenzyme activity. Science 282:1321–1324.

Fiumelli H, Briner A, Puskarjov M, Blaesse P, Belem BJ, Dayer AG, Kaila K, Martin JL, Vutskits L (2013) An ion transport-independent role for the cation-chloride cotransporter KCC2 in dendritic spinogenesis in vivo. Cereb Cortex 23:378–388.

Friedel P, Kahle KT, Zhang J, Hertz N, Pisella LI, Buhler E, Schaller F, Duan J, Khanna AR, Bishop PN, Shokat KM, Medina I (2015) WNK1-regulated inhibitory phosphorylation of the KCC2 cotransporter maintains the depolarizing action of GABA in immature neurons. Sci Signal 8:ra65.

Fritschy JM, Harvey RJ, Schwarz G (2008) Gephyrin: where do we stand, where do we go? Trends Neurosci 31:257–264.

Gauvain G, Chamma I, Chevy Q, Cabezas C, Irinopoulou T, Bodrug N, Carnaud M, Lévi S, Poncer JC (2011) The neuronal K-Cl cotransporter KCC2 influences postsynaptic AMPA receptor content and lateral diffusion in dendritic spines. Proc Natl Acad Sci U S A 108:15474–15479.

Goutierre M, Al Awabdh S, Donneger F, François E, Gomez-Dominguez D, Irinopoulou T, Menendez de la Prida L, Poncer JC (2019) KCC2 regulates neuronal excitability and hippocampal activity via interaction with Task-3 channels. Cell Rep 28:91–103.e7.

Gulyás AI, Sík A, Payne JA, Kaila K, Freund TF (2001) The KCl cotransporter, KCC2, is highly expressed in the vicinity of excitatory synapses in the rat hippocampus. Eur J Neurosci 13:2205–2217.

Hausrat TJ, Muhia M, Gerrow K, Thomas P, Hirdes W, Tsukita S, Heisler FF, Herich L, Dubroqua S, Breiden P, Feldon J, Schwarz JR, Yee BK, Smart TG, Triller A, Kneussel M (2015) Radixin regulates synaptic GABAA receptor density and is essential for reversal learning and short-term memory. Nat Commun 6:6872.

Heubl M, Zhang J, Pressey JC, Al Awabdh S, Renner M, Gomez-Castro F, Moutkine I, Eugène E, Russeau M, Kahle KT, Poncer JC, Lévi S (2017) GABAA receptor dependent synaptic inhibition rapidly tunes KCC2 activity via the Cl^--sensitive WNK1 kinase. Nat Commun 8:1776.

Huang Y, Ko H, Cheung ZH, Yung KK, Yao T, Wang JJ, Morozov A, Ke Y, Ip NY, Yung WH (2012) Dual actions of brain-derived neurotrophic factor on GABAergic transmission in cerebellar Purkinje neurons. Exp Neurol 233:791–798.

Huberfeld G, Wittner L, Clemenceau S, Baulac M, Kaila K, Miles R, Rivera C (2007) Perturbed chloride homeostasis and GABAergic signaling in human temporal lobe epilepsy. J Neurosci 27:9866–9873.

Inoue K, Ueno S, Fukuda A (2004) Interaction of neuron-specific K+-Cl– cotransporter, KCC2, with brain-type creatine kinase. FEBS Lett 564:131–135.

Ivakine EA, Acton BA, Mahadevan V, Ormond J, Tang M, Pressey JC, Huang MY, Ng D, Delpire E, Salter MW, Woodin MA, McInnes RR (2013) Neto2 is a KCC2 interacting protein required for neuronal Cl- regulation in hippocampal neurons. Proc Natl Acad Sci U S A 110:3561–3566.

Jacob TC, Bogdanov YD, Magnus C, Saliba RS, Kittler JT, Haydon PG, Moss SJ (2005) Gephyrin regulates the cell surface dynamics of synaptic $GABA_A$ receptors. J Neurosci 25:10469–10478.

Kahle KT, Rinehart J, de Los Heros P, Louvi A, Meade P, Vazquez N, Hebert SC, Gamba G, Gimenez I, Lifton RP (2005) WNK3 modulates transport of Cl- in and out of cells: implications for control of cell volume and neuronal excitability. Proc Natl Acad Sci U S A 102:16783–16788.

Kahle KT, Staley KJ, Nahed BV, Gamba G, Hebert SC, Lifton RP, Mount DB (2008) Roles of the cation-chloride cotransporters in neurological disease. Nat Clin Pract Neurol 4:490–503.

Kaila K, Price TJ, Payne JA, Puskarjov M, Voipio J (2014a) Cation-chloride cotransporters in neuronal development, plasticity and disease. Nat Rev Neurosci 15:637–654.

Kaila K, Ruusuvuori E, Seja P, Voipio J, Puskarjov M (2014b) GABA actions and ionic plasticity in epilepsy. Curr Opin Neurobiol 26:34–41.

Kasaragod VB, Schindelin H (2018) Structure-function relationships of glycine and GABA(A) receptors and their interplay with the scaffolding protein gephyrin. Front Mol Neurosci 11:317.

Khirug S, Yamada J, Afzalov R, Voipio J, Khiroug L, Kaila K (2008) GABAergic depolarization of the axon initial segment in cortical principal neurons is caused by the Na-K-2Cl cotransporter NKCC1. J Neurosci 28:4635–4639.

Kirsch J, Langosch D, Prior P, Littauer UZ, Schmitt B, Betz H (1991) The 93-kDa glycine receptor-associated protein binds to tubulin. J Biol Chem 266:22242–22245.

Kneussel M, Brandstätter JH, Laube B, Stahl S, Müller U, Betz H (1999) Loss of postsynaptic $GABA_A$ receptor clustering in gephyrin-deficient mice. J Neurosci 19:9289–9297.

Kokolaki ML, Fauquier A, Renner M (2020) Molecular crowding and diffusion-capture in synapses. iScience 23:101382.

Kubota Y, Hatada S, Kondo S, Karube F, Kawaguchi Y (2007) Neocortical inhibitory terminals innervate dendritic spines targeted by thalamocortical afferents. J Neurosci 27:1139–1150.

Lee HH, Deeb TZ, Walker JA, Davies PA, Moss SJ (2011) NMDA receptor activity downregulates KCC2 resulting in depolarizing GABAA receptor-mediated currents. Nat Neurosci 14:736–743.

Lévi S, Logan SM, Tovar KR, Craig AM (2004) Gephyrin is critical for glycine receptor clustering but not for the formation of functional GABAergic synapses in hippocampal neurons. J Neurosci 24:207–217.

Li H, Khirug S, Cai C, Ludwig A, Blaesse P, Kolikova J, Afzalov R, Coleman SK, Lauri S, Airaksinen MS, Keinänen K, Khiroug L, Saarma M, Kaila K, Rivera C (2007) KCC2 interacts with the dendritic cytoskeleton to promote spine development. Neuron 56:1019–1033.

Lin DT, Makino Y, Sharma K, Hayashi T, Neve R, Takamiya K, Huganir RL (2009) Regulation of AMPA receptor extrasynaptic insertion by 4.1N, phosphorylation and palmitoylation. Nat Neurosci 12:879–887.

Llano O, Smirnov S, Soni S, Golubtsov A, Guillemin I, Hotulainen P, Medina I, Nothwang HG, Rivera C, Ludwig A (2015) KCC2 regulates actin dynamics in dendritic spines via interaction with β-PIX. J Cell Biol 209:671–686.

Mahadevan V, Khademullah CS, Dargaei Z, Chevrier J, Uvarov P, Kwan J, Bagshaw RD, Pawson T, Emili A, De Koninck Y, Anggono V, Airaksinen M, Woodin MA (2017) Native KCC2 interactome reveals PACSIN1 as a critical regulator of synaptic inhibition. eLife 6:e28270.

Markova O, Mukhtarov M, Real E, Jacob Y, Bregestovski P (2008) Genetically encoded chloride indicator with improved sensitivity. J Neurosci Methods 170:67–76.

Medina I, Friedel P, Rivera C, Kahle KT, Kourdougli N, Uvarov P, Pellegrino C (2014) Current view on the functional regulation of the neuronal K(+)-Cl(-) cotransporter KCC2. Front Cell Neurosci 8:27.

Omasits U, Ahrens CH, Müller S, Wollscheid B (2014) Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. Bioinformatics 30:884–886.

Otsu Y, Donneger F, Schwartz EJ, Poncer JC (2020) Cation-chloride cotransporters and the polarity of GABA signalling in mouse hippocampal parvalbumin interneurons. J Physiol 598:1865–1880.

Pallud J, Le Van Quyen M, Bielle F, Pellegrino C, Varlet P, Labussiere M, Cresto N, Dieme MJ, Baulac M, Duyckaerts C, Kourdougli N, Chazal G, Devaux B, Rivera C, Miles R, Capelle L, Huberfeld G (2014) Cortical GABAergic excitation contributes to epileptic activities around human glioma. Sci Transl Med 6:244ra289.

Pennacchietti F, Vascon S, Nieus T, Rosillo C, Das S, Tyagarajan SK, Diaspro A, Del Bue A, Petrini EM, Barberis A, Cella Zanacchi F (2017) Nanoscale molecular reorganization of the inhibitory postsynaptic density is a determinant of GABAergic synaptic potentiation. J Neurosci 37:1747–1756.

Pinto JG, Jones DG, Murphy KM (2013) Comparing development of synaptic proteins in rat visual, somatosensory, and frontal cortex. Front Neural Circuits 7:97.

Pressey JC, Mahadevan V, Khademullah CS, Dargaei Z, Chevrier J, Ye W, Huang M, Chauhan AK, Meas SJ, Uvarov P, Airaksinen MS, Woodin MA (2017) A kainate receptor subunit promotes the recycling of the neuron-specific K(+)-Cl(-) co-transporter KCC2 in hippocampal neurons. J Biol Chem 292:6190–6201.

Raynaud F, Homburger V, Seveno M, Vigy O, Moutin E, Fagni L, Perroy J (2018) SNAP23-Kif5 complex controls mGlu1 receptor trafficking. J Mol Cell Biol 10:423–436.

Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K, Pirvola U, Saarma M, Kaila K (1999) The K+/Cl- co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. Nature 397:251–255.

Rivera C, Voipio J, Thomas-Crusells J, Li H, Emri Z, Sipilä S, Payne JA, Minichiello L, Saarma M, Kaila K (2004) Mechanism of activity-dependent downregulation of the neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2. J Neurosci 24:4683–4691.

Roussa E, Speer JM, Chudotvorova I, Khakipoor S, Smirnov S, Rivera C, Krieglstein K (2016) The membrane trafficking and functionality of the K+-Cl- co-transporter KCC2 is regulated by TGF-beta2. J Cell Sci 129:3485–3498.

Seja P, Schonewille M, Spitzmaul G, Badura A, Klein I, Rudhard Y, Wisden W, Hübner CA, De Zeeuw CI, Jentsch TJ (2012) Raising cytosolic Cl- in cerebellar granule cells affects their excitability and vestibulo-ocular learning. EMBO J 31:1217–1230.

Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T (2003) Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. Genome Res 13:2498–2504.

Thouvenot E, Urbach S, Dantec C, Poncet J, Séveno M, Demettre E, Jouin P, Touchon J, Bockaert J, Marin P (2008) Enhanced detection of CNS cell secretome in plasma protein-depleted cerebrospinal fluid. J Proteome Res 7:4409–4421.

Tyagarajan SK, Fritschy JM (2014) Gephyrin: a master regulator of neuronal function? Nat Rev Neurosci 15:141–156.

Tyzio R, Nardou R, Ferrari DC, Tsintsadze T, Shahrokhi A, Eftekhari S, Khalilov I, Tsintsadze V, Brouchoud C, Chazal G, Lemonnier E, Lozovaya N, Burnashev N, Ben-Ari Y (2014) Oxytocin-mediated GABA inhibition during delivery attenuates autism pathogenesis in rodent offspring. Science 343:675–679.

Uvarov P, Ludwig A, Markkanen M, Soni S, Hübner CA, Rivera C, Airaksinen MS (2009) Coexpression and heteromerization of two neuronal K-Cl cotransporter isoforms in neonatal brain. J Biol Chem 284:13696–13704.

Virtanen MA, Lacoh CM, Fiumelli H, Kosel M, Tyagarajan S, de Roo M, Vutskits L (2018) Development of inhibitory synaptic inputs on layer 2/3 pyramidal neurons in the rat medial prefrontal cortex. Brain Struct Funct 223:1999–2012.

Virtanen MA, Uvarov P, Mavrovic M, Poncer JC, Kaila K (2021) The multifaceted roles of KCC2 in cortical development. Trends Neurosci 44:378–392.

Wan L, Chen L, Yu J, Wang G, Wu Z, Qian B, Liu X, Wang Y (2020) Coordinated downregulation of KCC2 and GABA(A) receptor contributes to inhibitory dysfunction during seizure induction. Biochem Biophys Res Commun 532:489–495.

Watanabe M, Wake H, Moorhouse AJ, Nabekura J (2009) Clustering of neuronal K+-Cl- cotransporters in lipid rafts by tyrosine phosphorylation. J Biol Chem 284:27980–27988.

Woodin MA, Ganguly K, Poo M-m (2003) Coincident pre- and postsynaptic activity modifies GABAergic synapses by postsynaptic changes in Cl− transporter activity. Neuron 39:807–820.

Wright R, Newey SE, Ilie A, Wefelmeyer W, Raimondo JV, Ginham R, McLlhinney RAJ, Akerman CJ (2017) Neuronal chloride regulation via KCC2 is modulated through a $GABA_B$ receptor protein complex. J Neurosci 37:5447–5462.

Yu W, Jiang M, Miralles CP, Li RW, Chen G, de Blas AL (2007) Gephyrin clustering is required for the stability of GABAergic synapses. Mol Cell Neurosci 36:484–500.

Zhao B, Wong AY, Murshid A, Bowie D, Presley JF, Bedford FK (2008) Identification of a novel di-leucine motif mediating K(+)/Cl(-) cotransporter KCC2 constitutive endocytosis. Cell Signal 20:1769–1779.

Article principal:

Enhancing KCC2 function prevents epileptiform activity *in vitro* and *in vivo*

Florian Donneger[1,2,3], Adrien Zanin[1,2,3], Jeremy Besson[1,2,3], Yoness Kadiri[1,2,3], Nicolas David[1,2,3], Marion Russeau[1,2,3], Francine Chassoux[4], Bertrand Devaux[4], Bertrand Mathon[2,5,6], Vincent Navarro[2,5,6], Sabine Lévi[1,2,3], Jean Christophe Poncer[1,2,3] *

[1] Inserm UMR-S 1270, Paris, France
[2] Sorbonne Université, Paris, France
[3] Institut du Fer à Moulin, Paris, France,
[4] Department of Neurosurgery, Sainte Anne Hospital, Paris, France,
[5] Paris Brain Institute, INSERM, CNRS, F-75013, Paris, France,
[6] Epilepsy Unit, Reference Center for Rare Epilepsies, and Departement of Clinical Neurophysiology, Pitié Salpêtrière Hospital, Paris, France

* Corresponding author: jean-christophe.poncer@inserm.fr

Author contributions:

F.D. A.Z., J.B., S.L. and J.C.P participated in experimental investigations and analyses. F.C., B.D., V.N. and B.M. recruited patients and provided human biological resources. M.R., Y.K. and N.D. provided technical support and developed data analysis tools. F.D., A.Z. and J.C.P. designed the study. J.C.P. supervised and obtained funding. All authors reviewed the manuscript before submission.

Competing interests:

The authors declare no competing interests.

Material availability:

No MTA

Abstract

The cation-chloride cotransporters (CCC) KCC2 and NKCC1 control intraneuronal chloride homeostasis and, subsequently, the efficacy and polarity of GABA signaling in neurons. In many neurological disorders, including epilepsy, reduced KCC2 expression or function may result in depolarizing GABA signaling, thereby contributing to pathological activities and seizures. Compensating for the dysregulation of CCC function in the pathology therefore emerged as a promising therapeutic strategy. Bumetanide, a NKCC1 antagonist, failed to prevent acute neonatal seizures in clinical trials. Here, instead, we tested the antiepileptic effects of two compounds – CLP257 and prochlorperazine (PCPZ) – recently identified from library screening and proposed as candidate KCC2 enhancers. However, their mode of action in cortical neurons and their therapeutic potential in epilepsy remain unknown or even controversial. We show here that both CLP257 and PCPZ enhance KCC2 function in rat hippocampal neurons and that CLP257 also acts as a selective positive allosteric modulator of extrasynaptic $GABA_A$ receptors. Both compounds reduced KCC2 lateral diffusion and enhanced KCC2 clustering, with no net change in total or plasmalemmal KCC2 expression. *In vitro*, they effectively suppressed spontaneous, interictal-like discharges recorded from postoperative hippocampal tissue resected from mesial temporal lobe epilepsy (mTLE) patients. *In vivo*, chronic administration of PCPZ reduced the occurrence of seizures and epileptiform activities in a mouse model of mTLE. These results decipher the mode of action of two candidate KCC2 enhancers and validate their antiepileptic potential in pharmacoresistant epilepsy.

Introduction

Epilepsy is among the most frequent neurological disorders, affecting over 65 million people worldwide (Ngugi et al., 2010). It is a chronic brain disease characterized by a lasting predisposition to undergo spontaneous and usually unpredictable seizures, with multiple risk factors and a strong genetic predisposition (GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators, 2016). Currently, epilepsy treatment relies mostly on pharmacology using so-called anti-epileptic drugs (AEDs), resective brain surgery, neurostimulation and dietary therapies. Antiseizure medication controls seizures in about 70% patients but does not improve long-term prognosis. The remaining 30% epilepsy patients develop drug-resistant epilepsy, defined as the failure of at least two, appropriately selected and well-tolerated AEDs to control seizures (Mesraoua et al., 2019). Pharmaco-resistant focal epilepsy - such as temporal lobe epilepsy, focal cortical dysplasia or epilepsy associated with low-grade gliomas - may be an indication for resective surgery, with a fairly high rate ($\cong$ 80%) of seizure control in these patients (Lowe et al., 2004; Téllez-Zenteno et al., 2005). However, many pharmaco-resistant epilepsy patients are not eligible to surgery and surgery does not provide good long-term seizure control, with less than 50% of patients being seizure-free 10 years after surgery (de Tisi et al., 2011). Furthermore, this non-reversible approach lacks temporal and cellular specificity, sometimes leading to major negative side effects, such as memory or language deficits (Duchowny and Bhatia, 2014). Pharmaco-resistant epilepsy therefore represents a major public health issue as it is associated with severe comorbidities, reduced life quality and increased mortality.

Several AEDs act to potentiate neuronal inhibition mediated by the neurotransmitter GABA, either by increasing GABA release, reducing its catabolism or directly potentiating $GABA_A$ receptors which mediate its fast, synaptic effects in the brain (Mesraoua et al., 2019). $GABA_A$ receptor channels are primarily permeable to chloride ions and their action therefore depends on transmembrane chloride gradients. In neurons, these gradients are controlled by cation-chloride cotransporters (CCCs), which maintain low intracellular chloride concentrations and thereby promote a hyperpolarizing and inhibitory chloride influx upon $GABA_A$ receptor activation (Blaesse et al., 2009). Several forms of pharmaco-resistant epilepsies have been associated with altered expression and function of CCCs (Cohen et al., 2002; Huberfeld et al., 2015).

Elevated intraneuronal chloride concentration is thought to cause depolarizing GABAergic signaling that may result in the abnormal neuronal activation and synchronization that underlies seizures. Compensating for the dysregulation of CCC function in the pathology, by maintaining low intracellular chloride concentration, therefore appears as a promising therapeutic strategy. The antagonist of the Na/K/Cl co-transporter NKCC1 bumetanide failed to prevent acute neonatal seizures in two clinical trials and induced several side-effects due to the broad peripheral expression and functions of NKCC1 (Pressler et al., 2015; Soul et al., 2021). Instead, acting on the function of KCC2, a neuron-specific chloride potassium cotransporter, may help restoring normal neuronal chloride transport in the pathology. Thus, increasing the expression or function of KCC2 is expected to restore $GABA_AR$-mediated inhibition and prevent seizures.

Recently, screening of compound libraries has identified several molecules, such as CLP257, CLP290, or prochlorperazine (PCPZ) that could act as KCC2 enhancers (Gagnon et al., 2013; Liabeuf et al., 2017; Tang et al., 2019). These compounds seem to improve symptoms in different cell lines and animal models of disorders associated with decreased KCC2 expression (Barbour et al., 2020; Bilchak et al., 2021; Ferrini et al., 2017; Gagnon et al., 2013; Gao et al., 2022; Kalashnikov et al., 2021; Liabeuf et al., 2017; Lizhnyak et al., 2019; Sullivan et al., 2021). However, their mechanism of action and even their selective effect on KCC2 remain elusive (Liabeuf et al., 2017) or disputed (Cardarelli et al., 2017; Gagnon et al., 2017). In addition, no experimental evidence currently exists demonstrating such compounds would control seizure occurrence in pharmaco-resistant epilepsy.

Here, we first investigated the mode of action of two of these compounds, CLP257 and PCPZ, in rat primary hippocampal cultures. Using electrophysiological assays, we found that both compounds enhance KCC2 function. CLP257 also directly modulates GABA signaling, and act as a positive allosteric modulator of extrasynaptic $GABA_A$ receptors. Both compounds reduce the lateral diffusion of KCC2 in the plasma membrane and enhance KCC2 clustering as revealed by single particle tracking experiments and immunocytochemistry. Interestingly, this mechanism does not involve change in total or plasmalemmal KCC2 expression, phosphorylation of canonical residues of KCC2 or the WNK/SPAK pathway.

We then tested the effect of these compounds on the emergence of epileptiform activities recorded *in vitro* and *in vivo*. Both compounds effectively suppressed spontaneous, interictal-like discharges recorded in postoperative hippocampal tissue resected from intractable, mesial TLE patients. In addition, chronic administration of PCPZ reduced seizure occurrence and frequency of epileptiform events in a lithium-pilocarpine mouse model of temporal lobe epilepsy. Collectively, our data decipher the mode of action of two candidate KCC2 enhancers in hippocampal neurons and demonstrate for the first time their antiepileptic potential in pharmacoresistant epilepsy.

Results

Prochlorperazine (PCPZ), a phenothiazine-derived antipsychotic, and CLP257, a compound from first-in class arylmethylidine family, have been suggested to enhance KCC2 function in lesioned spinal motoneurons (Liabeuf et al., 2017) and in various cell lines and animal models of disorders associated with KCC2 extinction (Ferrini et al., 2017; Gagnon et al., 2013). However, their effects and mode of action have never been tested directly in cortical neurons and their specificity remains controversial (Cardarelli et al., 2017). Therefore, we first evaluated whether PCPZ and CLP257 potentiate KCC2 in rat hippocampal neurons *in vitro*. KCC2 function was assessed by measuring the somato-dendritic gradient of the reversal potential of currents evoked by focal $GABA_A$ receptor activation (E_{GABA}) in neurons whole-cell patch-clamped with high-chloride internal solution (Gauvain et al., 2011; Khirug et al., 2008; Otsu et al., 2020) (Figure 1, see Methods). Due to the phototoxicity of PCPZ (Supplementary fig1), $GABA_A$R-mediated currents were evoked by puff application of isoguvacine instead of Rubi-GABA photo-uncaging. The mean somato-dendritic gradient of E_{GABA} (ΔE_{GABA}) was 6.6±0.8 mV/100 µm in control, untreated neurons (n=19). Upon 2-hour application of 10 µM PCPZ, this gradient was significantly increased to 11.5±1.5 mV/100 µm (n=16; p=0.006). We also observe a small but significant depolarization of somatic E_{GABA} in PCPZ-treated neurons compared to control neurons (-50.2±1.2 vs. -53.6±1.2 mV/100 µm, p=0.046) (Figure 1A-C). Similarly, 2-hour application of CLP257 (100 µM) increased ΔE_{GABA} from 5.3±1.1 to 9.7±1.1 mV/100 µm (n=10 and 8, respectively; p=0.014) (Figure 1D-F). These data demonstrate both PCPZ and CLP257 act as genuine KCC2 enhancers in rat hippocampal neurons.

CLP257 has been suggested to act directly to potentiate $GABA_A$ receptors (Cardarelli et al., 2017; but see Gagnon et al., 2017). Since $GABA_AR$-mediated chloride fluxes modulate KCC2 membrane expression and function (Heubl et al., 2017), we asked whether both PCPZ and CLP257 may act primarily to modulate $GABA_AR$ function. We then tested the effect of acute PCPZ or CLP257 application on $GABA_AR$ function, as assessed by focal application of isoguvacine (100 µM) or uncaging of low concentration (30 µM) of Rubi-GABA (Figure 2A-D). PCPZ had no effect on either the amplitude (157.5±25.4 vs. 150.7±17.5 pA for control, p=0.48) or the decay time constant (130.8±10.5 vs. 127.7±10.2 ms, p=0.362) of $GABA_A$ receptor-mediated currents (Figure 2A-B).

Instead, CLP257 increased the decay time constant of $GABA_A$ receptor-mediated currents (218.2±21.1 vs. 124.4±9.1 ms, p<0.001) with no detectable effect on their amplitude (162.0±6.6 vs 164.7±4.6 pA for control, p=0.66; Figure 2C-D) or membrane resistance (Rin; 338.1±38.9 vs. 365.7±41.6 pA, p=0.33) (Supplementary fig2A).

We then tested the effect of CLP257 and PCPZ specifically on synaptic $GABA_A$ receptors, by recording miniature inhibitory postsynaptic currents (mIPSCs) from hippocampal neurons. Neither PCPZ nor CLP257 had detectable effects on mIPSC amplitude (42.9±2.6 vs. 42.5±2.5 pA, p=0.797 and 43.8±2.9 vs. 42.3±3.4 pA, p=0.622, respectively) or decay time constant (10.2±0.7 vs. 10.7±0.8 ms, p=0.086 and 12.5±1.0 vs. 12.4±0.8 ms, p=0.86, respectively). However, PCPZ but not CLP257 marginally increased mIPSCs frequency (23.4±2.4 vs. 17.4±1.7 Hz, p<0.001 and 16.6±2.0 vs. 17.7±2.7 Hz, p=0.51, respectively, Figure 2E-H). This effect of PCPZ on mIPSCs does not seem to involve its action on D2 dopamine receptors (D2R) since the selective D2R antagonist eticlopride had no significant effect on mIPSC frequency (11.1±1.5 vs 11.7±1.6 Hz for control, p=0.468; Supplementary fig3) or amplitude (58.0±2.9 vs 55.2±2.8 pA, p=0.424). Together, these results demonstrate that while both CLP257 and PCPZ potentiate KCC2, CLP257 but not PCPZ also acts to specifically potentiate extrasynaptic $GABA_A$ receptor function in a benzodiazepine-like manner in primary hippocampal neurons.

We next investigated the mechanisms of KCC2 potentiation by PCPZ and CLP257. Enhanced KCC2 function may result from either increased intrinsic enzymatic activity or increased membrane expression of the transporter, or both (Virtanen et al., 2021).

We therefore used surface biotinylation to test whether increased KCC2 function by PCPZ or CLP257 was associated with increased surface KCC2 expression. 2-hour application of PCPZ or CLP257 had no effect on either total KCC2 expression (Figure 3A, p=0.137 and p=0.893, respectively) or the ratio of surface to total expression (Figure 3B, p=0.735 and p=0.8, respectively). Therefore, enhanced KCC2 function by PCPZ or CLP257 cannot be explained by increased expression of the transporter. PCPZ and CLP257 also had no effect on total NKCC1 expression (Supplementary fig4, p=0.100 and p=0.700, respectively) or the ratio of surface to total NKCC1 expression (Supplementary fig4, p=0.700 and p=0.700, respectively).

KCC2 function is regulated by fine-tuning of its diffusion and clustering properties (Côme et al., 2019). Thus, increased KCC2 function is often associated with reduced membrane diffusion and increased clustering (Chamma et al., 2013; Heubl et al., 2017). Membrane lateral diffusion of recombinant Flag-tagged KCC2 was evaluated in hippocampal neurons using single particle tracking (see Methods). KCC2 lateral diffusion was reduced by PCPZ and CLP257, both in the vicinity and outside of GABAergic synapses. Thus, both CLP257 and PCPZ reduced recombinant KCC2 diffusion coefficient (extrasynaptic: -36.5±14.9% p<0.001; synaptic: -26.2±14.0% p=0.011 for PCPZ and extrasynaptic: -20.7±4.9% p=0.003; synaptic: +9.4±11.2% p=0.97 for CLP257) and explored area (extrasynaptic: -39.7±17.2% p<0.001; synaptic: -30.6±25.4% p<0.001 for PCPZ and extrasynaptic: -25.1±2.7% p<0.001; synaptic: +4.9±19.4% p=0.80 for CLP257; Figure 3C-D). This effect was associated with increased clustering of the transporter, as detected in immunocytochemistry assays revealing enhanced cluster intensity (+109.0±61.4% p<0.001 and +33.9±13.6% p=0.005, respectively) and area (+45.3±18.1% p<0.001 and +36.3±20.4% p<0.001, respectively) with no significant change in cluster density (-6.6±8.4% p=0.13 and -3.5±4.2% p=0.34; Figure 3E-F). Importantly, this effect was observed after 2 hours of PCPZ or CLP257 application, but not after 30 minutes only (Figure 3E-F). In addition, the effect of PCPZ on KCC2 clustering did not involve D2R antagonism, since 2h treatment with eticlopride had no significantly effect on cluster intensity, area or density (Supplementary fig5).

Altogether, our results demonstrate that both PCPZ and CLP257 act to enhance KCC2 net function and promote KCC2 clustering, with no effect on total KCC2 expression or surface/total expression ratio. Thus, PCPZ and CLP257 likely induce a redistribution of membrane-inserted KCC2, resulting in enhanced clustering and function.

KCC2 membrane stability, clustering and turnover are under control of a variety of post-translational mechanisms, including phosphorylation of key residues - in particular in its large carboxy-terminal domain - that regulate its net transport function (Côme et al., 2019; Kahle et al., 2015; Virtanen et al., 2021). Phosphorylation of serine 940 (S940) by protein kinase C is known to increase KCC2 membrane stability and function (Chamma et al., 2013; Lee et al., 2007). In contrast, phosphorylation of 906 and 1007 threonine residues (T906, T1007) by the With-no-lysine (WNK) kinase pathway has been shown to negatively regulate KCC2 function in cortical neurons by affecting its membrane diffusion and clustering (de Los Heros et al., 2014; Heubl et al., 2017). We therefore asked whether PCPZ and CLP257 may act to modulate phosphorylation of these residues to promote KCC2 function.

Immunoprecipitation assays from adult rat hippocampo-cortical slices (Figure 4A-B, see Methods) revealed no significant effect of CLP257 or PCPZ on KCC2 phosphorylation at either S940 (-19.7±34.4%, p=0.597 and +20.3±18.7%, p=0.339), T1007 (-18.5±17.1%, p=0.340 and +26.4%±17.0% p=0.195 respectively) or T906 residues (-12.7±10.9%, p=0.308 and -10.2±10.4%, p=0.384 respectively). Consistent with these results, CLP257 and PCPZ also had no significant effect on phosphorylation of the WNK effectors SPAK (S373, +33.3±24.0%, p=0.238 and +36.9±48.4%, p=0.488 respectively) and OSR1 (S325, +11.5±18.5%, p=0.568 and +11.8±23.5%, p=0.641, respectively) or their total expression levels (SPAK, -6.0±17.4%, p=0.748 and -12.3±6.4%, p=0.124, respectively; OSR1, -2.2 ±8.3%, p=0.800 and +26.3±12.8%, p=0.108, respectively) (Figure 4C-D). In contrast, the pan-WNK inhibitor WNK463 (Yamada et al., 2016) reduced phosphorylation of T1007 (-78.7 ±3.3%, p<0.001) and to a lesser extent of S940 (-14.4±4.7%, p=0.0365) but not T906 (-13.7 ±12.5%, p=0.333) (Figure 4A-B). These effects of WNK463 were associated with a significant reduction of SPAK (S327, -84.1±4.6%, p<0.001) and OSR1 phosphorylation (S325, -81.0±5.6%, p<0.001) (Figure 4C-D). Thus, CLP257 and PCPZ appear to potentiate KCC2 clustering and function independent of significant changes in phosphorylation of canonical serine and threonine residues. Consistent with this conclusion, these compounds showed no direct inhibitory effect on either WNK1, WNK3, SPAK or OSR1 in *in vitro* kinase assays (Supplementary fig6).

Finally, phosphorylation of Y903 and Y1087 KCC2 residues was reported to affect KCC2 clustering and function (Lee et al., 2010; Watanabe et al., 2009). We therefore tested the effect of CLP257 and PCPZ on the phosphorylation of these residues in adult rat hippocampo-cortical slices (Figure 4E-F).

Whereas tyrosine phosphatase inhibitor sodium orthovanadate (Na_3VO_4) increased KCC2 tyrosine phosphorylation (+89.1±45.4%, p=0.029), CLP257 and PCPZ showed no significant effect (+19.0±15.0%, p=0.343 and +6.4±14.7%, p=1 respectively). Together, our results demonstrate that PCPZ and CLP257 potentiate KCC2 function, reduce its diffusion and increase its clustering via a mechanism independent of the phosphorylation of its canonical residues.

Several arguments support that promoting KCC2 function may be beneficial in preventing epileptiform activity. Thus, subicular neurons with reduced KCC2 expression are paradoxically excited during interictal-like events recorded *in vitro* in postoperative tissue from mesial temporal lobe epilepsy (mTLE) patients (Huberfeld et al., 2007). In addition, KCC2 overexpression prevents epileptiform activity induced by optogenetic recruitment of somatic inhibition in a mouse model of acute seizures (Magloire et al., 2019).

We first tested the effect of PCPZ and CLP257 on tissue samples resected from patients with mesial temporal lobe epilepsy associated with hippocampal sclerosis and recorded using multielectrode arrays. As reported earlier (Cohen et al., 2002; Huberfeld et al., 2007), 29 out of 46 slices prepared from 13 postoperative samples displayed low-frequency events (<40Hz) identified as spontaneous interictal-like discharges (IILDs, Figure 5C). IILDs had a mean amplitude of 57.3±13.5 µV and occurred at a mean frequency of 0.4±0.1 Hz (Figure 5A). In 3 of 4 slices, the NKCC1 antagonist bumetanide (10 µM) reduced the amplitude or abolished IILDs, as previously described (Huberfeld et al., 2007) (Figure 5A). We then tested the effect of 2-hour incubation in 10 µM PCPZ or 100 µM CLP257 *vs.* vehicle only (DMSO; Figure 5B). Overall, both PCPZ and CLP257 significantly reduced the proportion of slices displaying IILDs (p<0.05 for both; Figure 5C). In slices from a group of 5 mTLE patients (group I), PCPZ near-abolished IILD frequency by 97.6±13.8% (p<0.001) (Figure 5D) with no effect on the amplitude of persisting IILDs (p=0.768, n=3) (Supplementary fig7). This reduced interictal-like activity did not reflect compromised neuronal integrity as it could be restored by increasing neuronal activity with a high-potassium/low magnesium ACSF (Figure 5B). In slices from the remaining 2 patients (group II), however, PCPZ failed to reduce either IILD frequency (+25.5±15.9%, p=0.356) (Figure 5D) or amplitude (+18.2±4.8%, p=0.165) (Supplementary fig7). Similarly, preincubation with CLP257 reduced IILD frequency by 96.5±2.3% (p<0.001) in slices from 5 out of 6 patients (Figure 5D) without affecting the amplitude of remaining IILDs (p=0.402, n=3) (Supplementary fig7).

In slices from the remaining patient, however, CLP257 showed little effect on the frequency (+12.6%) (Figure 5D) and the amplitude (-24.5%) of IILDs (Supplementary fig7). These data demonstrate that enhancing KCC2 function prevents epileptiform activity recorded *in vitro* in postoperative tissue from a majority of mTLE patients tested.

However, spontaneous ictal activity is rarely observed in slices from postoperative mTLE tissue (Huberfeld et al., 2013, 2011). In order to assess the anti-seizure potential of KCC2 enhancers, we therefore explored their effect on seizures occurrence in lithium-pilocarpine model of mTLE (Foffani et al., 2007) adapted to mice (Figure 6A). Since PCPZ but not CLP257 (Gagnon et al., 2013) may be readily used *in vivo*, we performed these experiments first with PCPZ. *Status epilepticus* (SE) was induced by intraperitoneal (i.p.) injection of the muscarinic agonist pilocarpine (see Methods, Figure 6A).

Mice usually developed SE within 10-20 min of pilocarpine injection, as detected by telemetric ECoG recordings (Figure 6B). SE was interrupted after 1 hour by i.p. injection of valium and ketamine (10 mg/kg each). ECoG recordings displayed intense IID activity and occasional seizures for hours to a few days post-SE (Figure 6C) followed by a seizure-free, latent period lasting 3-4 weeks before regular, spontaneous seizures were detected from day 35 post-SE (Figure 6D). Typical epileptiform activity such as interictal discharges (IIDs, <20 Hz) or high-frequency oscillations (>80 Hz, HFOs, Zijlmans et al., 2012) were also recorded (Figure 6D). In addition to these electrophysiological biomarkers, typical histological landmarks were detected in the hippocampus from these mice, including hippocampal sclerosis, granule cell dispersion or mossy fiber sprouting (Supplementary fig8), as well as a decrease in KCC2 immunoreactivity in the dentate gyrus (Supplementary fig8).

After a 5-day period of habituation with two daily saline injections (control period), we tested the effect of PCPZ injections (2 mg/kg, i.p., 9AM and 8PM) on the occurrence of seizures as well as epileptiform events (IIDs, HFOs) during the next 5 days (days 40-45 post-SE, test period). Only animals with an average of 0.5 seizure/day during the first 5 days were retained for further analysis. Whereas seizure frequency was not significantly different in animals receiving only saline during the test period (0.15±0.07 vs 0.18±0.06 seizure/hour, n=8 animals, p=0.118), PCPZ injection during this period reduced seizure frequency by about 40% as compared to the control period (0.09±0.05 vs 0.14±0.05 seizure/hour, p=0.01, and; Figure 6E).

Interestingly, PCPZ had no effect on seizure duration (29.8±1.8 vs 31.3±3.8 s, p=0.657 Supplementary fig9) or power (7422±2736 vs 6695±2058 mV^2, p=0.466 Supplementary fig9), suggesting it may act on mechanisms involved in seizure initiation rather than maintenance. In addition, and in agreement with our *in vitro* results on postoperative human tissue, PCPZ significantly reduced IID frequency by 34±10% *in vivo* as compared to control (192.0±39.3 vs 290.9±60.3 IID/hour, p=0.01) (Figure 6F). The effect of PCPZ was even stronger on HFO frequency, with a 57.6±38.2% reduction in mice receiving PCPZ (54.61±23.73 vs 128.68±71.88 HFO/hour p=0.012), whereas HFO frequency increased by 37.8±13.2% in the group receiving saline only (102.5±36.6 vs 64.7±23.7 HFO/hour, p=0.027; Figure 6F).

These data demonstrate that PCPZ both reduces interictal-like discharges in postoperative tissue from mTLE patients as well as chronic seizures and epileptiform activities (HFOs, IIDs) in an animal model of mTLE.

Discussion

In this study we identified for the first time the effect and mode of action of two KCC2 enhancers, CLP257 and PCPZ, in hippocampal neurons. Both reduce the lateral diffusion of KCC2, increase its clustering and function. This effect is independent of changes in the expression of KCC2, the phosphorylation level of its canonical residues and the WNK/SPAK pathway. In addition to this effect on KCC2 function, we also showed that CLP257 directly modulates extrasynaptic $GABA_AR$. Furthermore, both compounds suppressed spontaneous, interictal-like discharges recorded in postoperative hippocampal tissue resected from intractable, mesial TLE patients. Finally, chronic administration of PCPZ reduced seizure occurrence and frequency of epileptiform events in a lithium-pilocarpine mouse model of temporal lobe epilepsy. Thus, our results provide the first proof-of-concept of the therapeutic potential of these compounds, including PCPZ, in a drug-resistant form of epilepsy and suggest that these compounds may also have therapeutic potential in other pathologies involving decreased KCC2 expression.

Several forms of epilepsy are associated with KCC2 downregulation (Kaila et al., 2014), leading to paradoxically excitatory signaling by $GABA_A$ receptors (Huberfeld et al., 2007; Pallud et al., 2014).

Although pro-GABAergic drugs such as benzodiazepines and other $GABA_A$ receptor-positive allosteric modulators are often effective in epilepsy (Greenfield, 2013), acting to directly potentiate GABA signaling when intraneuronal chloride levels are abnormal may exacerbate rather than prevent seizures. Restoring neuronal chloride homeostasis therefore appears as a promising therapeutic strategy in forms of pharmaco-resistant epilepsy. One approach to reduce intraneuronal chloride consists in blocking chloride import, using NKCC1 antagonists such as bumetanide. Although this approach was used successfully in some animal models of CNS disorders (Banerjee et al., 2016; Dargaei et al., 2018; Kourdougli et al., 2017; Lozovaya et al., 2019) it is not optimal as i) bumetanide is largely bound to plasma proteins and very poorly crosses the blood brain barrier (Puskarjov et al., 2014) ii) bumetanide is actively extruded from the brain by organic anion transporters (Donovan et al., 2015; Römermann et al., 2017; Töllner et al., 2015) and iii) NKCC1 is widely expressed in many peripheral organs and tissues, raising issues regarding the number of undesirable side effects. In fact, two clinical trials (NCT01434225; NCT00830531) were conducted to evaluate the potential of bumetanide for the treatment of neonatal seizures (Pressler et al., 2015; Soul et al., 2021).

One of them, the NEMO trial (Pressler et al., 2015), was interrupted prematurely as bumetanide failed to reach the primary endpoint and because hearing loss was observed in 3/11 surviving patients, likely due to the involvement of NKCC1 in the maturation of cochlear hair cells (Pace et al., 2001).

Instead, KCC2 is almost exclusively expressed in neurons, making it a prime target for neurological disorders associated with deficits in neuronal chloride homeostasis, such as epilepsy. Acting to promote KCC2 function, even when its expression may be reduced in the pathology, may help rescue neuronal chloride export and inhibitory GABA signaling. CL-058 was the first compound identified as a candidate KCC2 enhancer by screening of small molecule libraries on a mouse neuroblastoma cell line (Gagnon et al., 2013). It was then chemically optimized into CLP-257 and CLP-290 with improved EC50 and half-life for *in vivo* applications. Whereas CLP drugs were initially described as specific KCC2 enhancers with little or no activity on other cation-chloride cotransporters (Gagnon et al., 2013), a more recent study challenged this view and showed no effect on KCC2 function (Cardarelli et al., 2017). Instead, this study revealed a direct binding and potentiating action on $GABA_A$ receptors. Although still controversial (Gagnon et al., 2017), these results challenged the view of CLP drugs as pure KCC2 enhancing molecules.

Consistent with these observations, we now report that CLP257 acts both as a KCC2 enhancer and a positive, allosteric modulator of extrasynaptic but not synaptic $GABA_A$ receptors in rat hippocampal neurons. These data may help reconcile apparently conflicting results obtained on recombinant $GABA_A$ receptors expressed in heterologous cells (Cardarelli et al., 2017; Gagnon et al., 2017).

CLP-257 and CLP-290 suppressed hyperalgesia in different rodent models (Ferrini et al., 2017; Gao et al., 2022; Paige et al., 2022) and induced partial functional recovery in models of chronic pain upon peripheral nerve injury (Gagnon et al., 2013) and spinal cord injury (Bilchak et al., 2021; Chen et al., 2018), all associated with altered KCC2 expression and GABA signaling. However, only one study has explored the effect of CLP290 in the context of epilepsy and more specifically on neonatal seizures (Sullivan et al., 2021). This study showed that CLP-290 restored KCC2 expression and the effect of phenobarbital at P7. In addition, they suggested that this compound prevents epileptogenesis by showing reduced sensitivity of CLP-290-treated animals to PTZ-induced seizures. However, this cannot be considered an effect on epileptogenesis since CLP-290 was not tested on the occurrence of spontaneous and recurrent seizures but on pharmacologically induced seizures.

Two other studies have reported an effect of CLP-257 on epileptiform activity pharmacologically induced *in vitro* (Hamidi and Avoli, 2015) or recorded in an *in vitro* model of post-traumatic epileptogenesis (Dzhala and Staley, 2021), with somewhat contrasting and opposite results. How these effects relate to spontaneous ictogenesis *in vivo* remained unknown. Our new data now demonstrate that CLP257 increased KCC2 function through enhanced membrane clustering of the transporter and strongly reduces spontaneous epileptiform activity recorded *in vitro* from human postoperative tissue from mTLE patients.

Interestingly, we found that, in contrast to many studies showing that CLP257 or CLP290 restored total or membrane KCC2 expression and phosphorylation level of S940 (Bilchak et al., 2021; Ferrini et al., 2017; Gagnon et al., 2013; Gao et al., 2022; Lizhnyak et al., 2019; Sullivan et al., 2021), CLP257 did not affect these parameters in our hippocampal neurons under non-pathological conditions. These results are in agreement with *in vitro* (Cardarelli et al., 2017) and *in vivo* (Doi et al., 2021) studies showing that this compound had no effect on KCC2 expression under physiological conditions, suggesting that the effects observed in animal models of pathology are likely revealed due to the low basal level of KCC2 expression and phosphorylation at S940.

PCPZ is commonly known as a dopamine D2 antagonist, although it also interacts with serotoninergic, adrenergic, muscarinic and histaminergic receptors as well as with dopamine or norepinephrine transporters (Appl et al., 2012; Richelson and Nelson, 1984; Richelson and Pfenning, 1984; Silvestre and Prous, 2005). It was first suggested as a candidate KCC2 enhancer by screening of the Prestwick library on HEK cells expressing recombinant KCC2 (Liabeuf et al., 2017). It was then shown to reduce the depolarizing driving force of evoked IPSCs in immature (P6) rat spinal motoneurons upon spinal cord injury. This effect was associated with an apparent increase in KCC2 surface expression in these cells. Related to this, a recent study also found an increase in KCC2 expression in motoneurons of the spinal cord upon PCPZ treatment (Kalashnikov et al., 2021). However, whether PCPZ acts similarly in CNS neurons was unknown, as were the underlying mode of action. We now demonstrated that PCPZ acts as a genuine KCC2 enhancer in rat hippocampal neurons. Unlike CLP257, PCPZ showed no direct functional effect on $GABA_A$ receptors, but significantly increase mIPSCs frequency. This effect did not involve D2R and may instead involve presynaptic blockade of histaminergic receptors 3 (H3R) (Cilz and Lei, 2017; He et al., 2016).

Functional enhancement of KCC2 in neurons is associated with increased clustering of the transporter with no apparent change in total or surface expression, in contrast to earlier observations in motoneurons (Liabeuf et al., 2017). Surprisingly, this effect does not involve changes in the phosphorylation of canonical serine, threonine or tyrosine residues, suggesting that it may act on other phosphorylation sites such as those identified in large-scale proteomics studies (Cordshagen et al., 2018; Smalley et al., 2020; Weber et al., 201). It may also involve changes in protein-protein interactions. For example, interaction of KCC2 with the SNARE proteins SNAP23 and syntaxin 1A is essential for the mZnR/GPR39-dependent upregulation of KCC2 activity (Asraf et al., 2022). However, this modulation involves regulation of KCC2 membrane insertion, which was not observed in our surface biotinylation assays after a treatment with CLP257 or PCPZ. Others candidates such as CCC CIP1 (Wenz et al., 2009), Neto2 (Ivakine et al., 2013), CKB (Inoue et al., 2006), PAM (Garbarini and Delpire, 2008) and gephyrin (Al Awabdh et al., 2022) are of particular interest since they interact with KCC2 and increase its function. Finally, KCC2 enhancers may act to promote KCC2 accumulation into lipid rafts, resulting in enhanced transporter function (Watanabe et al., 2009).

PCPZ is a first-generation antipsychotic with FDA approval and indications in schizophrenia, migraine as well as nausea and vomiting (Din and Preuss, 2022; Furyk et al., 2015). PCPZ administration is primarily intramuscular and oral for psychiatric indications, although parenteral and rectal administration is also possible (Chokhawala and Stevens, 2022). Side effects are generally mild in adults (Din and Preuss, 2022, p. 202) but adverse effects such as sedation and extrapyramidal symptoms have been reported in children (Lau Moon Lin et al., 2016). In some rare cases, PCPZ administration in children was reported to cause seizures (Lau Moon Lin et al., 2016).

Instead, we now provide evidence that PCPZ shows significant antiepileptic properties in two experimental models. First, like CLP257, PCPZ significantly suppressed spontaneous, interictal-like discharges recorded in vitro from slices of postoperative brain samples of 5 out of 7 mTLE patients. This effect is comparable to that of bumetanide on various postoperative epileptic brain samples (Blauwblomme et al., 2019; Huberfeld et al., 2007; Pallud et al., 2014), adding to the evidence that rescuing neuronal chloride transport may be an effective anti-epileptic strategy. Second, it reduced spontaneous seizure occurrence and frequency of epileptiform activities, such as IIDs and HFOs, in a mouse model of mTLE.

Interestingly, we observed an increase in HFOs frequency over time in epileptic mice treated with saline. Whether this increase is due to injection-induced stress or a progression of the chronic phase remains to be determined, but our results reinforce the idea that these events are good biomarkers of epilepsy (Worrell et al., 2004, p. 200).

Altogether, these results demonstrate that PCPZ may act as an effective antiepileptic drug, alone or in combination with pro-GABAergic compounds. It will now be interesting to test its effects on seizure occurrence in patients with pharmaco-resistant epilepsies.

Methods

Primary hippocampal cultures

All animal procedures were carried out according to the European Community Council directive of 24 November 1986 (86/609/EEC), the guidelines of the French Ministry of Agriculture and the Direction Départementale de la Protection des Populations de Paris (Institut du Fer à Moulin, license C 72-05-22). All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used.

Primary cultures of hippocampal neurons were prepared as previously described (Gauvain et al., 2011; Heubl et al., 2017). Briefly, hippocampi were dissected from embryonic day 18-19 Sprague-Dawley rats of either sex. Tissue was then trypsinized (0.25% v/v), and mechanically dissociated in 1× HBSS (Invitrogen) containing 10 mM HEPES. Neurons were plated at a density of 120 × 103 cells/ml onto 18-mm diameter glass coverslips (Assistent) pre-coated with 50 µg/ml poly-D, L-ornithine (Sigma-Aldrich) in plating medium composed of Minimum Essential Medium (MEM, Sigma-Aldrich) supplemented with horse serum (10% v/v, Invitrogen), L-glutamine (2 mM) and Na+ pyruvate (1 mM) (Invitrogen). After attachment for 3–4 h, cells were incubated in culture medium composed of Neurobasal medium supplemented with B27 (1x), L-glutamine (2 mM), and antibiotics (penicillin 200 units/ml, streptomycin, 200 µg/ml; Invitrogen) for up to 4 weeks at 37 °C in a 5% CO2 humidified incubator. Each week, one fifth of the culture medium volume was renewed.

Pharmacology

Prochlorperazine dimaleate (Sigma-Aldrich) stock was prepared at 25 mM in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich) and used at a final concentration of 10 µM. CLP257 (Tocris) stock was prepared at 10 mM in DMSO and used at a final concentration of 100 µM. WNK463 (Tocris) stock was prepared at 50 mM in DMSO and used at a final concentration of 10 µM.

Equimolar DMSO concentration was used as control. Eticlopride hydrochloride (Tocris) stock was prepared at 2 mM in H_20 and used at a final concentration of 2 µM. Sodium orthovanadate (Sigma-Aldrich) stock was prepared at 100 mM in H_20 and used at a final concentration of 100 µM.

For most experiments on hippocampal cultures, neurons were pre-incubated for 2 hours with either DMSO, PCPZ, CLP257 or Eticlopride in a CO2 incubator set at 37°C. Drugs were added directly to the culture medium. For some electrophysiology experiments, neurons were also recorded in presence of these drugs in the bath. For biochemistry experiments on rat hippocampo-cortical slices, slices were incubated with either DMSO, CLP257, PCPZ, WNK463 or sodium orthovanadate for 2 hours in interface chambers set at 37°C. For human tissue experiments, slices were pre-incubated with either DMSO, CLP257 or PCPZ for 2 hours in interface chambers set at 37°C and then also recorded in presence of these compounds.

Cellular electrophysiology

Neurons were maintained at 33°C in an extracellular medium containing (in mM): NaCl 120, D-glucose 20, HEPES 10, MgCl2 3, KCl 2, CaCl2 2 (pH 7.4), in a recording chamber (Luigs & Neumann) equipping an upright microscope (BX51WI; Olympus). Neurons were patch clamped in whole-cell configuration, with a borosilicate glass pipette containing (in mM): K-gluconate 104, KCl 25.4, HEPES 10, EGTA 10, MgATP 2, Na3GTP 0.4 and MgCl2 1.8 (pH 7.4) and held at -65mV. GABAergic currents were induced at the somatic or dendritic level (approx. 50-80 µm from the soma) by focal application of isoguvacine (100 µM, Sigma-Aldrich) through a second pipette connected to a PicoSpritzer set at 10 psi for 10 (soma) or 100 (dendrites) ms. GABAergic currents were induced by locally uncaging RubiGABA (30 µM) using a laser pulse (405 nM, Omicron Deepstar) of 1-8 ms and 15-80 mW delivered using a photolysis head (Prairie Technologies) through the objective (Otsu et al., 2020). Neurons were voltage clamped from -85 to -5 mV with 3.5 s step increments of 10 mV. The current-voltage relation of somatic and dendritic currents was then calculated from the peak amplitude of GABAergic currents recorded at each potential, corrected for the liquid junction potential (-15.2 mV in our conditions) and voltage drop across the access resistance.

The same protocol was used for testing the effect of KCC2 enhancers on extrasynaptic $GABA_A$ receptors but GABAergic currents were induced only at the somatic level. Neurons were voltage clamped at -65 mV and recorded before (DMSO) and after the addition of KCC2 enhancers (CLP257 or PCPZ) in the bath. Access resistance (Ra) and input resistance (Ri) were stable during the recordings. Igaba amplitude was calculated as the average peak amplitude of GABAergic currents, recorded 2min before and after drug addition.

To calculate $GABA_AR$ deactivation time constant, the currents were averaged in the same time-window before/after and the phase of current deactivation was obtained by fitting it to a single exponential.

To test the effect of KCC2 enhancers or Eticlopride on synaptic $GABA_A$ receptors, neurons were maintained at 33°C in the same extracellular medium as above and patch clamped, in whole-cell configuration with a borosilicate glass pipette containing (in mM): CsCl 135, HEPES 10, EGTA 10, MgATP 4, Na3GTP 0.4 and MgCl2 1.8 (pH 7.4) and held at -60mV. Spontaneous mIPSCs were recorded before (DMSO) and after the addition of KCC2 enhancers (CLP257 or PCPZ) or Eticlopride in the bath. mIPSCs amplitude and frequency were analyzed with DETECTiVENT 4.0, (Ankri et al., 1994). To measure the deactivation time constant of synaptic $GABA_ARs$, 100 events were averaged and the phase of current deactivation was obtained by fitting it to a simple exponential.

Surface biotinylation

Neurons were washed with ice-cold PBS three times, and then incubated with PBS supplemented with 0.5-1mg/ml EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin (Pierce, Rockford, IL, USA) at 4°C for 30 min under gentle agitation. Biotinylation was stopped by addition of Tris-HCl (50 mM; pH 7.4) and cells lysed in a modified RIPA buffer containing (in mM): Tris-HCl 50 (pH 7.4), NaCl 150, 1% Nonidet P-40, 0.5% DOC, 0.1% SDS, NaF 50, Na3VO4 1 and protease and phosphatase inhibitors (Roche). Lysates were then collected by gently scraping the bottom of each well. After complete homogenization, samples were centrifuged and the supernatant was collected. A small fraction of the lysates was kept for input KCC2 and total protein quantification using BCA kit (Thermo Scientific). Lysates were mixed with a 50% slurry of Neutravidin beads (Thermo Scientific) and rotated overnight at 4°C.

Beads were then pelleted by centrifugation and the supernatant (non-biotinylated fraction) was collected. Beads were then washed three times in modified RIPA buffer and one time in modified RIPA buffer without detergents. After the last wash, the biotinylated fraction was carefully removed from the beads. Total, biotinylated and non-biotinylated fractions were then denaturated in 10% β-mercaptoethanol and negatively charged in 6x SDS sample buffer at 37°C for one hour.

Samples were subjected to electrophoresis on polyacrylamide gradient gels (4-12%) and transferred to nitrocellulose membranes. The transfer efficiency was checked by addition of red Ponceau. Membranes were washed for 30 min with TBS-tween solution (TBST; Invitrogen) and blocked with a solution containing 5% (w/v) skim milk. Membranes were then incubated with a rabbit primary antibody against KCC2 (07-432; Millipore; 1:3000) or a goat one against NKCC1 (ab99558; abcam; 1:500) and a mouse primary antibody against neuron-specific beta-III tubulin (clone TuJ-1; MAB1195; R&D System; 1:1000) overnight at 4°C. They were then washed three times with a TBST-milk solution and incubated for one hour at RT with goat secondary antibodies anti-rabbit DyLight 800 (1:3000; Rockland) or donkey secondary antibodies anti-goat DyLight 800 (1:3000; Rockland), and anti-mouse DyLight 700 (1:1000; Rockland). Membranes were then washed again with TBST three times and one time with TBS. Fluorescence was detected using Odyssey infrared imaging system (LI-COR Bioscience). The relative intensities of immunoblot bands were determined by densitometry using ImageJ software. Total KCC2 protein expression was determined as the sum of monomeric and oligomeric bands normalized to tubulin. Surface expression of KCC2 was determined as the ratio of monomeric + oligomeric biotinylated KCC2 fraction vs. total KCC2 fraction (biotinylated fraction + non-biotinylated fraction).

DNA constructs and transfection

For single-particle-tracking experiments, a previously described KCC2-Flag construct was used (Heubl et al., 2017). This recombinant Flag-tagged KCC2 transporter was shown to retain normal traffic and function in transfected hippocampal neurons. All constructs were sequenced by Beckman Coulter Genomics (Hope End, Takeley, U.K).

Neuronal transfections were performed at DIV 13–14 using Transfectin (BioRad), according to manufacturer's instructions (DNA:transfectin ratio 1 µg:3 µl), with 1-1.5 µg of plasmid DNA per 20 mm well. Experiments were performed 7–10 days post-transfection.

Single-particle tracking and analysis

Neurons were stained as previously described (Heubl et al., 2017). Briefly, cells were incubated for 6 min at 37 °C with a mouse anti-Flag antibody (mouse, 1:300, Sigma-Aldrich), washed and incubated for 6 min at 37 °C with a biotinylated Fab goat anti-mouse antibody (1:300; Jackson Immuno Research) in imaging medium.

After washes, cells were incubated for 1 min with streptavidin-coated quantum dots (QDs) emitting at 655 nm (1 nM; Invitrogen) supplemented with PBS (1 M; Invitrogen) and 10% Casein (v/v) (Sigma).

Cells were imaged using an Olympus IX71 inverted microscope equipped with a 60X objective (NA 1.42; Olympus) and a 120 W Mercury lamp (X-Cite 120Q, Lumen Dynamics). QD real time recordings (integration time of 30 ms over 1200 consecutive frames) were acquired with an ImagEM EMCCD camera and MetaView software (Meta Imaging 7.7). Cells were imaged within 45 min following appropriate drugs pre-incubation.

QD tracking and trajectory reconstruction were performed with homemade Matlab routines, as described (Heubl et al., 2017). For each imaged neuron, one or two dendritic subregions were quantified. Mean square displacement (MSD) over time plots were calculated as described and diffusion coefficients (D) were calculated by fitting the first four points without origin of the MSD vs. time curves with the equation: $MSD(n\tau) = 4Dn\tau + b$, where b is a constant reflecting the spot localization accuracy. The explored area of each trajectory was defined as the MSD value of the trajectory at two different time intervals of at 0.42 and 0.45 s.

Immunocytochemistry

Neurons were fixed for 15 min at room temperature (RT), with paraformaldehyde (PFA, 4% w/v in PBS). Cells were then washed in PBS, permeabilized with 10% Triton X100 for 4 min at RT and then exposed to a blocking solution containing goat serum (20% v/v; Invitrogen) and 0.1% Triton X100 diluted in PBS. Neurons were incubated for 1 hour at RT with rabbit KCC2 antibody (07-432; Millipore; 1:500) and mouse MAP2 antibody (MAB378; Chemicon; 1:500). Neurons were then incubated for 45 min at RT with AlexaFluor 488-conjugated goat anti-mouse antibody (AB_2338840; Jackson Labs; 1:400) and with Cy3-conjugated goat anti-rabbit antibody (111-165-003; Jackson Labs; 1:400). Neurons were then labeled with DAPI (1:2000, 5 min), washed in PBS and mounted on slides with Mowiol 844 (48 mg/ml, Sigma).

Fluorescence image acquisition and analysis

Images were acquired using a 63x objective (NA 1.40) mounted on an upright epifluorescence microscope (DM6000, Leica) equipped with a 12-bit cooled CCD camera (Micromax, Roper Scientific) operated with MetaMorph software (Roper Scientific).

For KCC2 clusters detection, exposure time was adjusted to obtain best fluorescence to noise ratio and to avoid pixel saturation. This exposure time was maintained unchanged among cells and conditions. For experiments on non-transfected cells and for each neuron, dendritic sections were chosen using MAP2 labeling and then an image with tetramethylrhodamine (TRITC) filter was acquired to visualize KCC2 labeling.

KCC2 clusters analysis was performed using MetaMorph software (Roper Scientific), as previously described (Heubl et al., 2017). Images were first flatten-background filtered (kernel size, 3×3×2) to enhance cluster outline and a user-defined intensity threshold was applied to select clusters and avoid their coalescence. Clusters were delineated in the area of interest (AOI) and the corresponding regions were transferred onto raw images to quantify cluster density (mean KCC2 cluster number per 10 µm2), cluster area and integrated cluster intensity (integrated fluorescence pixel intensity within clusters). For each culture, the analysis was done on 10 cells per condition and approx. 100 clusters per cell.

Immunoprecipitation and immunoblot

8-weeks old Sprague Dawley male rats were anesthetized by intraperitoneal ketamine/xylazine injection (120/10 mg/kg) and perfused transcardially with ice-cold (0-4°C), oxygenated solution (O_2/CO_2 95/5%), containing (in mM): N-methyl-d-glucamine 93, KCl 2.5, NaH2PO4 1.2, NaHCO3 30, HEPES 20, D-glucose 20, ascorbic acid 5, sodium pyruvate 3, MgSO4 10 and CaCl2 0.5 (300-310mOsm, pH7.4). Brains were removed and transverse hippocampal-cortices slices (400 µm thick) were prepared in the same solution using a vibratome (HM650V, Microm). Slices were then incubated for 2-hours with DMSO, the KCC2 enhancers (CLP257, PCPZ, WNK43) or sodium orthovanadate in an interface chamber containing artificial cerebrospinal fluid (ACSF) composed of (in mM): D-glucose 10, KCl 3.5, NaHOC3 26, NaH2PO4 1.25, NaCl 126, CaCl2 1.6 and MgCl2 1.2 (290 mOsm), equilibrated with 5% CO2 in 95% O2. After the treatments, slices were washed with cold PBS, instantaneously frozen with liquid nitrogen and stored at -80°C.

Slices were mechanically lysed on ice, using a 2mL Dounce, in a buffer containing (in mM): Tris/HCl, pH 7.5 50, EGTA 1, EDTA 1, sodium orthovanadate 1, sodium-B-glycerophosphate 10, sodium fluoride 50, sodium pyrophosphate 5, sucrose 270, benzamidine 1, phenylmethylsulfonyl fluoride 2, Triton 10%, (v/v) 2-mercaptoethanol 0.1% and protease inhibitors (Roche).

After complete homogenization, samples were centrifuged (16,000xg at 4°C for 10 min) and the supernatant was collected. Protein quantification was done using Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific) with BSA as standard.

The following phosphorylation site-specific antibodies: anti-KCC3A phospho Thr1048 (0.35mg/ml, sheep, [S0961C] 1st bleed, Dundee), anti-KCC3A phospho Thr 991 (0.26mg/ml, sheep, [S959C] 1st bleed, Dundee) were first incubated for 30 min at 4°C with the corresponding non-phosphorylated peptide (10mg/ml, Dundee).

Phospho-antibodies or anti-KCC2 antibodies (07-432; Millipore) were then coupled with protein-G–Sepharose (4 Fast Flow; Sigma-Aldrich) at a ratio of 15µg of antibody per 100µl of beads, for 2 h at 4°C without agitation. 1.5mg of clarified cell lysate was incubated with the antibody-coupled bead suspension, overnight at 4 °C under gentle agitation. The supernatant was collected after centrifugation and beads were washed twice with NaCl solution (0.25M NaCl in 1x PBS) and twice with PBS alone. Bound proteins were eluted with 2× LDS sample buffer (Invitrogen) containing 0.5% (v/v) 2-mercaptoethanol and denaturated at 75°C for 20 min (IP with phospho-antibodies) or 37°C for 1 h (IP with anti-KCC2 antibodies) before centrifugation (13,000xg at 4°C for 15-20 min).

Samples were subjected to electrophoresis on polyacrylamide gradient gels (4-12% bis-tris gels) and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were rinsed with TBS-tween solution (TBST; Invitrogen) and blocked with 5% (w/v) skim milk. The membranes were then immunoblotted in 5% (w/v) skim milk in TBST with a primary antibody against KCC2 (rabbit, 07-432; Millipore; 1:1000) or phosphotyrosine (mouse, clone 4G10, Millipore, 1:1000), and a mouse primary antibody against neuron-specific beta-III tubulin overnight at 4 °C (clone 2G10; T8578; Sigma-Aldrich; 1:1000). They were then washed three times with distillated water, three times with TBST-milk solution and incubated for one hour at RT with goat secondary antibodies anti-rabbit IRDye 800 (1:3000; LI-COR), goat anti-mouse IRDye 700 (1:3000; LI-COR) or donkey anti-sheep DyLight 800 (1:3000; Rockland). Membranes were then washed again with TBST three times and one time with TBS.

Fluorescence was detected and the relative intensities of immunoblot bands were determined using Odyssey infrared imaging system (LI-COR Bioscience).

For immunoblots without immunoprecipitation, the following antibodies were used for immunodetection of total KCC2, KCC2 phospho S940, total SPAK/OSR1, SPAK phospho Ser373/OSR1 phospho S325: rabbit anti-KCC2 (07-432; Millipore; 1:1000), rabbit anti-KCC2 pS940 (p1551-940, phosphosolutions), sheep anti-SPAK (S551D, third bleed, Dundee) and sheep anti-phospho-SPAK (Ser373)/ phospho-OSR1 (Ser325) antibodies (S670B, second bleed, Dundee).

Kinase profiling assays

Kinase activity profiles (data not shown) were performed using radiometric assays to measure kinase catalytic activity for PCPZ concentrations ranging 0.1-500 µM in DMSO or CLP257 concentrations ranging 0.1-1000 µM in DMSO, in the presence of 70 µM ATP. Equimolar DMSO concentrations were used as control. Additional information on the kinase profiler assay can be obtained from the contractor's website:

(https://www.eurofinsdiscoveryservices.com/cms/cms-content/services/in-vitro-assays/kinases/kinase-profiler).

Human tissue and multi-electrode recordings

Patients or their legal guardians informed consent to participate in the study. Patients (13 patients, 3 males, 4 female, age range: 16-54 years) diagnosed with mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis underwent multimodal preoperative neurological, neurophyschological and psychiatric evaluations as well as video-electroencephalographic recording, magnetic resonance imaging and fluorodeooxyglugose positron emission tomography. Cortectomies were performed at Sainte-Anne Hospital by neurosurgeons B. Devaux and B. Turak and at Pitié-Salpêtrière Hospital by neurosurgeons S. Clémenceau and B. Mathon. Cortical specimens collected in the operating room were immediately transported in ice-cold (0-4°C), oxygenated solution (O2/CO2 95/5%), containing (in mM): N-methyl-d-glucamine 93, KCl 2.5, NaH2PO4 1.2, NaHCO3 30, HEPES 20, D-glucose 20, ascorbic acid 5, sodium pyruvate 3, MgSO4 10 and CaCl2 0.5 (300-310mOsm, pH7.4) and transported within 15 minutes to the laboratory. Transverse hippocampal-subicular slices (400 µm thick) were prepared in the same solution using a vibratome (HM650V, Microm).

They were maintained for 20-30 minutes at 37°C and then at room temperature in an interface chamber containing artificial cerebrospinal fluid (ACSF) composed of (in mM): D-glucose 10, KCl 3.5, NaHOC3 26, NaH2PO4 1.25, NaCl 126, CaCl2 1.6 and MgCl2 1.2 (290 mOsm), equilibrated with 5% CO2 in 95% O2.

Multielectrode array recordings were performed using a MEA2100 station (Multi Channel Systems) equipped with a 120-microelectrode array chamber (custom 12x10 layout, 30 µm TiN electrodes spaced 1mm vertical and 1.5mm horizontal).

Slices were maintained in the recording chamber using a home-made platinum-nylon harp and superfused with pre-warmed (37°C) oxygenated ACSF at a rate of 6ml/min. Slices were imaged using a video-microscope table (MEA-VMT1, Multi Channel Systems) in order to register the location of electrodes with respect to the slice. Extracellular signals were acquired at a sampling rate of 10 kHz using Multi Channel Experimenter (Multi Channel Systems) and analyzed offline using homemade software (Matlab, The Mathworks).

Mouse model of temporal lobe epilepsy and ECoG recordings

Our procedures were all approved by local ethics committee (Charles Darwin, Apafis 202008050923999 v4). 8 weeks-old male C57Bl6/J mice were used in a lithium-pilocarpine-based model of temporal lobe epilepsy as described (Foffani et al 2007). In brief, animals received an intraperitoneal (ip) injection of LiCl (423 mg/kg) and scopolamine (1 mg/kg), respectively 18-24 hours and 1 hour prior to pilocarpine. Pilocarpine (75 mg/kg) was then injected ip and mice were continuously monitored for the onset of status epilepticus (SE). In mice in which the first pilocarpine injection had not triggered SE after one hour, a second injection at 20 mg/kg was performed. SE was interrupted one hour after onset by ip injection of diazepam and ketamine (both at 10 mg/kg). All animals received subcutaneous injection of 500µl of NaCl 0.9% 1 hour and 4 hours after SE termination in order to minimize dehydration. They were monitored daily for weight, behavior and were provided with enriched liquid food (Fortimel Energy®) for the first 5-7 days post SE. Mice showing >20% weight loss for more than 2 consecutive days were killed and discarded from further analysis.

For chronic PCPZ treatment, control and epileptic mice received two daily ip injections of either NaCl 0.9% or PCPZ (2mg/kg in NaCl 0.9%), 10-12 hours apart (typically 9AM and 8PM).

ECoG probe implantation was performed 28 days post SE in all mice except for 1 mouse that was implanted prior to SE induction in order to monitor chronic seizure onset. Mice were anesthetized with 4.5% isoflurane and maintained with 2-2.5%.

Telemetric ECoG probes (model A3028B, Open Source Instruments) were implanted subcutaneously and connected to stainless steel screws (1 mm diameter) stereotaxically inserted in the skull in holes drilled above the right hippocampus (1.94mm posterior and 1.25mm lateral with respect to Bregma) and above the cerebellum for reference. Screws were attached to the skull with dental cement. Mice received sc buprenorphine injection (0.05 mg/kg) 1 hour before the surgery, sc lidocaine injection (0.5 mg/kg) just before the surgery and two sc metacam injection (5mg/kg, right after and 24h after the surgery) in order to minimize pain. One week after implantation, ECoG signal (0.3-160 Hz) were recorded continuously using a telemetric Octal Data Receiver (Open Source Instruments) and LWDAQ software (Neuroarchiver, Open Source Instruments). The signal was amplified 100x and acquired at 512 Hz. Recordings were analyzed offline using homemade software (Matlab, The Mathworks). Briefly the signal was normalized, filtered (bandwidth 5-75 Hz), squared and an energy-threshold-based detection was used to detect seizures (events lasting longer than 5s). For high frequency oscillations (HFOs) and interictal discharges (IIDs) the ECOG signal was filtered using a minimum-order high-pass (>80 Hz) or low-pass (<20 Hz) filter, respectively. Events were then detected using threshold-based detection on a Walsh Metric.

Immunohistochemistry

9-weeks-old mice were sacrificed at D10 or D50 post SE to look at epileptic markers during epileptogenesis or the chronic phase, respectively. Briefly, mice were deeply anesthetized by i.p injection of euthasol (180mg/kg) and transcardially perfused with ice-cold (0-4°C), oxygenated solution (O_2/CO_2 95/5%), containing (in mM): N-methyl-d-glucamine 93, KCl 2.5, NaH2PO4 1.2, NaHCO3 30, HEPES 20, D-glucose 20, ascorbic acid 5, sodium pyruvate 3, MgSO4 10 and CaCl2 0.5 (300-310mOsm, pH7.4). Brains were removed, fixed in PFA 4% for 14-24 hours and stored in PBS solution containing 30% sucrose and 0.01% NaN3. Coronal sections (40 µm thick) were obtained using a cryotome (HM450, Microm) at -30°C, collected in PBS and stored at -20°C in Amaral.

Labelling was performed using rabbit antibodies against KCC2 (07-432; Millipore; 1:400) or rabbit anti-Synaptoporin (102003; Synaptic System; 1:300) to visualize mossy fibers, or rabbit anti-Prox1 (AB5475, Chemicon, 1:5000) to visualize granule cells (GCs) nuclei. Once removed from Amaral, slices were rinsed 3x1h in PBS and then permeabilized for 4h in a blocking solution (5% goat serum and 0.5% Triton in PBS). Slices were incubated for 48 hours at 4°C with primary antibodies diluted in blocking solution (5% goat serum and 0,25% Triton in PBS). Slices were then rinsed 3x1h in PBS and incubated for 4h at RT with donkey anti-rabbit Cy3 secondary antibodies (711-165-152; Jackson Labs; 1:400) diluted in the same blocking solution than before. Slices were rinsed in PB (2x15min), labelled with DAPI (1:2000) and incubated with PB overnight. Finally, slices were mounted with Mowiol. Slices were imaged in mosaic using a Leica SP5 confocal microscope. The distance between each focal plane was 1µm and the objective used was 40X (N.A. 1.4).

Statistics

Sampling corresponds to the number of cells for electrophysiology and ICC, quantum dots for SPT, cultures or animals for biochemistry, animals for in vivo experiments, and slices and patients for human tissue recordings. Sample size selection for experiments was based on published experiments, pilot studies, as well as in-house expertise. Means are shown ± SEM, median values are indicated with their interquartile range (IQR, 25–75%). Means were compared using Student's parametric t test when statistical conditions were verified (normal distribution and homoscedasticity). Otherwise, a non-parametric Mann-Whitney (MW) test was performed. For paired measurements, Wilcoxon test were used unless statistical conditions were verified for Student's paired t-test. Statistical tests were performed using SigmaPlot 13 (Systat Software). Differences were considered significant for p-values less than 5% (* $p \leq 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Error bars correspond to SEM.

Figures

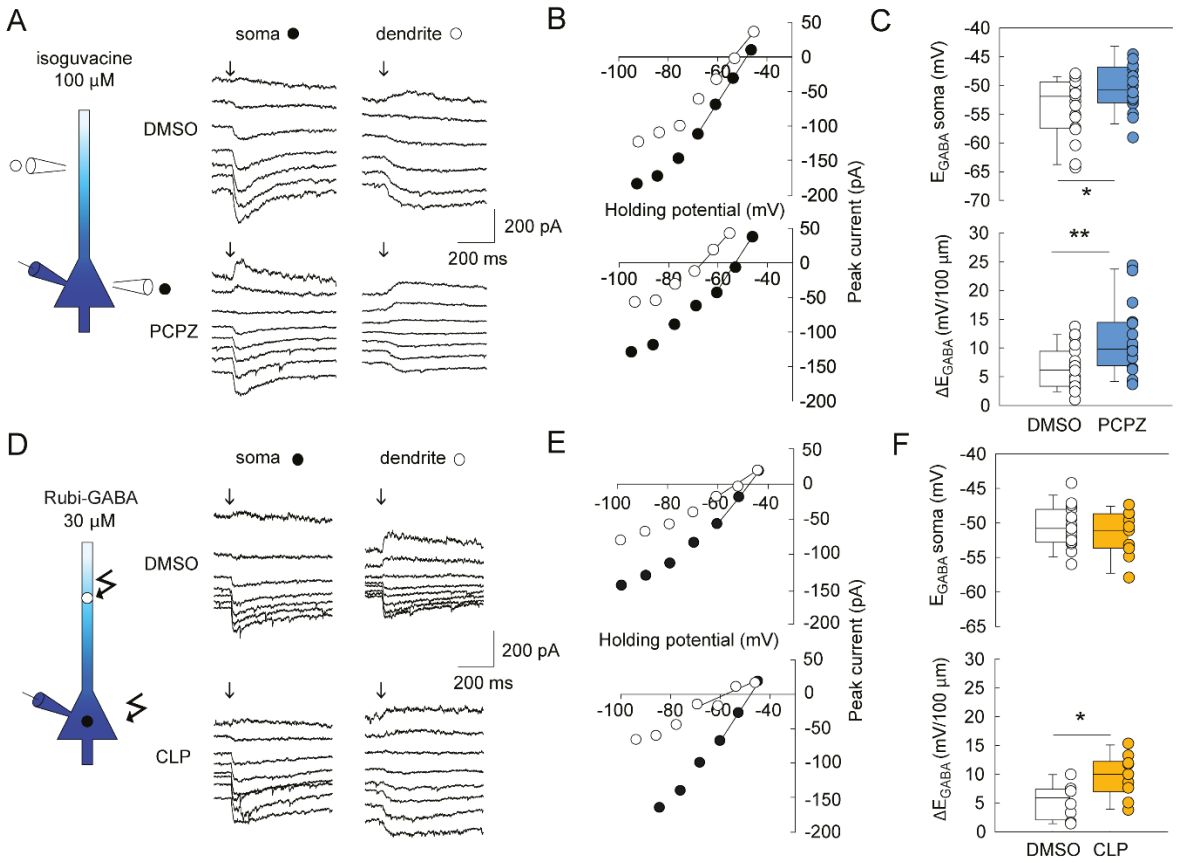


Figure 1. PCPZ and CLP257 promote chloride extrusion in hippocampal neurons.

A. Representative currents evoked at varying potentials by focal application of isoguvacine (arrow, 100 µM) onto the soma or dendrite of hippocampal neurons (DIV 21-24) previously treated for 2h with either vehicle only (DMSO, control) or PCPZ (10 µM). **B.** I-V curves corresponding to the traces shown in A. **C.** Summary graphs showing reversal potential (top, E_{GABA}) and somatodendritic E_{GABA} gradient (bottom, ΔE_{GABA}) in control and PCPZ-treated neurons (n=19 neurons and n=16 neurons respectively, from 5 independent cultures). * t-test $p<0.05$, ** t-test $p<0.01$. **D-F**, same as in A-C, with currents evoked at varying potentials by focal uncaging of Rubi-GABA (arrow, 30 µM) onto the soma or dendrite of hippocampal neurons, upon application of 100 µM CLP257 or DMSO. (n=10 and 8 neurons, respectively, from 4 independent cultures). * t-test $p<0.05$.

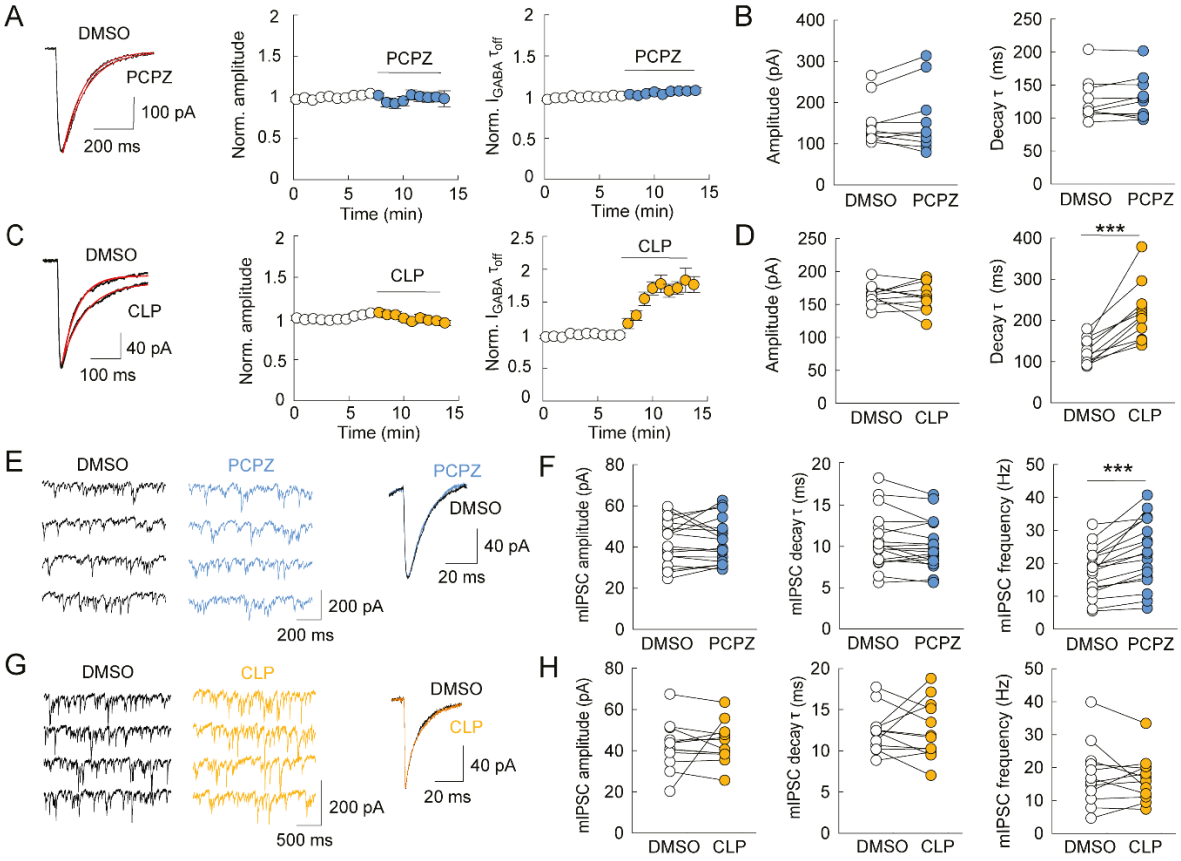


Figure 2. CLP257 but not PCPZ modulates $GABA_A$ receptor function.

A. Summary graph showing averaged normalized amplitude of currents evoked by focal somatic application of isoguvacine before and during acute application of 10 µM PCPZ. Inset, representative averaged evoked currents before and during PCPZ application. **B.** Summary graphs showing the effect of PCPZ on the peak amplitude (left) and decay time constant (τ) of isoguvacine-evoked currents (n=10 neurons each from 2 independent cultures). **C-D.** Same as in A-B for currents recorded in the presence of 100 µM CLP257 versus DMSO. Unlike PCPZ, CLP257 increased the decay time constant of Rubi GABA evoked currents, with no significant effect of their amplitude. (n=11 neurons each from 2 independent cultures. *** Wilcoxon test, p<0.001) **E.** Representative, 5 s mIPSC recording before (DMSO) and during application of PCPZ. Inset, superimposed averaged mIPSCs detected from this recording. **F.** Summary graphs showing the effect of PCPZ application on the amplitude (left), frequency (middle) and decay time constant (right) of mIPSCs (n=18 neurons each from 4 independent cultures. *** Wilcoxon test, p<0.001). **G-H.** CLP257 had no effect on mIPSC amplitude, decay time or frequency. (n=12 neurons each from 1 culture).

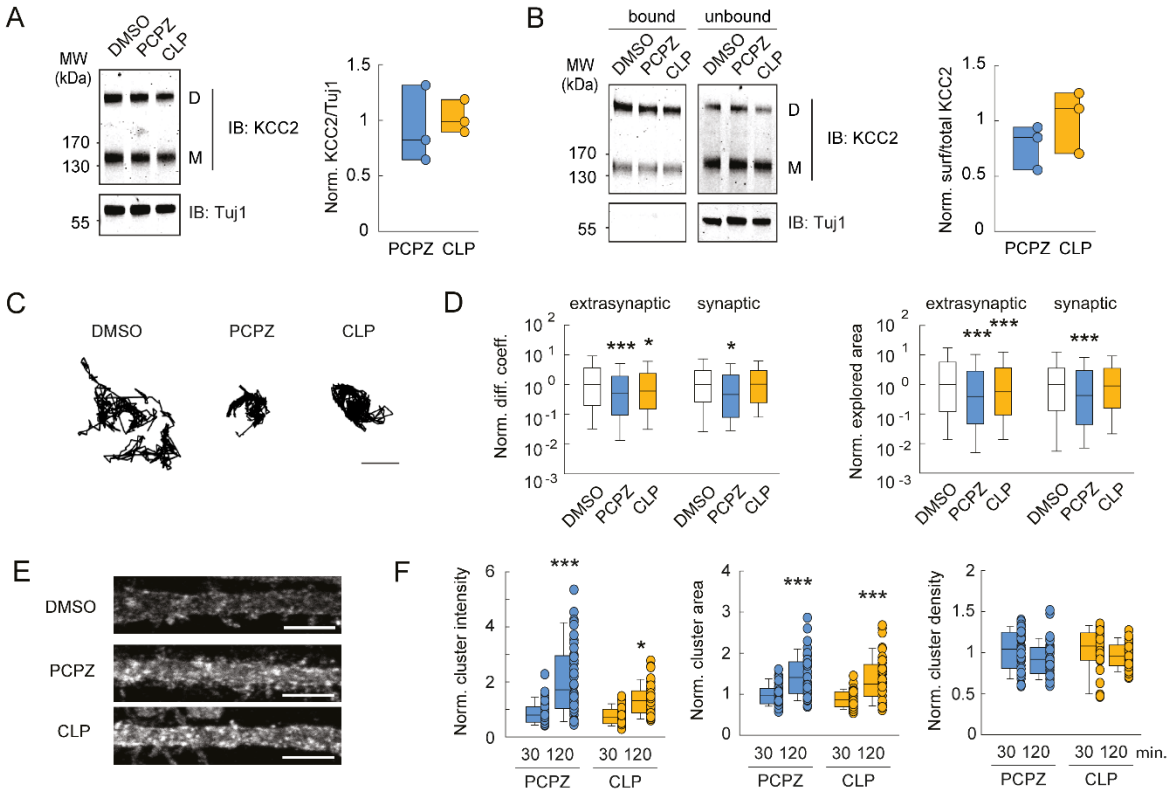


Figure 3. Both PCPZ and CLP257 reduce KCC2 membrane diffusion and promote its clustering in hippocampal neurons.

A. Representative immunoblots (left) of protein extracts from hippocampal cultures treated for 2 hours with either PCPZ (10 µM in DMSO), CLP257 (100 µM in DMSO) or DMSO alone. Right, quantification of 3 independent experiments. No significant change in total KCC2 expression was detected upon PCPZ or CLP257 treatment as compared to control (t-test p=0.14 and p=0.89, respectively). **B**. Immunoblots (left) and quantification (right) showing biotinylated surface KCC2 fraction (bound/total) was also unaffected upon PCPZ or CLP257 treatment. (n=3 independent cultures, t-test p=0.74 and 0.80, respectively). **C**. Representative recombinant KCC2 extrasynaptic trajectories, as detected using quantum dot-based single particle tracking, showing reduced lateral diffusion upon treatment with PCPZ or CLP257. Scale, 1 µm. **D**. Logarithmic distributions of median diffusion coefficients (D) and explored areas (EA) of extrasynaptic (extra) or synaptic (syn) KCC2 trajectories, in control neurons (DMSO, D extra n=614, D syn n=162 and EA extra n=1836, EA syn n=486 quantum dots) and neurons treated for 2 hours with PCPZ (D extra n=512, D syn=131 and EA extra n=1536, EA syn n=393 quantum dots) or CLP257 (D extra n=697, D syn n=179 and EA extra n=2091, EA syn n=537 quantum dots). (4 independent cultures. Mann-Whitney test * p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001). **E.** Confocal micrographs showing KCC2 immunostaining in cultured hippocampal neurons treated for 2 hours with PCPZ, CLP257 or DMSO only. Scale, 5 µm. **F.** Boxplots showing the distributions of integrated intensity, area and density of KCC2 clusters in control neurons and neurons exposed to either PCPZ or CLP257, for 30 minutes or 2 hours. Note that the effects of PCPZ and CLP257 are only apparent at 2 hours, but not after 30 minutes only. n=10 neurons per condition per culture and 4 independent cultures per condition, except for CLP257 (3 independent cultures). t-test or Mann-Whitney test * p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001.

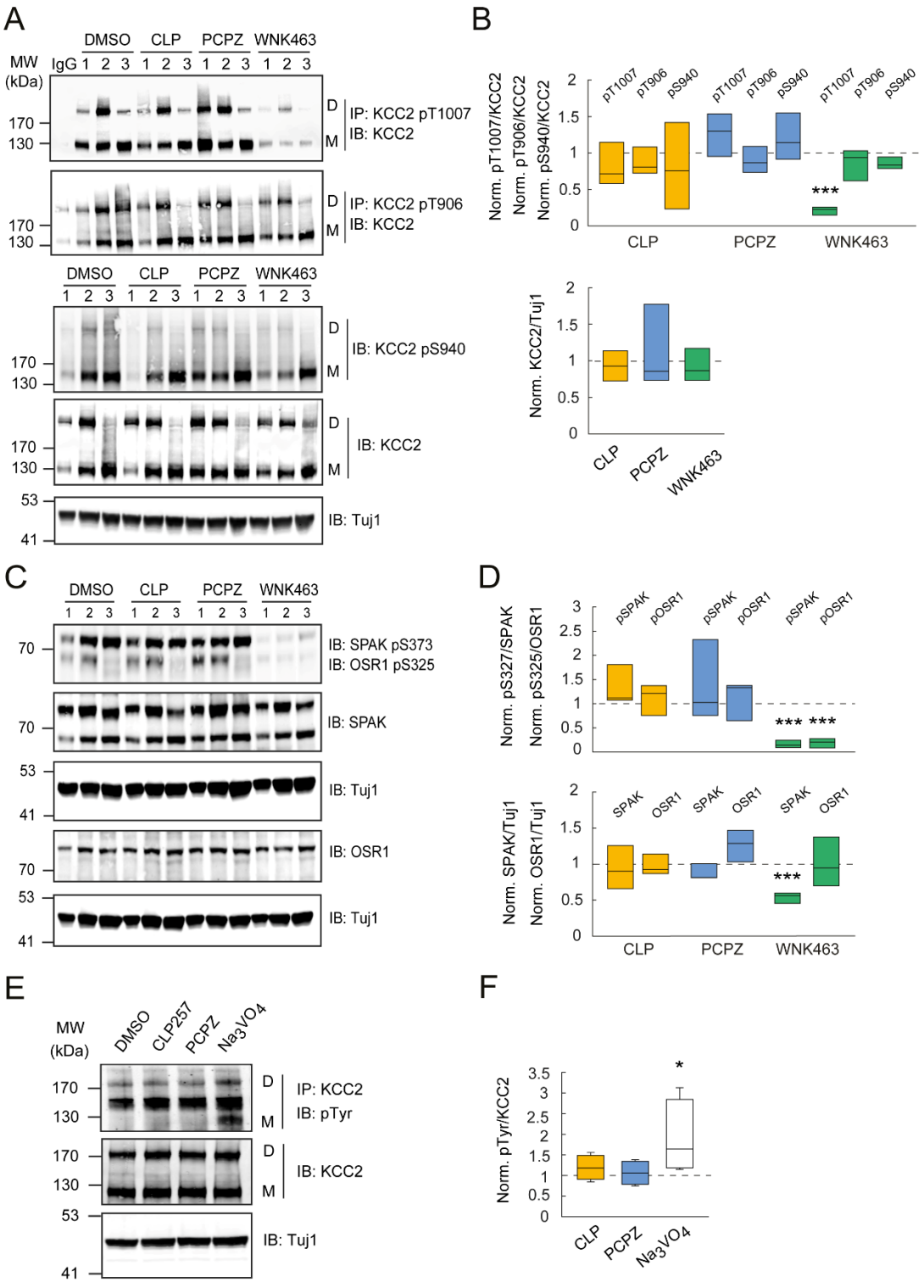


Figure 4. PCPZ and CLP257 do not affect phosphorylation of canonical KCC2 residues.

A. Immunoblots (IB) (left) of immunoprecipitated (IP) proteins or protein lysates, prepared from hippocampal-cortices slices treated for 2 hours with either DMSO, CLP257 (100 µM in DMSO), PCPZ (10 µM in DMSO), or the pan-WNK inhibitor WNK463 (10 µM in DMSO). IgG: control immunoglobulin G. (n=3 independent replicates/rats 1-3). **B.** Quantification from the 3 independent replicates in A. t-test ***p<0.001 **C.** IB (left) of protein lysates, prepared as in A. **D.** Quantification from the 3 independent replicates in B. t-test ***p<0.001. **E.** Representative IB (left) of IP proteins from hippocampal-cortices slices treated for 2 hours with either DMSO, CLP257 (100 µM in DMSO), PCPZ (10 µM in DMSO), or sodium orthovanadate (Na_3VO_4, 200 µM in H_20). **F.** Quantification from the 4 independent replicates in E. Mann-Whitney test *p<0.05.

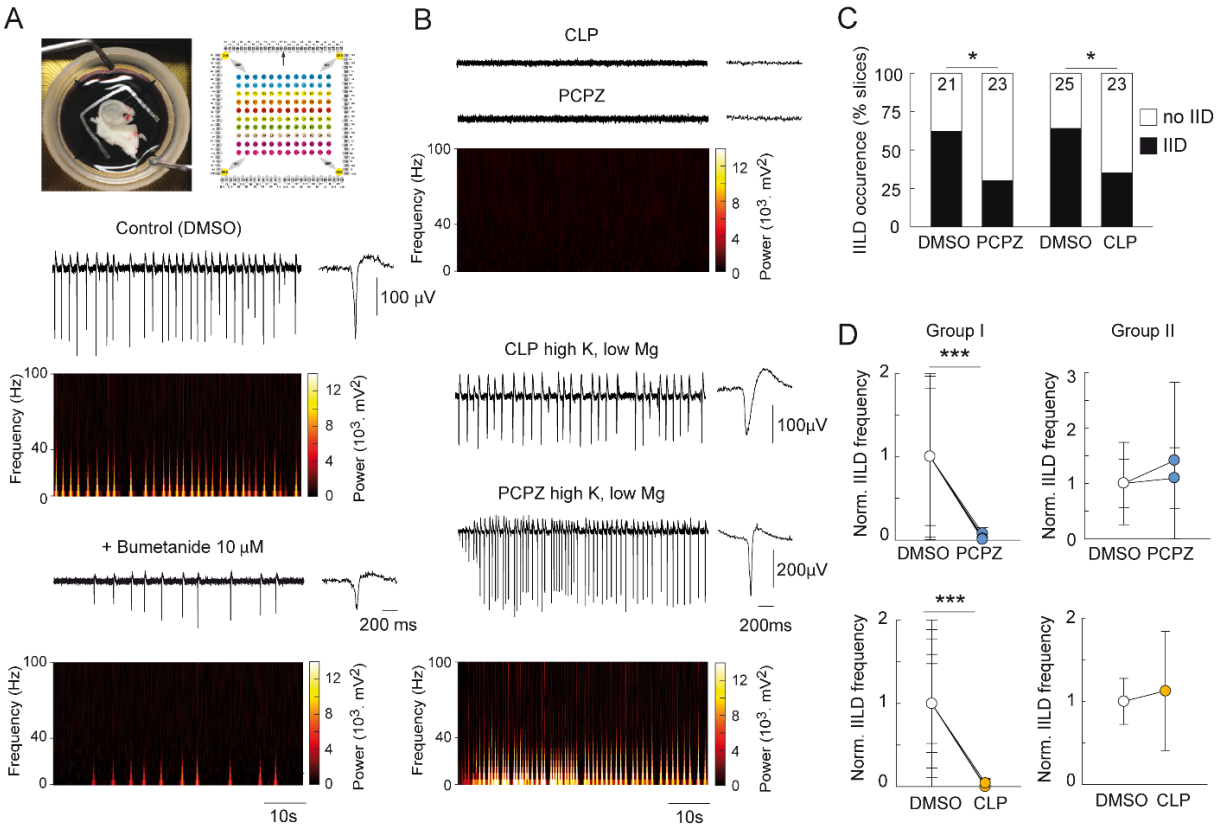


Figure 5. PCPZ and CLP257 prevent spontaneous interictal-like discharges in temporal lobe slices from mTLE patients.

A. Representative local field potential recordings and spectrograms showing low frequency spontaneous interictal-like discharges (IILDs, <40Hz) in a slice maintained in control conditions (top) and upon >10 min application of 10 µM bumetanide (bottom). Insets show individual IILDs. **B.** same as A for two slices kept for 2 hours in ACSF supplemented with either 10 µM PCPZ or 100 µM CLP257. The slices treated with PCPZ or CLP257 showed no spontaneous IILD. However, application of a pro-convulsant ACSF (6.5 mM K^+ and 0.25 Mg^{2+}) on the same slices induced high spontaneous activity, including IILDs. **C.** Summary plot showing the proportion of slices with and without IIDs. Chi^2 test, * $p<0.05$. **D.** Graphs showing the mean frequency of spontaneous IILDs (normalized to control) recorded in slices from 7 mTLE patients kept in control ACSF (DMSO) or treated with 10 µM PCPZ. Two groups were distinguished: responders (Group I, 5 patients) and non-responders (Group II, 2 patients). Similar data are shown for slices from 6 patients, kept in control ACSF or treated with 100 µM CLP257. Out of the 6 patients, only one showed no effect of CLP257 on IILD frequency. Wilcoxon signed rank test, *** $p<0.001$.

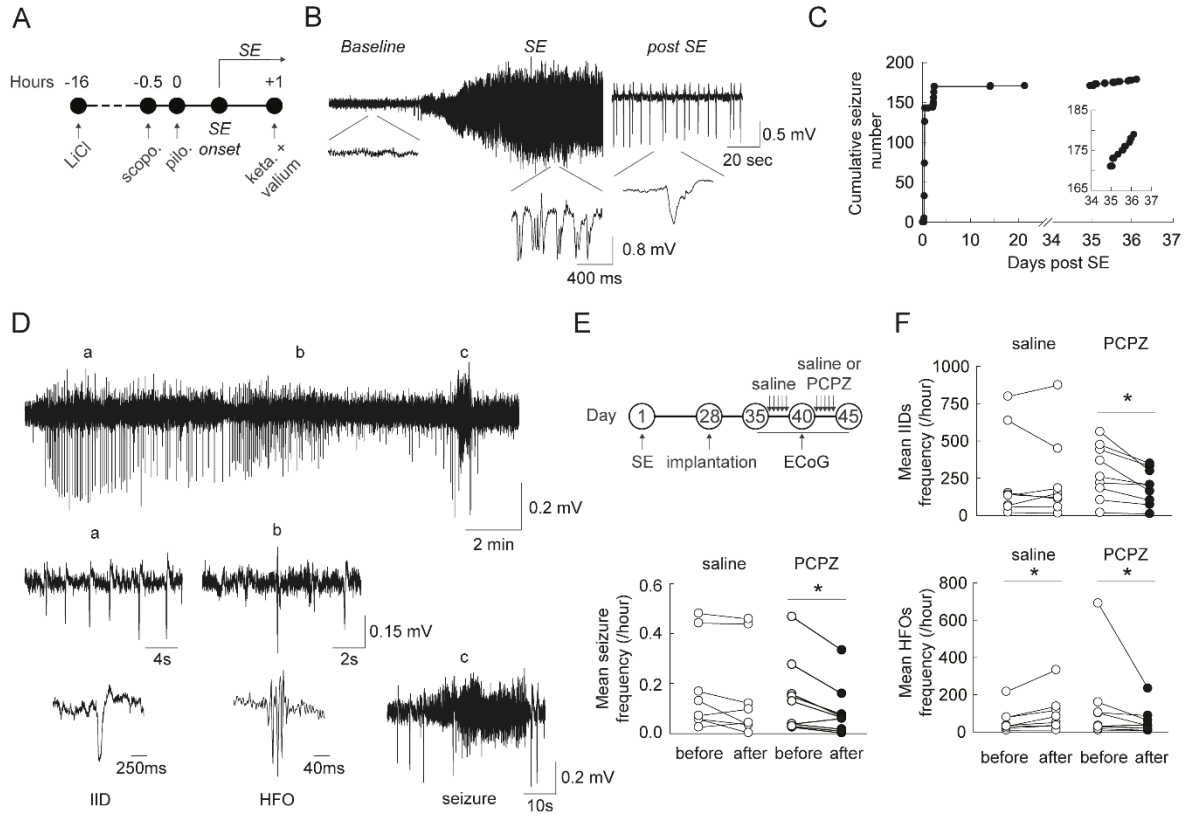
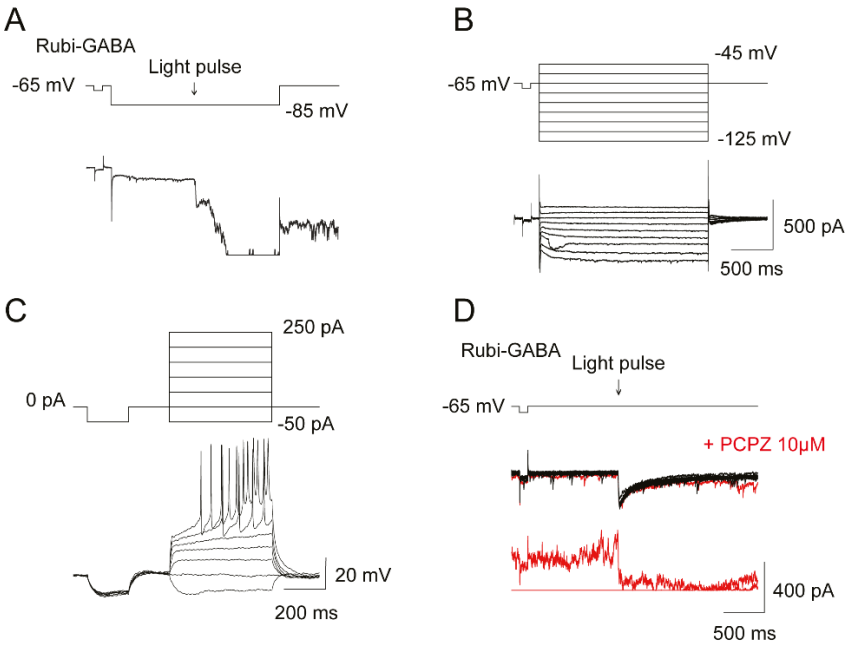


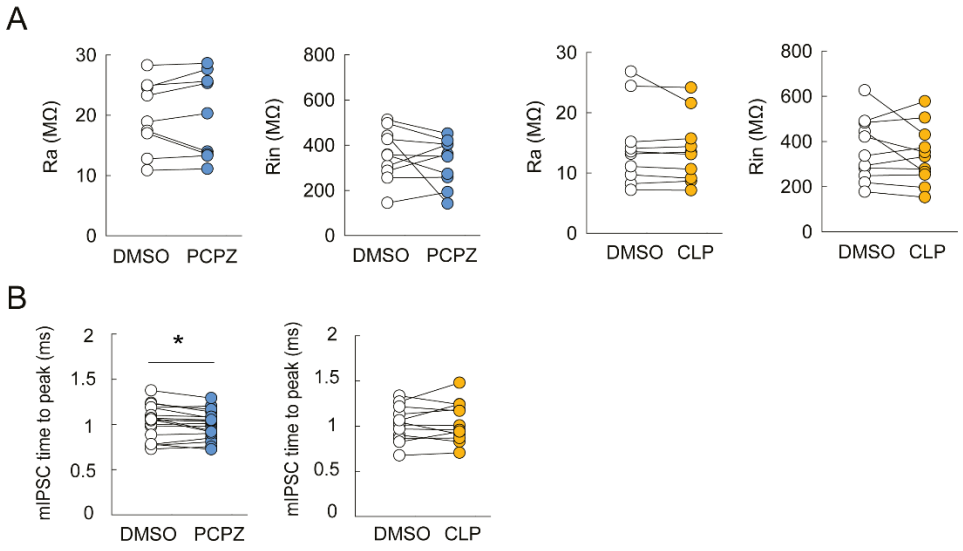
Figure 6. Chronic PCPZ administration reduces the occurrence of seizures and epileptiform activities in a mouse model of temporal lobe epilepsy.

A. Experimental epilepsy paradigm. scopo: scopolamine, pilo: pilocarpine. Status epilepticus (SE) was interrupted one hour after onset with ip injection of ketamine (keta.) and valium. **B.** Typical ECoG recordings before, during and after pilocarpine-induced SE. **C.** Graph showing the cumulative number of seizures detected in a mouse immediately after SE and up to 37 days post SE. Recording was interrupted between days 21 and 34 post SE. Note that seizures stop 2 days after SE and chronic seizures occur at a regular rate after day 34 (inset). **D.** Example of an ECoG recording showing interictal discharges (IIDs; a), high frequency oscillations (HFOs; b) and a seizure (c). **E.** top, experimental timeline for testing PCPZ injection during chronic phase. Briefly, mice received two daily saline injections between days 35-40 (before) and saline or PCPZ injections between days 41 and 45 (after). Bottom, summary graphs comparing mean seizure frequency (per hour) between days 35 to 40 (before) and days 41 and 45 (after). PCPZ injections (n=9 mice) significantly reduced the frequency of seizures (* paired t-test $p<0.05$) while saline injections (n=8) had no effect ($p=0.118$). **F.** Summary graphs comparing mean IIDs frequency and mean HFOs frequency (per hour) between days 35 to 40 (before) and days 41 and 45 (after). PCPZ injections (n=9 mice) significantly reduced the frequency of IIDs and HFOs (* paired t-test $p<0.05$) while saline injections (n=8) had no effect ($p=0.846$) or significantly increased HFOs frequency ($p<0.05$).



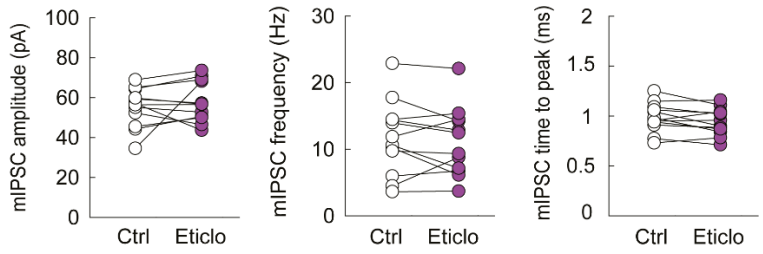
Supplementary fig 1, related to Figure 1. PCPZ is phototoxic.

A. Representative current evoked at -85mV by focal uncaging of Rubi-GABA (arrow, 30 µM) onto the soma of hippocampal neurons, upon application of 10 µM PCPZ. The signal is lost after emission of the light pulse at 405nm. **B.** Representative voltage-clamp recordings of a neuron, at varying potentials (from -125 to -45 mV), upon application of PCPZ (10 µM). The recording is stable over time in the absence of the light pulse. **C.** Representative current-clamp recordings of the same neuron as in B. A normal discharge pattern is observed after the application of PCPZ. **D**. Overlay of 34 representative traces of GABAergic currents induced by photolysis of Rubi-GABA (arrow) before (black) and after (red) PCPZ application. The addition of PCPZ is associated with signal loss, suggesting a phototoxicity of this compound in blue light (405nm).



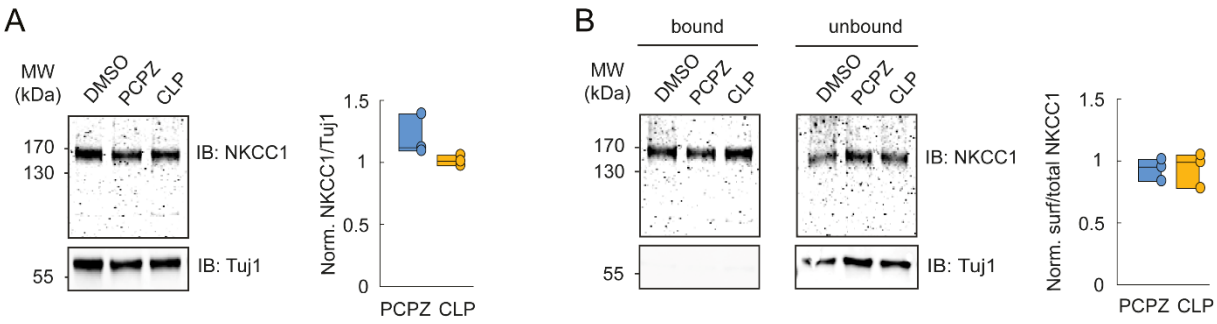
Supplementary fig2, related to Figure 2. Effect of PCPZ and CLP257 on access resistance, input resistance and mIPSC time to peak.

A. Graphs showing the effect of PCPZ or CLP application on access resistance (Ra) or membrane/input resistance (Rin) (n=10 or n=11 neurons from 2 independent cultures, respectively). **B.** Graphs showing the effect of PCPZ or CLP application on mIPSC time to peak (n=18 from 4 independent cultures or n=12 neurons from 1 culture, respectively. * Wilcoxon test, $p<0.05$).



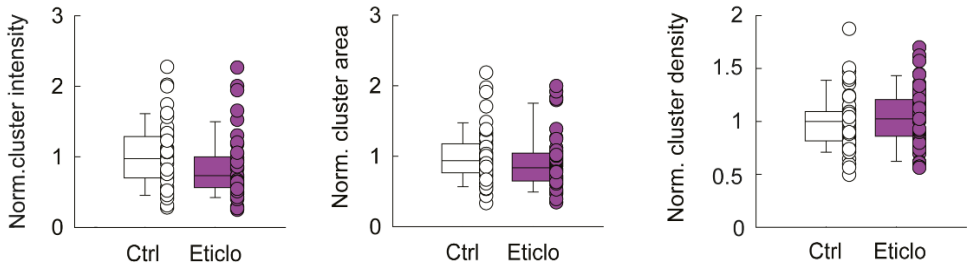
Supplementary fig3, related to Figure 2. Eticlopride has no effect on mIPSCs.

Graphs showing the effect of Eticlopride (Eticlo) on the amplitude (left), frequency (middle) and time to peak (right) of mIPSCs (n=12 neurons each from 3 independent cultures).



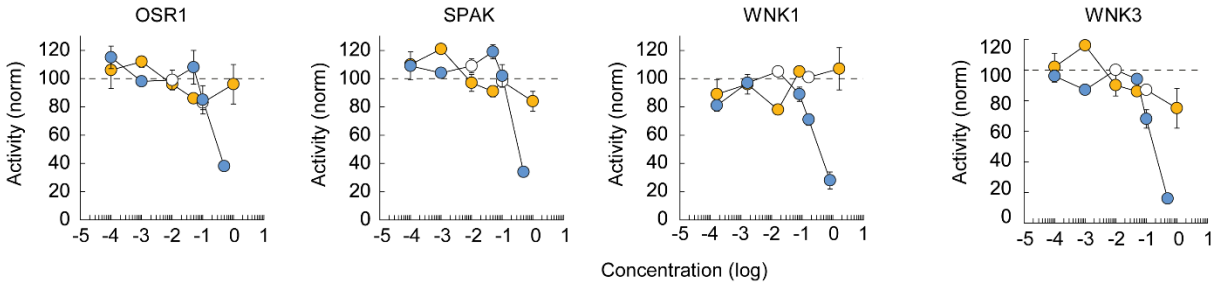
Supplementary fig4, related to Figure 3. PCPZ and CLP257 have no effect on total or membrane NKCC1 expression.

A. Representative immunoblots (left) of protein extracts from hippocampal cultures treated for 2 hours with either PCPZ (10 µM in DMSO), CLP257 (100 µM in DMSO) or DMSO alone. Right, quantification of 3 independent experiments. No significant change in total NKCC1 expression was detected upon PCPZ or CLP257 treatment as compared to control. **B**. Immunoblots (left) and quantification (right) showing biotinylated surface NKCC1 fraction (bound/total) was also unaffected upon PCPZ or CLP257 treatment. (n=3 independent cultures).



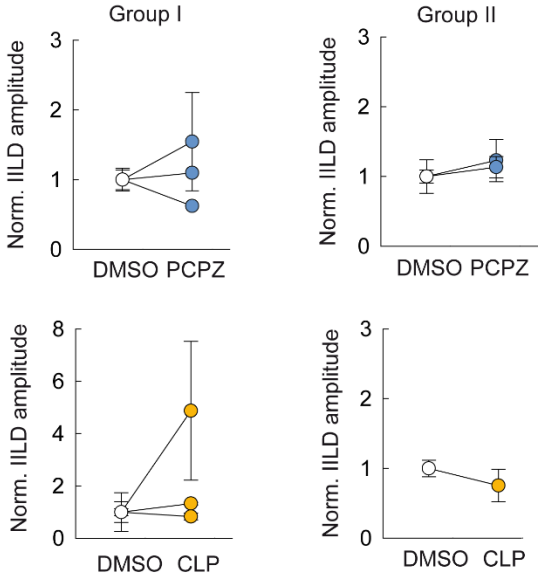
Supplementary fig5, related to Figure 3. Eticlopride has no effect on KCC2 clustering.

Boxplots showing the distributions of integrated intensity, area and density of KCC2 clusters in control neurons and neurons exposed to either H_20 (Ctrl) or Eticlopride (Eticlo) for 2 hours. n=10 neurons per condition per culture and 5 independent cultures per condition.



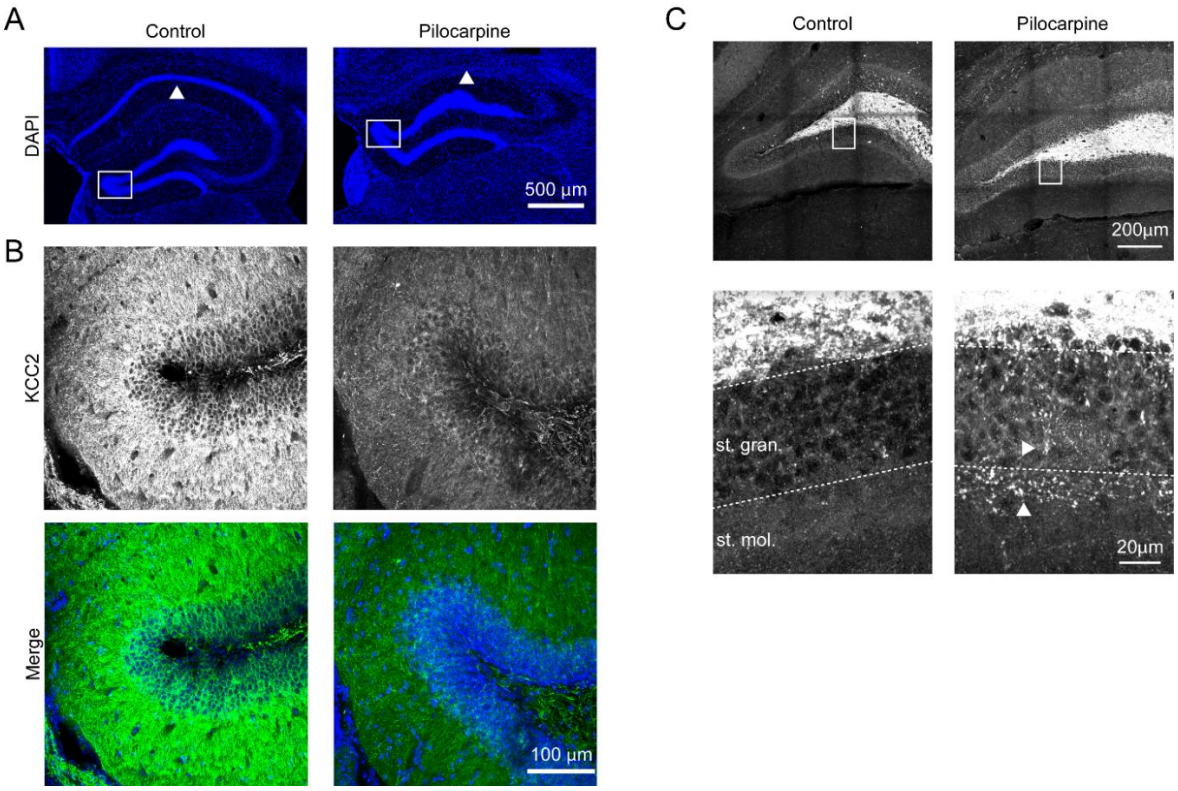
Supplementary fig6, related to Figure 4. PCPZ and CLP257 do not inhibit WNK1, WNK3, SPAK or OSR1.

Kinase activity profile of recombinant human OSR1, STK39 (SPAK), WNK1 and WNK3 in the presence of PCPZ (blue symbols) or CLP257 (orange symbols) concentrations ranging 0.1-500 or 1-1000 µM, respectively. Mean values±SD from 2 replicates were normalized to control (DMSO). Open symbols represent PCPZ and CLP257 concentration used in all other *in vitro* assays (10 and 100 µM, respectively). No significant inhibition of any kinase was observed at these concentrations.



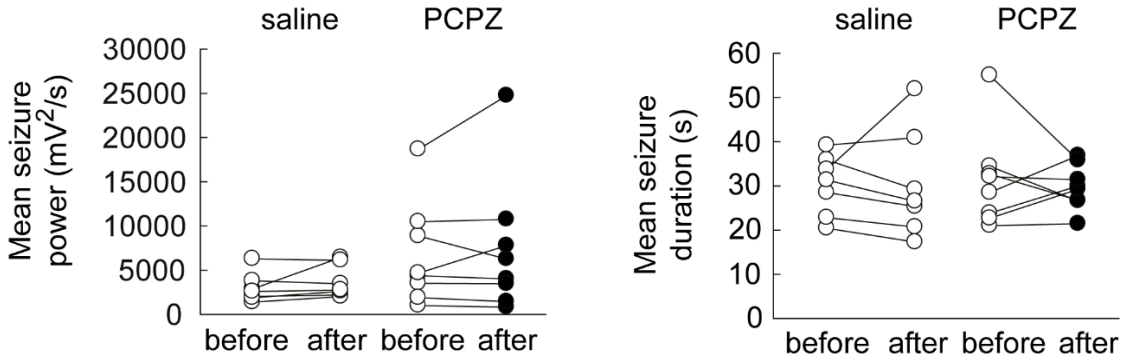
Supplementary fig7, related to Figure 5. PCPZ and CLP257 have no effect on the amplitude of remaining IILDs recorded in temporal lobe slices from mTLE patients.

Graphs showing the mean amplitude of spontaneous IILDs (normalized to control) recorded in slices from 5 mTLE patients with remaining IILDs after a treatment with 10 µM PCPZ. PCPZ had no effect on IILDs amplitude in both responders (Group I, 3 patients) and non-responders (Group II, 2 patients) from Figure 5. Similar data are shown for slices from 4 patients with remaining IILDs after a treatment with 100 µM CLP257.



Supplementary fig8, related to Figure 6. Markers of epilepsy observed in our lithium-pilocarpine mouse model of temporal lobe epilepsy.

A. Several markers of epilepsy are observed in our lithium-pilocarpine mouse model of temporal lobe epilepsy. DAPI labelling of a hippocampal slice of a control mouse vs an epileptic mouse (pilocarpine). White triangle indicates the cornus amonnus (CA) region in the control mouse, and reveal the absence and sclerosis of this region in the epileptic one. Note also the granule cell dispersion in the dentate gyrus. **B.** (Top) Magnification of the above rectangular regions and representative micrographs (maximum projection) of KCC2 labelling in the dentate gyrus of a control vs an epileptic mouse. (Bottom) Merge pictures of DAPI and KCC2 labellings. Note the significant decrease of KCC2 fluorescence intensity in the hippocampus of the epileptic mouse. **C.** (Top) Synaptoporin labelling in the dentate gyrus of a control mouse vs an epileptic mouse. (Bottom) Magnification of the above rectangular regions. Arrows highlight ectopic mossy fibers only found in the dentate gyrus of the epileptic mouse.



Supplementary fig9, related to Figure 6. Chronic administration of PCPZ has no effect on seizure power or duration.

Summary graphs comparing mean seizure power and mean seizure duration between days 35 to 40 (before) and days 41 and 45 (after). Like saline injections (n=8), PCPZ injections (n=9 mice) had no effect on seizures power (paired t-test p=0.466) or their duration (p=0.657).

References

Al Awabdh, S., Donneger, F., Goutierre, M., Séveno, M., Vigy, O., Weinzettl, P., Russeau, M., Moutkine, I., Lévi, S., Marin, P., Poncer, J.C., 2022. Gephyrin Interacts with the K-Cl Cotransporter KCC2 to Regulate Its Surface Expression and Function in Cortical Neurons. J. Neurosci. 42, 166–182.

Ankri, N., Legendre, P., Faber, D.S., Korn, H., 1994. Automatic detection of spontaneous synaptic responses in central neurons. J. Neurosci. Methods 52, 87–100.

Appl, H., Holzammer, T., Dove, S., Haen, E., Strasser, A., Seifert, R., 2012. Interactions of recombinant human histamine H_1R, H_2R, H_3R, and H_4R receptors with 34 antidepressants and antipsychotics. Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 385, 145–170.

Asraf, H., Bogdanovic, M., Gottesman, N., Sekler, I., Aizenman, E., Hershfinkel, M., 2022. SNAP23 regulates KCC2 membrane insertion and activity following mZnR/GPR39 activation in hippocampalneurons. iScience 25, 103751.

Banerjee, A., Rikhye, R.V., Breton-Provencher, V., Tang, X., Li, C., Li, K., Runyan, C.A., Fu, Z., Jaenisch, R., Sur, M., 2016. Jointly reduced inhibition and excitation underlies circuit-wide changes in cortical processing in Rett syndrome. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 113, E7287–E7296.

Barbour, A.J., Hauser, K.F., McQuiston, A.R., Knapp, P.E., 2020. HIV and opiates dysregulate K+- Cl- cotransporter 2 (KCC2) to cause GABAergic dysfunction in primary human neurons and Tat-transgenic mice. Neurobiol. Dis. 141, 104878.

Bilchak, J.N., Yeakle, K., Caron, G., Malloy, D., Côté, M.-P., 2021. Enhancing KCC2 activity decreases hyperreflexia and spasticity after chronic spinal cord injury. Exp. Neurol. 338, 113605.

Blaesse, P., Airaksinen, M.S., Rivera, C., Kaila, K., 2009. Cation-Chloride Cotransporters and Neuronal Function. Neuron 61, 820–838.

Blauwblomme, T., Dossi, E., Pellegrino, C., Goubert, E., Iglesias, B.G., Sainte-Rose, C., Rouach, N., Nabbout, R., Huberfeld, G., 2019. Gamma-aminobutyric acidergic transmission underlies interictal epileptogenicity in pediatric focal cortical dysplasia. Ann. Neurol. 85, 204–217.

Cardarelli, R.A., Jones, K., Pisella, L.I., Wobst, H.J., McWilliams, L.J., Sharpe, P.M., Burnham, M.P., Baker, D.J., Chudotvorova, I., Guyot, J., Silayeva, L., Morrow, D.H., Dekker, N., Zicha, S., Davies, P.A., Holenz, J., Duggan, M.E., Dunlop, J., Mather, R.J., Wang, Q., Medina, I., Brandon, N.J., Deeb, T.Z., Moss, S.J., 2017. The small molecule CLP257 does not modify activity of the K+–Cl− co-transporter KCC2 but does potentiate GABAA receptor activity. Nat. Med. 23, 1394–1396.

Chamma, I., Heubl, M., Chevy, Q., Renner, M., Moutkine, I., Eugène, E., Poncer, J.C., Lévi, S., 2013. Activity-dependent regulation of the K/Cl transporter KCC2 membrane diffusion, clustering, and function in hippocampal neurons. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 33, 15488–15503.

Chen, B., Li, Y., Yu, B., Zhang, Z., Brommer, B., Williams, P.R., Liu, Y., Hegarty, S.V., Zhou, S., Zhu, J., Guo, H., Lu, Y., Zhang, Y., Gu, X., He, Z., 2018. Reactivation of Dormant Relay Pathways in Injured Spinal Cord by KCC2 Manipulations. Cell 174, 521-535.e13.

Chokhawala, K., Stevens, L., 2022. Antipsychotic Medications, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).

Cilz, N.I., Lei, S., 2017. Histamine Facilitates GABAergic Transmission in the Rat Entorhinal Cortex: Roles of H1 and H2 Receptors, Na+-Permeable Cation Channels and Inward Rectifier K+ Channels. Hippocampus 27, 613–631.

Cohen, I., Navarro, V., Clemenceau, S., Baulac, M., Miles, R., 2002. On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. Science 298, 1418–1421.

Côme, E., Heubl, M., Schwartz, E.J., Poncer, J.C., Lévi, S., 2019. Reciprocal Regulation of KCC2 Trafficking and Synaptic Activity. Front. Cell. Neurosci. 13, 48.

Cordshagen, A., Busch, W., Winklhofer, M., Nothwang, H.G., Hartmann, A.-M., 2018. Phosphoregulation of the intracellular termini of K+-Cl- cotransporter 2 (KCC2) enables flexible control of its activity. J. Biol. Chem. 293, 16984–16993.

Dargaei, Z., Bang, J.Y., Mahadevan, V., Khademullah, C.S., Bedard, S., Parfitt, G.M., Kim, J.C., Woodin, M.A., 2018. Restoring GABAergic inhibition rescues memory deficits in a Huntington's disease mouse model. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 115, E1618–E1626.

de Los Heros, P., Alessi, D.R., Gourlay, R., Campbell, D.G., Deak, M., Macartney, T.J., Kahle, K.T., Zhang, J., 2014. The WNK-regulated SPAK/OSR1 kinases directly phosphorylate and inhibit the K+-Cl- co-transporters. Biochem. J. 458, 559–573.

de Tisi, J., Bell, G.S., Peacock, J.L., McEvoy, A.W., Harkness, W.F.J., Sander, J.W., Duncan, J.S., 2011. The long-term outcome of adult epilepsy surgery, patterns of seizure remission, and relapse: a cohort study. Lancet Lond. Engl. 378, 1388–1395.

Din, L., Preuss, C.V., 2022. Prochlorperazine, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).

Doi, A., Miyazaki, T., Mihara, T., Ikeda, M., Niikura, R., Andoh, T., Goto, T., 2021. CLP290 promotes the sedative effects of midazolam in neonatal rats in a KCC2-dependent manner: A laboratory study in rats. PLOS ONE 16, e0248113.

Donovan, M.D., O'Brien, F.E., Boylan, G.B., Cryan, J.F., Griffin, B.T., 2015. The effect of organic anion transporter 3 inhibitor probenecid on bumetanide levels in the brain: an integrated in vivo microdialysis study in the rat. J. Pharm. Pharmacol. 67, 501–510.

Duchowny, M., Bhatia, S., 2014. Preserving memory in temporal lobectomy—are networks the key? Nat. Rev. Neurol. 10, 245–246.

Dzhala, V.I., Staley, K.J., 2021. KCC2 Chloride Transport Contributes to the Termination of Ictal Epileptiform Activity. eNeuro 8, ENEURO.0208-20.2020.

Ferrini, F., Lorenzo, L.-E., Godin, A.G., Quang, M.L., De Koninck, Y., 2017. Enhancing KCC2 function counteracts morphine-induced hyperalgesia. Sci. Rep. 7, 3870.

Foffani, G., Uzcategui, Y.G., Gal, B., Menendez de la Prida, L., 2007. Reduced spike-timing reliability correlates with the emergence of fast ripples in the rat epileptic hippocampus. Neuron 55, 930–941.

Furyk, J.S., Meek, R.A., Egerton-Warburton, D., 2015. Drugs for the treatment of nausea and vomiting in adults in the emergency department setting. Cochrane Database Syst. Rev. 2015, CD010106.

Gagnon, M., Bergeron, M.J., Lavertu, G., Castonguay, A., Tripathy, S., Bonin, R.P., Perez-Sanchez, J., Boudreau, D., Wang, B., Dumas, L., Valade, I., Bachand, K., Jacob-Wagner, M., Tardif, C., Kianicka, I., Isenring, P., Attardo, G., Coull, J.A.M., De Koninck, Y., 2013. Chloride extrusion enhancers as novel therapeutics for neurological diseases. Nat. Med. 19, 1524–1528.

Gagnon, M., Bergeron, M.J., Perez-Sanchez, J., Plasencia-Fernández, I., Lorenzo, L.-E., Godin, A.G., Castonguay, A., Bonin, R.P., De Koninck, Y., 2017. Reply to The small molecule CLP257 does not modify activity of the K+–Cl− co-transporter KCC2 but does potentiate GABAA receptor activity. Nat. Med. 23, 1396–1398.

Gao, Y., Zhan, W., Jin, Y., Chen, X., Cai, J., Zhou, X., Huang, X., Zhao, Q., Wang, W., Sun, J., 2022. KCC2 receptor upregulation potentiates antinociceptive effect of GABAAR agonist on remifentanil-induced hyperalgesia. Mol. Pain 18, 17448069221082880.

Garbarini, N., Delpire, E., 2008. The RCC1 domain of protein associated with Myc (PAM) interacts with and regulates KCC2. Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol. 22, 31–44.

Gauvain, G., Chamma, I., Chevy, Q., Cabezas, C., Irinopoulou, T., Bodrug, N., Carnaud, M., Lévi, S., Poncer, J.C., 2011. The neuronal K-Cl cotransporter KCC2 influences postsynaptic AMPA receptor content and lateral diffusion in dendritic spines. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108, 15474–15479.

GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators, 2016. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. Lancet Lond. Engl. 388, 1545–1602.

Greenfield, L.J., 2013. Molecular mechanisms of antiseizure drug activity at GABAA receptors. Seizure 22, 589–600.

Hamidi, S., Avoli, M., 2015. KCC2 function modulates in vitro ictogenesis. Neurobiol. Dis. 79, 51–58.

He, C., Luo, F., Chen, X., Chen, F., Li, C., Ren, S., Qiao, Q., Zhang, J., de Lecea, L., Gao, D., Hu, Z., 2016. Superficial Layer-Specific Histaminergic Modulation of Medial Entorhinal Cortex Required for Spatial Learning. Cereb. Cortex 26, 1590–1608.

Heubl, M., Zhang, J., Pressey, J.C., Al Awabdh, S., Renner, M., Gomez-Castro, F., Moutkine, I., Eugène, E., Russeau, M., Kahle, K.T., Poncer, J.C., Lévi, S., 2017. GABAA receptor dependent synaptic inhibition rapidly tunes KCC2 activity via the Cl−-sensitive WNK1 kinase. Nat. Commun. 8, 1776.

Huberfeld, G., Blauwblomme, T., Miles, R., 2015. Hippocampus and epilepsy: findings from human tissues. Rev. Neurol. (Paris) 171, 236–251.

Huberfeld, G., Le Duigou, C., Le Van Quyen, M., Navarro, V., Baulac, M., Miles, R., 2013. The paradox of the paroxysm: can seizure precipitants help explain human ictogenesis? Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry 19, 523–540.

Huberfeld, G., Menendez de la Prida, L., Pallud, J., Cohen, I., Le Van Quyen, M., Adam, C., Clemenceau, S., Baulac, M., Miles, R., 2011. Glutamatergic pre-ictal discharges emerge at the transition to seizure in human epilepsy. Nat. Neurosci. 14, 627–634.

Huberfeld, G., Wittner, L., Clemenceau, S., Baulac, M., Kaila, K., Miles, R., Rivera, C., 2007. Perturbed chloride homeostasis and GABAergic signaling in human temporal lobe epilepsy. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 27, 9866–9873.

Inoue, K., Yamada, J., Ueno, S., Fukuda, A., 2006. Brain-type creatine kinase activates neuron-specific K+-Cl- co-transporter KCC2. J. Neurochem. 96, 598–608.

Ivakine, E.A., Acton, B.A., Mahadevan, V., Ormond, J., Tang, M., Pressey, J.C., Huang, M.Y., Ng, D., Delpire, E., Salter, M.W., Woodin, M.A., McInnes, R.R., 2013. Neto2 is a KCC2 interacting protein required for neuronal Cl− regulation in hippocampal neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110, 3561–3566.

Kahle, K.T., Khanna, A.R., Alper, S.L., Adragna, N.C., Lauf, P.K., Sun, D., Delpire, E., 2015. K-Cl cotransporters, cell volume homeostasis, and neurological disease. Trends Mol. Med. 21, 513–523.

Kaila, K., Price, T.J., Payne, J.A., Puskarjov, M., Voipio, J., 2014. Cation-chloride cotransporters in neuronal development, plasticity and disease. Nat. Rev. Neurosci. 15, 637–654.

Kalashnikov, V.E., Tyganov, S.A., Turtikova, O.V., Kalashnikova, E.P., Glazova, M.V., Mirzoev, T.M., Shenkman, B.S., 2021. Prochlorperazine Withdraws the Delayed Onset Tonic Activity of Unloaded Rat Soleus Muscle: A Pilot Study. Life 11, 1161.

Khirug, S., Yamada, J., Afzalov, R., Voipio, J., Khiroug, L., Kaila, K., 2008. GABAergic depolarization of the axon initial segment in cortical principal neurons is caused by the Na-K-2Cl cotransporter NKCC1. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 28, 4635–4639.

Kourdougli, N., Pellegrino, C., Renko, J.-M., Khirug, S., Chazal, G., Kukko-Lukjanov, T.-K., Lauri, S.E., Gaiarsa, J.-L., Zhou, L., Peret, A., Castrén, E., Tuominen, R.K., Crépel, V., Rivera, C., 2017. Depolarizing γ-aminobutyric acid contributes to glutamatergic network rewiring in epilepsy. Ann. Neurol. 81, 251–265.

Lau Moon Lin, M., Robinson, P.D., Flank, J., Sung, L., Dupuis, L.L., 2016. The Safety of Prochlorperazine in Children: A Systematic Review and Meta-Analysis. Drug Saf. 39, 509–516.

Lee, H.H.C., Jurd, R., Moss, S.J., 2010. Tyrosine phosphorylation regulates the membrane trafficking of the potassium chloride co-transporter KCC2. Mol. Cell. Neurosci. 45, 173–179.

Lee, H.H.C., Walker, J.A., Williams, J.R., Goodier, R.J., Payne, J.A., Moss, S.J., 2007. Direct protein kinase C-dependent phosphorylation regulates the cell surface stability and activity of the potassium chloride cotransporter KCC2. J. Biol. Chem. 282, 29777–29784.

Liabeuf, S., Stuhl-Gourmand, L., Gackière, F., Mancuso, R., Sanchez Brualla, I., Marino, P., Brocard, F., Vinay, L., 2017. Prochlorperazine Increases KCC2 Function and Reduces Spasticity after Spinal Cord Injury. J. Neurotrauma 34, 3397–3406.

Lizhnyak, P.N., Muldoon, P.P., Pilaka, P.P., Povlishock, J.T., Ottens, A.K., 2019. Traumatic Brain Injury Temporal Proteome Guides KCC2-Targeted Therapy. J. Neurotrauma 36, 3092–3102.

Lowe, A.J., David, E., Kilpatrick, C.J., Matkovic, Z., Cook, M.J., Kaye, A., O'Brien, T.J., 2004. Epilepsy surgery for pathologically proven hippocampal sclerosis provides long-term seizure control and improved quality of life. Epilepsia 45, 237–242.

Lozovaya, N., Nardou, R., Tyzio, R., Chiesa, M., Pons-Bennaceur, A., Eftekhari, S., Bui, T.-T., Billon-Grand, M., Rasero, J., Bonifazi, P., Guimond, D., Gaiarsa, J.-L., Ferrari, D.C., Ben-Ari, Y., 2019. Early alterations in a mouse model of Rett syndrome: the GABA developmental shift is abolished at birth. Sci. Rep. 9, 9276.

Magloire, V., Cornford, J., Lieb, A., Kullmann, D.M., Pavlov, I., 2019. KCC2 overexpression prevents the paradoxical seizure-promoting action of somatic inhibition. Nat. Commun. 10, 1225.

Mesraoua, B., Deleu, D., Kullmann, D.M., Shetty, A.K., Boon, P., Perucca, E., Mikati, M.A., Asadi-Pooya, A.A., 2019. Novel therapies for epilepsy in the pipeline. Epilepsy Behav. 97, 282–290.

Ngugi, A.K., Bottomley, C., Kleinschmidt, I., Sander, J.W., Newton, C.R., 2010. Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: a meta-analytic approach. Epilepsia 51, 883–890.

Otsu, Y., Donneger, F., Schwartz, E.J., Poncer, J.C., 2020. Cation–chloride cotransporters and the polarity of GABA signalling in mouse hippocampal parvalbumin interneurons. J. Physiol. 598, 1865–1880.

Pace, A.J., Madden, V.J., Henson, O.W., Koller, B.H., Henson, M.M., 2001. Ultrastructure of the inner ear of NKCC1-deficient mice. Hear. Res. 156, 17–30.

Paige, C., Plasencia-Fernandez, I., Kume, M., Papalampropoulou-Tsiridou, M., Lorenzo, L.-E., David, E.T., He, L., Mejia, G.L., Driskill, C., Ferrini, F., Feldhaus, A.L., Garcia-Martinez, L.F., Akopian, A.N., Koninck, Y.D., Dussor, G., Price, T.J., 2022. A Female-Specific Role for Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) in Rodent Pain Models. J. Neurosci. 42, 1930–1944.

Pallud, J., Le Van Quyen, M., Bielle, F., Pellegrino, C., Varlet, P., Cresto, N., Baulac, M., Duyckaerts, C., Kourdougli, N., Chazal, G., Devaux, B., Rivera, C., Miles, R., Capelle, L., Huberfeld, G., 2014. Cortical GABAergic excitation contributes to epileptic activities around human glioma. Sci. Transl. Med. 6, 244ra89.

Pressler, R.M., Boylan, G.B., Marlow, N., Blennow, M., Chiron, C., Cross, J.H., de Vries, L.S., Hallberg, B., Hellström-Westas, L., Jullien, V., Livingstone, V., Mangum, B., Murphy, B., Murray, D., Pons, G., Rennie, J., Swarte, R., Toet, M.C., Vanhatalo, S., Zohar, S., NEonatal seizure treatment with Medication Off-patent (NEMO) consortium, 2015. Bumetanide for the treatment of seizures in newborn babies with hypoxic ischaemic encephalopathy (NEMO): an open-label, dose finding, and feasibility phase 1/2 trial. Lancet Neurol. 14, 469–477.

Puskarjov, M., Kahle, K.T., Ruusuvuori, E., Kaila, K., 2014. Pharmacotherapeutic targeting of cation-chloride cotransporters in neonatal seizures. Epilepsia 55, 806–818.

Richelson, E., Nelson, A., 1984. Antagonism by neuroleptics of neurotransmitter receptors of normal human brain in vitro. Eur. J. Pharmacol. 103, 197–204.

Richelson, E., Pfenning, M., 1984. Blockade by antidepressants and related compounds of biogenic amine uptake into rat brain synaptosomes: Most antidepressants selectively block norepinephrine uptake. Eur. J. Pharmacol. 104, 277–286.

Römermann, K., Fedrowitz, M., Hampel, P., Kaczmarek, E., Töllner, K., Erker, T., Sweet, D.H., Löscher, W., 2017. Multiple blood-brain barrier transport mechanisms limit bumetanide accumulation, and therapeutic potential, in the mammalian brain. Neuropharmacology 117, 182–194.

Silvestre, J.S., Prous, J., 2005. Research on adverse drug events. I. Muscarinic M3 receptor binding affinity could predict the risk of antipsychotics to induce type 2 diabetes. Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol. 27, 289–304.

Smalley, J.L., Kontou, G., Choi, C., Ren, Q., Albrecht, D., Abiraman, K., Santos, M.A.R., Bope, C.E., Deeb, T.Z., Davies, P.A., Brandon, N.J., Moss, S.J., 2020. Isolation and Characterization of Multi-Protein Complexes Enriched in the K-Cl Co-transporter 2 From Brain Plasma Membranes. Front. Mol. Neurosci. 13, 563091.

Soul, J.S., Bergin, A.M., Stopp, C., Hayes, B., Singh, A., Fortuno, C.R., O'Reilly, D., Krishnamoorthy, K., Jensen, F.E., Rofeberg, V., Dong, M., Vinks, A.A., Wypij, D., Staley, K.J., Group, for the B.B.T., 2021. A Pilot Randomized, Controlled, Double-Blind Trial of Bumetanide to Treat Neonatal Seizures. Ann. Neurol. 89, 327–340.

Sullivan, B.J., Kipnis, P.A., Carter, B.M., Shao, L.-R., Kadam, S.D., 2021. Targeting ischemia-induced KCC2 hypofunction rescues refractory neonatal seizures and mitigates epileptogenesis in a mouse model. Sci. Signal. 14, eabg2648.

Tang, X., Drotar, J., Li, K., Clairmont, C.D., Brumm, A.S., Sullins, A.J., Wu, H., Liu, X.S., Wang, J., Gray, N.S., Sur, M., Jaenisch, R., 2019. Pharmacological enhancement of KCC2 gene expression exerts therapeutic effects on human Rett syndrome neurons and Mecp2 mutant mice. Sci. Transl. Med. 11, eaau0164.

Téllez-Zenteno, J.F., Dhar, R., Wiebe, S., 2005. Long-term seizure outcomes following epilepsy surgery: a systematic review and meta-analysis. Brain J. Neurol. 128, 1188–1198.

Töllner, K., Brandt, C., Römermann, K., Löscher, W., 2015. The organic anion transport inhibitor probenecid increases brain concentrations of the NKCC1 inhibitor bumetanide. Eur. J. Pharmacol. 746, 167–173.

Virtanen, M.A., Uvarov, P., Mavrovic, M., Poncer, J.C., Kaila, K., 2021. The Multifaceted Roles of KCC2 in Cortical Development. Trends Neurosci. 44, 378–392.

Watanabe, M., Wake, H., Moorhouse, A.J., Nabekura, J., 2009. Clustering of neuronal K+-Cl- cotransporters in lipid rafts by tyrosine phosphorylation. J. Biol. Chem. 284, 27980–27988.

Weber, M., Hartmann, A.-M., Beyer, T., Ripperger, A., Nothwang, H.G., 2014. A novel regulatory locus of phosphorylation in the C terminus of the potassium chloride cotransporter KCC2 that interferes with N-ethylmaleimide or staurosporine-mediated activation. J. Biol. Chem. 289, 18668–18679.

Wenz, M., Hartmann, A.-M., Friauf, E., Nothwang, H.G., 2009. CIP1 is an activator of the K+-Cl- cotransporter KCC2. Biochem. Biophys. Res. Commun. 381, 388–392.

Worrell, G.A., Parish, L., Cranstoun, S.D., Jonas, R., Baltuch, G., Litt, B., 2004. High-frequency oscillations and seizure generation in neocortical epilepsy. Brain 127, 1496–1506.

Yamada, K., Park, H.-M., Rigel, D.F., DiPetrillo, K., Whalen, E.J., Anisowicz, A., Beil, M., Berstler, J., Brocklehurst, C.E., Burdick, D.A., Caplan, S.L., Capparelli, M.P., Chen, G., Chen, W., Dale, B., Deng, L., Fu, F., Hamamatsu, N., Harasaki, K., Herr, T., Hoffmann, P., Hu, Q.-Y., Huang, W.-J., Idamakanti, N., Imase, H., Iwaki, Y., Jain, M., Jeyaseelan, J., Kato, M., Kaushik, V.K., Kohls, D., Kunjathoor, V., LaSala, D., Lee, J., Liu, J., Luo, Y., Ma, F., Mo, R., Mowbray, S., Mogi, M., Ossola, F., Pandey, P., Patel, S.J., Raghavan, S., Salem, B., Shanado, Y.H., Trakshel, G.M., Turner, G., Wakai, H., Wang, C., Weldon, S., Wielicki, J.B., Xie, X., Xu, L., Yagi, Y.I., Yasoshima, K., Yin, J., Yowe, D., Zhang, J.-H., Zheng, G., Monovich, L., 2016. Small-molecule WNK inhibition regulates cardiovascular and renal function. Nat. Chem. Biol. 12, 896–898.

Zijlmans, M., Jiruska, P., Zelmann, R., Leijten, F.S.S., Jefferys, J.G.R., Gotman, J., 2012. High-frequency oscillations as a new biomarker in epilepsy. Ann. Neurol. 71, 169–178.

Résultats complémentaires

Au cours de ma thèse, j'ai également réalisé des expériences et/ou analyses supplémentaires que je n'ai pas présentées dans l'article principal, mais qui sont en lien avec mon projet.

RC.I- L'effet du CLP257 et de la PCPZ sur l'agrégation de KCC2 implique-t-il les $GABA_AR$ et la voie WNK/SPAK/OSR1 ?

Comme présenté dans l'introduction, des travaux récents de l'équipe ont mis en évidence que l'activation des $GABA_AR$, et l'augmentation transitoire de $[Cl^-]_i$ qu'elle induit, inhibe la voie WNK/SPAK/OSR1, réduit les phosphorylations inhibitrices de KCC2 et augmente ainsi la stabilité membranaire, l'agrégation et la fonction du transporteur (Heubl et al., 2017). Étant donné l'effet de modulation allostérique du CLP257 sur les $GABA_AR$ extrasynaptiques (Article : Figure 2), j'ai émis et souhaité tester l'hypothèse selon laquelle les potentialisateurs de KCC2 (CLP257 et PCPZ) augmenteraient l'agrégation et la fonction du transporteur en agissant sur les $GABA_AR$ et en inhibant la voie WNK/SPAK/OSR1 sous-jacente. Pour tester cette hypothèse j'ai exploré l'effet du CLP257 et de la PCPZ sur l'agrégation de KCC2, dans des neurones hippocampiques en culture, en présence de bloquants pharmacologiques des $GABA_AR$.

J'ai tout d'abord testé l'effet du CLP257 (100 µM) et de la PCPZ (10 µM) en présence de gabazine, un antagoniste des $GABA_AR$. Le blocage des récepteurs par la gabazine (10 µM) pouvant être néfaste pour la survie cellulaire, en induisant entre autres une excitotoxicité, j'ai réalisé ces traitements en présence d'un cocktail d'antagonistes de la signalisation glutamatergique et de bloqueurs des canaux sodiques (1 µM de TTX, 1mM de kinurenate, et 500 µM de mCPG). De manière surprenante la gabazine n'avait pas d'effet significatif sur l'intensité (+1.18±6.50% p=0.75), l'aire (+3.30±5.23% p=0.42) ou la densité des agrégats de KCC2 (-0.10±3.63% p=0.92), dans ces conditions, par rapport à la condition contrôle (Figure 34). En revanche, la gabazine supprimait l'effet significatif du CLP257 sur l'intensité (+19.7±7.08% p=0.19 contre +60.20±13.0% p<0.001) et l'aire des agrégats de KCC2 (+7.1±4.02% p=0.48 contre +32.9±8.79% p=0.002) (Figure 34), tandis que la densité des agrégats restait non impactée (-5.1±3.65% p=0.353 contre -8±3.58% p=0.123) (Figure 34).

De manière surprenante, et bien que la PCPZ n'ait pas d'effet direct sur les $GABA_AR$ (Article : Figure 2), la gabazine bloquait également l'effet de la PCPZ sur l'intensité (+17.3±6.61% p=0.20 contre +61±17.6% p<0.001), l'aire (+4.1±2.77% p=0.83 contre +42.9±13.4% p=0.003) et la densité des agrégats de KCC2 (-3.9±3.33% p=0.46 contre -11.3±3.85% p=0.037) (Figure 34).

Ces résultats semblaient compatibles avec l'hypothèse selon laquelle l'effet du CLP257 et de la PCPZ sur l'agrégation de KCC2 pourrait impliquer les $GABA_AR$ et une voie de signalisation sous-jacente. Alternativement, l'effet des deux candidats potentialisateurs de KCC2 pourrait être indépendant de la signalisation GABAergique, mais être occlus lorsque cette dernière est bloquée pharmacologiquement.

Étant donné l'effet spécifique du CLP257 sur les $GABA_AR$ extrasynaptiques, j'ai ensuite testé l'hypothèse selon laquelle l'effet de ce composé sur l'agrégation de KCC2 impliquerait spécifiquement les récepteurs extrasynaptiques. Pour cela, j'ai exploré l'impact du CLP257 sur l'agrégation de KCC2 en présence de L655-708, un agoniste inverse spécifique des $GABA_AR$ contenant la sous-unité α5, et donc majoritaires au niveau extrasynaptique (Jacob, 2019).

Un traitement avec du L655-708 (100nM) seul n'avait pas d'effet significatif sur l'intensité (-11.2±6.60% p=0.08), l'aire (+2±6.2% p=0.44), ou la densité des agrégats de KCC2 (-2.3±3.53% p=0.65) (Figure 34). En revanche, j'ai observé une réduction (-46.2±8.78% p=0.005), mais pas une suppression, de l'effet du CLP257 sur l'intensité des agrégats en présence de L655-708 (+28.38±2.18% p=0.026 avec L655-708, par rapport à +60.02±6.72% p<0.001 en absence de L655-708) (Figure 34). L'effet du CLP257 sur l'aire des agrégats était en revanche complètement supprimé par l'ajout de L655-708 (+4.52±0.02% p=0.35, par rapport à +32.9±3.41% p=0.002) (Figure 34). Néanmoins, la densité des agrégats restait non affectée (-0.07±6% p=0.890, par rapport à --8±3.58% p=0.123) (Figure 34).

De manière surprenante, et alors que la PCPZ n'a pas d'effet modulateur direct sur les $GABA_AR$ extrasynaptiques, j'ai également observé une réduction (-35±13.9% p=0.032), mais pas une suppression, de l'effet de la PCPZ sur l'intensité des agrégats en présence de L655-708 (+37.2±25.1% p=0.009 avec L655-708, par rapport à +60.02±6.72% p<0.001 en absence de L655-708) (Figure 34).

L'effet de la PCPZ sur l'aire et la densité des agrégats était, cependant, complétement supprimé par l'ajout de L655-708 (+24.2±14.9% p=0.075, par rapport à +32.9±3.41% p=0.002 et -1.3±5.76% p=0.977, par rapport à -11.3±3.85% p=0.037) (Figure 34).

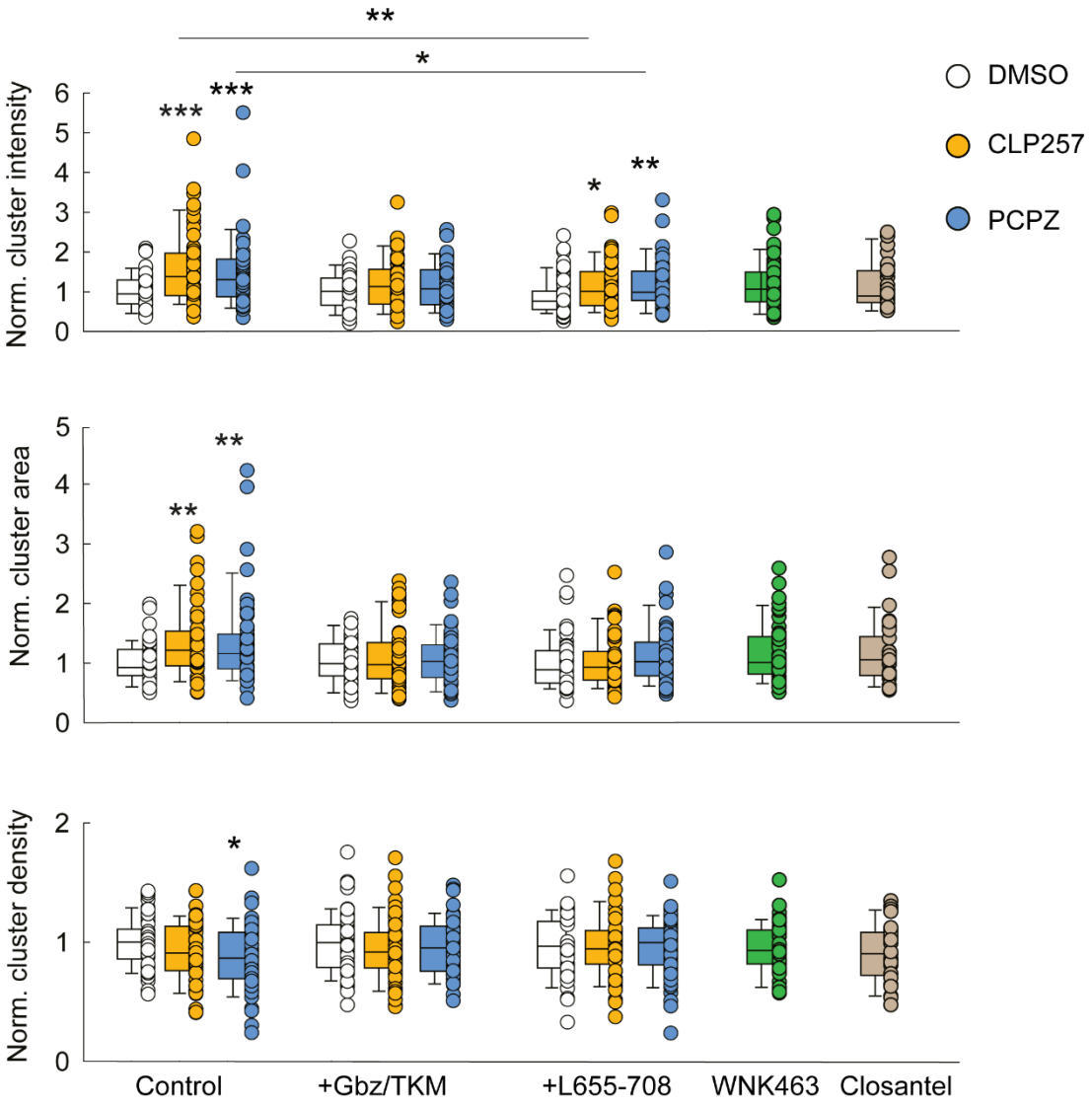


Figure 34. L'effet du CLP257 et de la PCPZ sur l'agrégation de KCC2 implique-t-il les $GABA_AR$ et la voie WNK/SPAK/OSR1 ?

Boxplots montrant les distributions de l'intensité intégrée, de l'aire, et de la densité des agrégats de KCC2, dans différentes conditions expérimentales, normalisées par rapport au contrôle (DMSO). Des neurones hippocampiques en culture ont ainsi été traités pendant 2h avec du DMSO (contrôle), du CLP257 (100 µM dans du DMSO), ou de la PCPZ (10 µM dans du DMSO). Ces traitements ont été reproduits en présence de bloqueurs de la signalisation glutamatergique et des courants sodiques (TKM: TTX 1 µM, kinurenate 1mM et MCPG 500 µM), avec ou sans Gabazine (Gbz, 10 µM), un antagoniste des récepteurs $GABA_A$, ou L655-708 (100 nM), un agoniste inverse des $GABA_AR$ extrasynaptiques. Enfin, des neurones ont été traités pendant 2h avec du WNK463 (10 µM dans du DMSO) ou du closantel (10 µM dans du DMSO). n=10 neurones par condition et par culture, 5 cultures indépendantes par condition. test t de Student ou test de Mann-Whitney * p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001.

La suppression de certains des effets du CLP257 et de la PCPZ sur KCC2 par les antagonistes GABAergiques restait donc compatible avec mon hypothèse selon laquelle ces deux composés pourraient agir sur la voie WNK/SPAK/OSR1 régulée par les $GABA_AR$. Je m'attendais donc à ce que des inhibiteurs connus de cette voie, le WNK463 (K. L. Lee et al., 2022) et le closantel (Heubl et al., 2017), augmentent l'agrégation de KCC2 de manière similaire au CLP257 et au PCPZ.

Afin de tester cette hypothèse, j'ai traité des neurones hippocampiques en culture avec du WNK463 (10 µM) ou du closantel (10 µM). Je n'ai toutefois pas observé d'effet significatif du WNK463, ni sur l'intensité (+18.9±8.7% p=0.152), ni sur l'aire (+15.8±7.04% p=0.156) ou la densité des agrégats de KCC2 (-5.6±2.94% p=0.234) (Figure 34). De même, je n'ai pas non plus observé d'effet significatif du closantel sur l'intensité (+13.2±11.1% p=0.558), l'aire (+17.4±9.89% p=0.207) ou la densité des agrégats de KCC2 (-9.4±4.29% p=0.109) (Figure 34).

Ainsi, certains de mes résultats restaient compatibles avec l'hypothèse selon laquelle l'effet du CLP257 et de la PCPZ pourrait impliquer les $GABA_AR$. Cependant, l'absence d'effet des antagonistes GABAergiques et de bloqueurs de la voie WNK/SPAK sur l'agrégation de KCC2 demeure, elle, difficile à expliquer dans le cadre de cette hypothèse. Je discute de ces résultats surprenants dans la partie discussion de ma thèse.

Face à l'ambiguïté des résultats obtenus par une approche pharmacologique, j'ai par la suite choisi une approche génétique visant à manipuler la fonction de la kinase WNK1. Pour cela, j'ai testé l'effet des potentialisateurs de KCC2 (CLP257 et PCPZ) sur l'agrégation du transporteur dans des neurones hippocampiques en culture exprimant une forme constitutivement active de la kinase WNK1 (WNK1-CA, mutant S382E de WNK1 Friedel et al., 2015b; Heubl et al., 2017). Si les potentialisateurs de KCC2 augmentaient son agrégation via une inhibition de la voie WNK/SPAK/OSR1, alors l'activité constitutive de WNK1 pourrait bloquer l'effet des potentialisateurs de KCC2.

Afin de tester cette hypothèse, j'ai transfecté des neurones hippocampiques avec des plasmides exprimant EGFP seul ou en combinaison avec WNK1-CA.

De manière surprenante, je n'observe pas d'effet de l'expression du WNK1-CA sur l'intensité (-0.6±7.41% p=0.630) ou l'aire des agrégats de KCC2 (-4.2±5.31% p=0.358), dans des neurones non traités avec les potentialisateurs (Figure 35).

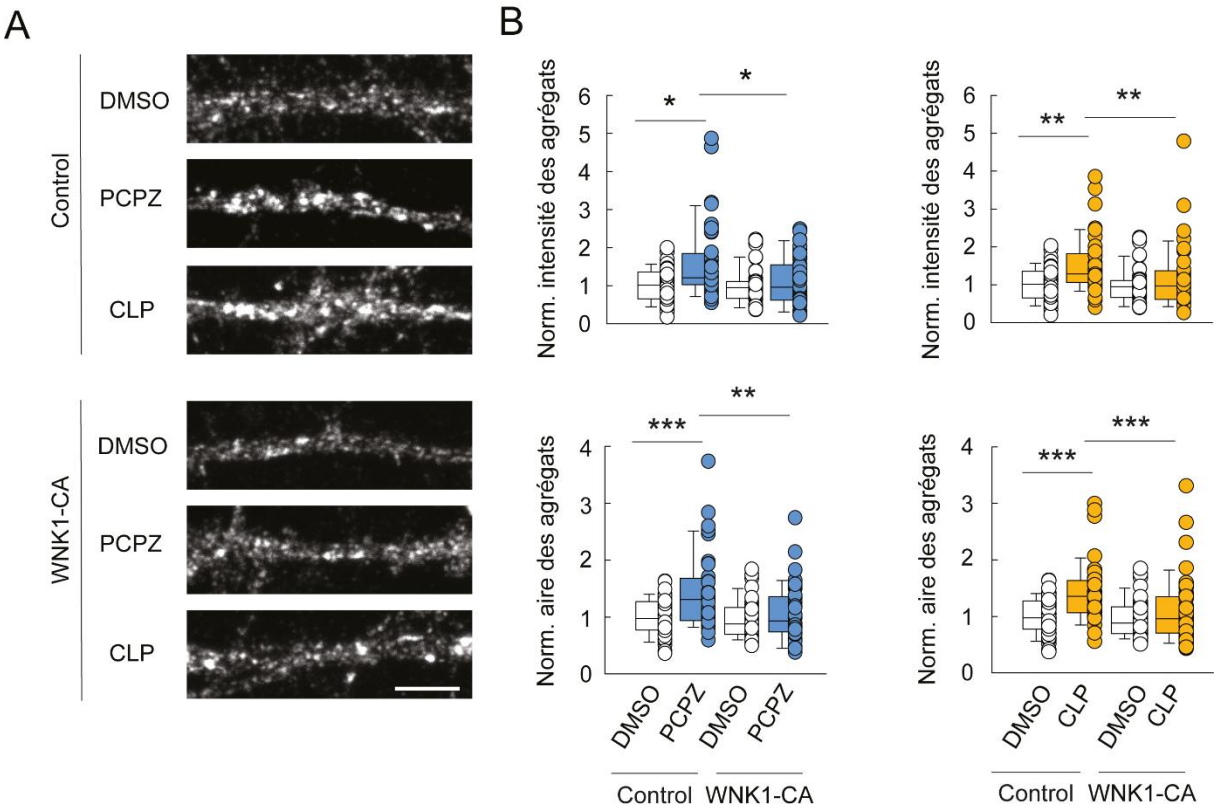


Figure 35. L'effet du CLP257 et de la PCPZ sur l'agrégation de KCC2 implique-t-il la voie WNK/SPAK/OSR1 ?

A. Micrographies confocales montrant l'immunomarquage de KCC2 dans des neurones hippocampiques en culture transfectés avec un plasmide exprimant l'EGFP seule ou en combinaison avec WNK1 constitutivement actif (WNK1-CA), et traités pendant 2 heures avec du DMSO, de la PCPZ (10 µM), ou du CLP257 (100 µM). **B**. Boxplots montrant les distributions de l'intensité intégrée et de l'aire des agrégats de KCC2, dans les conditions présentées en B. n=10 neurones par condition et par culture, 4 cultures indépendantes par condition. Test de Mann-Whitney *p<0,05. **p<0.01. ***p<0.001.

En revanche, dans des neurones exprimant WNK1-CA, un traitement de 2 h avec de la PCPZ n'augmente plus significativement l'agrégation de KCC2 (intensité normalisée des agrégats : +2.963±15.538%, p=0.863 contre +60.1±15.8% p=0.002 ; aire normalisée des agrégats : +5.117±15.272%, p=0.809 contre +44.4±10.4% p<0.001) (Figure 35). Un effet similaire est obtenu après un traitement de 2 h avec du CLP257 (intensité normalisée des agrégats : +17.5±13.9%, p=0.634 contre +50±11.7%, p<0.001 ; aire normalisée des agrégats : +15±13.65%, p=0.405 contre +41.6±8.46% p<0.001) (Figure 35).

Ces résultats sont compatibles avec l'implication de la kinase WNK1 dans l'effet du CLP257 et de la PCPZ sur l'agrégation de KCC2. Cependant, là encore, il est surprenant de n'observer aucun effet de l'activation constitutive de WNK1 sur KCC2, contrairement aux résultats précédemment rapportés (Heubl et al., 2017).

De plus, l'absence d'effet du CLP257 et de la PCPZ sur les phosphorylations activatrices de SPAK/OSR1, et sur les phosphorylations de KCC2 sous-jacentes (Article : Figure 4) suggère au contraire que ces composés agissent indépendamment de cette voie. Une explication possible de l'ensemble de ces résultats apparemment ambigus serait que la manipulation de la voie WNK/SPAK/OSR1 conduirait à une occlusion de l'effet du CLP257 et de la PCPZ, sans pour autant que ces composés agissent eux-mêmes sur cette voie.

RC.II- Variabilité dans la transition vers la phase chronique et rythmicité de l'activité épileptiforme dans le modèle lithium-pilocarpine d'ELT

Au cours de ma thèse, j'ai testé le potentiel thérapeutique de l'administration chronique de PCPZ sur l'occurrence de crises et d'activités épileptiformes, dans un modèle souris lithium-pilocarpine d'ELT.

Comme présenté dans mes résultats, la phase chronique débute en moyenne 3 à 4 semaines après l'induction d'épilepsie (Lévesque et al., 2016).

Cependant, j'ai observé au cours de ma thèse que le début de la phase chronique peut être variable parmi des souris d'une même lignée (C57Black6/J) et induites en même temps. Ainsi, même si la plupart des souris présentaient des crises 35 jours après le SE (Figure 36A), ces crises n'étaient enregistrées que plus tard chez d'autres, tandis qu'aucune crise n'était détectée chez certaines souris, même 3 mois après le SE (Figure 36B).

Au-delà d'une variabilité dans le début de la phase chronique, l'absence de crise chez certains animaux sur la période d'enregistrement peut aussi s'expliquer par le fait que la fréquence des crises n'est pas régulière. J'ai ainsi observé que les crises récurrentes et spontanées ne sont pas uniformément réparties dans le temps (Figure 36A). De plus, les profils d'occurrence des crises sont très variables d'un animal à l'autre (Figure 36A).

Les enregistrements 24h/24, à l'aide de sondes ECoG télémétriques, m'ont également permis d'observer une rythmicité dans l'occurrence des crises au cours de la journée (Figure 37A).

Cette notion d'occurrence est représentée ici par la fréquence moyennée, sur plusieurs animaux, du nombre de crises pour une heure donnée au cours de la journée.

Celle-ci correspond plus précisément à la somme des crises par animal, pour une heure donnée, et pour un nombre x de jours d'enregistrements, divisée par x. Par soucis de simplicité je parlerai ici de fréquence en crises/jour.

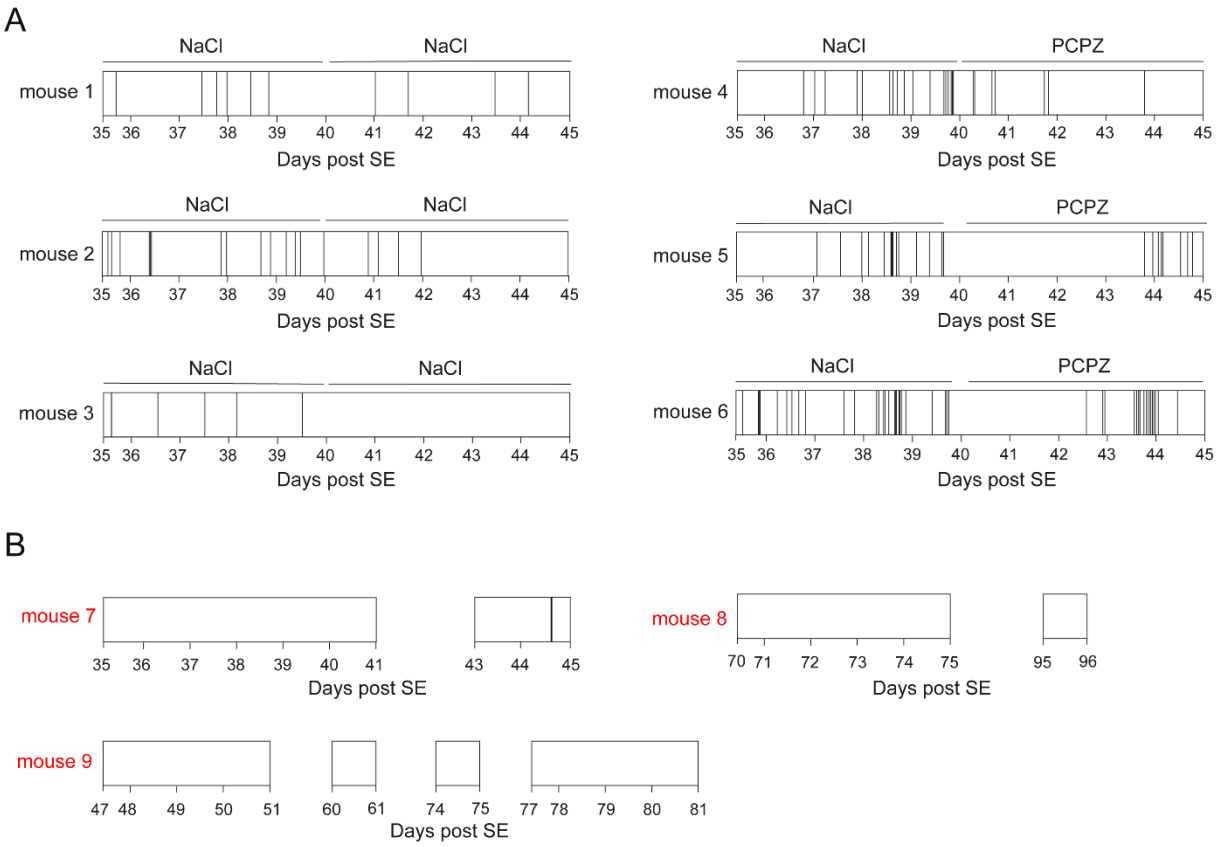


Figure 36. Variabilité interindividuelle d'occurrence des crises dans le modèle lithium-pilocarpine d'ELT.

A. Raster plots représentant le moment d'apparition des crises, sur la période d'enregistrement comprise entre le jour 35 et le jour 45 post *status epilepticus* (post SE), chez différentes souris épileptiques, injectées avec de la saline ou de la PCPZ. Des crises spontanées et récurrentes sont enregistrées chez toutes ces souris entre les jours 35 et 38. Cependant, on note une variabilité d'occurrence des crises entre différentes souris. **B**. Raster plots représentant le moment d'apparition des crises chez trois souris et sur différentes périodes d'enregistrement post SE. On note la présence d'une crise seulement à partir de J44 chez la souris 7 et l'absence de crise chez les deux autres souris, 2 voir 3 mois post SE. Étant donné ces résultats, ces trois souris n'ont pas été prises en compte dans les analyses.

Malgré la variabilité interindividuelle, les crises enregistrées chez des souris épileptiques et injectées avec de la saline entre le 35ème et le 40ème jour après l'état de mal épileptique, surviennent préférentiellement au cours de la journée, soit la période de repos de l'animal (8am-8pm), avec un pic d'occurrence vers ZT9 (Zeitgeber time).

La fréquence des crises moyennée sur plusieurs jours et sur plusieurs animaux (n=17) est ainsi significativement plus élevée sur cette période par rapport à la période nocturne, et donc la période d'activité de l'animal (8pm-8am) (0.187±0.0232 crise/jour contre 0.118±0.0189 crise/jour p=0.032) (Figure 37B). Cet effet significatif n'est plus visible entre J40-45 chez le groupe de souris (n=8) injecté avec de la saline, même si cette tendance demeure (0.166±0.0208 crise/jour contre 0.135±0.0165 crise/jour p=0.253) (Figure 37C-D).

Il est intéressant de noter qu'un pic d'occurrence de crises similaire a d'ores et déjà été observé vers ZT9 dans une étude récente effectuée sur un modèle pilocarpine d'ELT (Debski et al., 2020). Cette période de repos de l'animal comprend, entre autre, une période de sommeil. Ainsi, même si je n'ai pas évalué la phase de sommeil de mes animaux, il est possible que les crises surviennent préférentiellement pendant cette période, qui est connue pour être plus propice à l'émergence de crises chez les patients épileptiques (Bazil, 2000; Crespel et al., 1998; Gowers, 1885; Janz, 1962; St Louis, 2011).

Je me suis également intéressé à la rythmicité d'occurrence des crises dans le groupe de souris épileptiques traitées chroniquement à la PCPZ (n=9). Dans ce groupe, la fréquence des crises pendant la période d'activité de l'animal est significativement réduite par rapport à la même fréquence dans le groupe des animaux injectés avec de la saline (0.080±0,015 crise/jour contre 0.135±0.017 crise/jour p=0.020). Cet effet est également observé durant la période de repos de l'animal (0.094±0.018 crise/jour contre 0.166±0.021 crise/jour p=0.014). Cependant, il est intéressant de noter que la PCPZ ne semble pas avoir d'effet préférentiel sur une des périodes du cycle circadien, car la fréquence des crises n'est pas significativement différente entre la période d'activité et la période de repos (0.080±0.015 contre 0.094±0.018 crise/jour p=0.551).

L'ensemble de ces résultats suggèrent donc qu'il existe une rythmicité d'occurrence des crises au cours de la journée dans le modèle souris lithium-pilocarpine d'ELT, avec un pic d'occurrence vers ZT9. Cependant, la variabilité importante entre les animaux permet d'observer cette rythmicité seulement entre J35 et J40, période pour laquelle l'échantillon de souris est le plus important (n=17 contre n=8 ou n=9 entre J40 et J45).

Mes résultats mettent également en évidence un effet antiépileptique constant au cours de la journée de la PCPZ, renforçant l'idée selon laquelle ce composé présente un vrai potentiel thérapeutique.

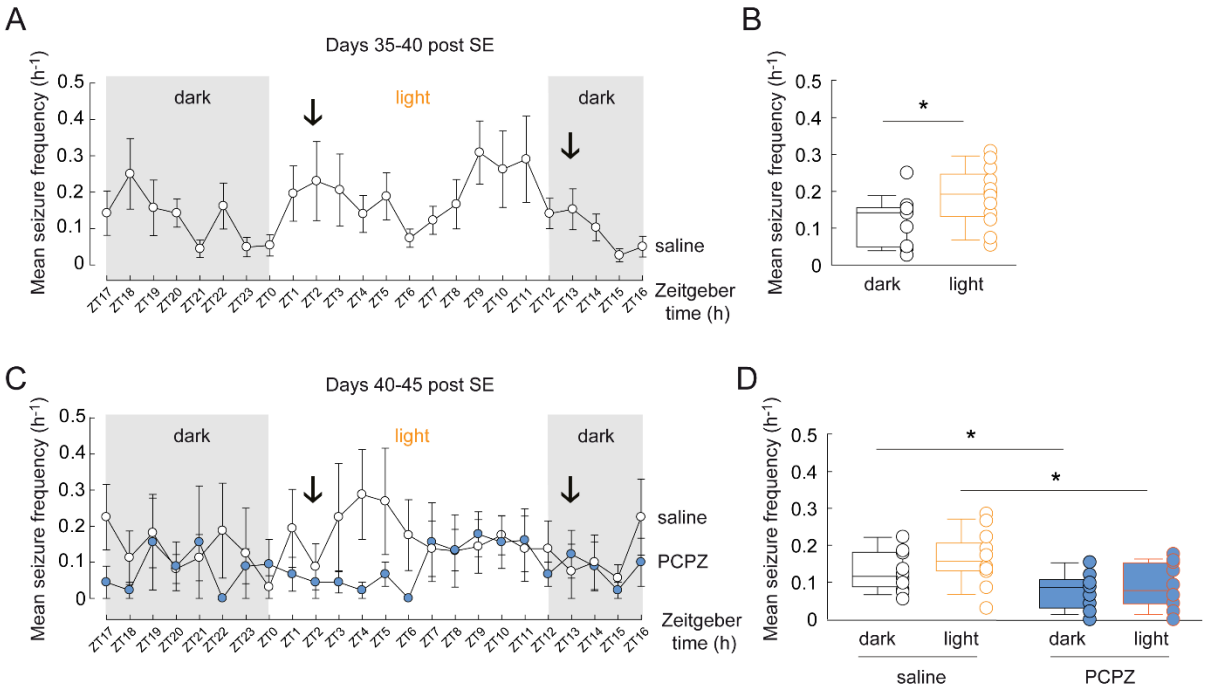


Figure 37. Rythmicité circadienne d'occurrence des crises dans un modèle souris lithium-pilocarpine d'ELT

A. Représentation, pour la période d'enregistrement de 35 à 40 jours après l'état de mal épileptique (SE), de la fréquence moyenne des crises au cours de la journée (nombre de crises par heure/nombre de jours d'enregistrement). n=17 souris. Ces animaux étaient injectés deux fois par jour (flèche noire) avec de la saline. Les périodes de lumière et obscurité sont représentées, correspondant pour les souris respectivement aux périodes de repos et d'activité. L'échelle de temps est celle de Zeitgeber. ZT0=heure à laquelle la lumière s'allume soit 8h du matin dans nos conditions. **B**. Boxplots montrant la distribution de la fréquence moyenne des crises pour les heures de la période de nuit (activité) ou de jour (repos) de l'animal. n=17 souris. test t de Student * $p<0.05$ **C**. Semblable à A, mais sur la période d'enregistrement comprise entre J40 et J45 post SE, et pour les souris injectées avec de la saline (blanc, n=8) ou de la PCPZ (2mg/kg, bleu, n=9). **D**. Boxplots montrant la distribution de la fréquence moyenne des crises pour les heures de la période de nuit (activité) ou de jour (repos) des animaux traités avec de la saline (n=8) ou de la PCPZ (n=9). test t de Student * $p<0.05$

Étant donné qu'un débat existe concernant le lien entre IIDs et crises, et HFOs et crises, je me suis ensuite intéressé à la rythmicité de ces activités et leur lien avec celle des crises. De plus, j'ai étudié la rythmicité d'occurrence de ces activités dans le groupe de souris traitées chroniquement à la PCPZ.

De la même manière que pour les crises, le profil d'occurrence des IIDs est très variable d'un animal à l'autre (Figure 38A). Entre J35 et J40, la moyenne sur plusieurs animaux (n=17) de la fréquence normalisée des IIDs par heure et par animal ((nombre d'IIDs par heure/nombre de jours d'enregistrement)/ (nombre moyen d'IIDs sur la période d'enregistrement)) ne permet pas de détecter une rythmicité d'occurrence de ces activités (Figure 38B).

Ainsi, la fréquence normalisée d'IIDs n'est pas significativement différente entre la période d'activité et la période de repos de l'animal (0.951±0.0291 contre 0.984±0.0291 p=0.429) (Figure 38C). La fréquence normalisée d'IIDs est en revanche significativement plus élevée pendant la période d'activité par rapport à la période de repos entre J40-45 (1.138±0.0318 contre 1.024±0.0337 p=0.022) (Figure 38D-E).

Ces résultats sont surprenants étant donné que les IIDs semblent survenir préférentiellement durant la période de repos de l'animal (9am-9pm), dans un modèle souris d'ELT (Baud et al., 2019). Les différences entre cette étude et mes résultats s'expliquent probablement par l'importante variabilité de rythmicité d'occurrence des IIDs observée d'une souris à l'autre dans mes conditions, ainsi que par le nombre peu élevé de souris dans le groupe NaCl entre J40 et J45 (n=8).

Un traitement chronique avec de la PCPZ réduit significativement la fréquence normalisée d'IIDs pendant la période d'activité (0.681±0.032 contre 1.138±0.032 p<0.001) et durant la période de repos (0.636±0.034 contre 1.024±0.034 p<0.001) (Figure 38D-E).

Cependant, la fréquence normalisée d'IIDs chez les animaux traités avec la PCPZ n'est pas significativement différente entre la période d'activité et la période de repos (0.681±0.0323 contre 0.636±0.0335 p=0.344) (Figure 38D-E).

A nouveau, ces résultats mettent en évidence un effet antiépileptique constant de la PCPZ, ce qui est intéressant si l'on souhaite réduire l'occurrence d'activités épileptiformes sur l'ensemble de la journée.

Concernant les HFOs, la fréquence normalisée par animal ((nombre de HFOs par heure/nombre de jours d'enregistrement) / (nombre moyen de HFOs sur la période d'enregistrement)), entre J35 et J40, est significativement plus élevée durant la période d'activité de l'animal (8pm-8am), par rapport à la période de repos (1.102±0.057 contre 0.732±0.088 p=0.002) (Figure 39A-B). Cet effet est également observé entre J40-45 (2.010±0.116 contre 1.045±0.113 p<0.001) (Figure 39C-D).

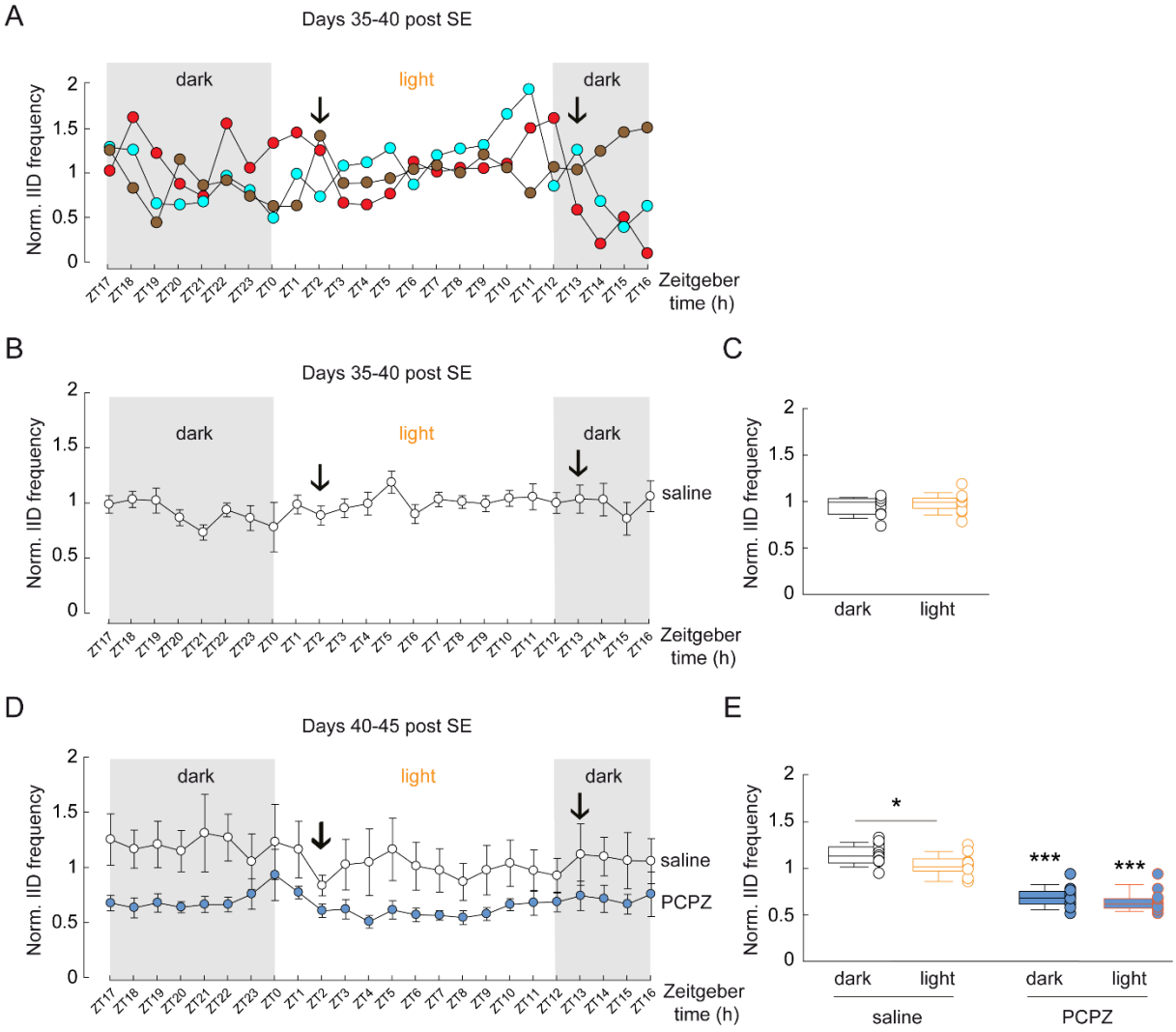


Figure 38. Rythmicité circadienne d'occurrence des IIDs dans un modèle souris lithium-pilocarpine d'ELT.

A. Représentation, pour la période d'enregistrement de 35 à 40 jours après l'état de mal épileptique (SE), de la fréquence normalisée de décharge intericales (IIDs) ((nombre d'IIDs par heure/nombre de jours d'enregistrement)/(nombre moyen d'IIDs sur la période d'enregistrement)), pour 3 souris injectées deux fois par jour (flèche noire) avec de la saline. Les périodes de lumière et obscurité sont représentées, correspondant pour les souris respectivement aux périodes de repos et d'activité. L'échelle de temps est celle de Zeitgeber. ZT0=heure à laquelle la lumière s'allume soit 8h du matin dans nos conditions. **B**. Représentation, pour la même période qu'en A, de la fréquence normalisée d'IIDs et moyennée pour l'ensemble des souris injectées avec de la saline (n=17). **C**. Boxplots montrant la distribution de la fréquence normalisée moyenne des IIDs pour les heures de la période de nuit (activité) ou de jour (repos). **D**. Semblable à B, mais sur la période d'enregistrement comprise entre J40 et J45 post SE, et pour les souris injectées avec de la saline (blanc, n=8) ou avec la PCPZ (2mg/kg, bleu, n=9). **E**. Boxplots montrant la distribution de la fréquence normalisée moyenne des IIDs pour les heures de la période de nuit (activité) ou de jour (repos) des animaux traités avec de la saline (n=8), ou avec la PCPZ (n=9). test t de Student * $p<0.05$, *** $p<0.001$.

La PCPZ réduit significativement la fréquence normalisée des HFOs durant la période d'activité (0.707±0.040 contre 2.010±0.116 p<0.001) et la période de repos des animaux épileptiques (0.467±0.064 contre 1.045±0.113 p<0.001) (Figure 39C-D).

De manière intéressante, la rythmicité d'occurrence des HFOs est toujours décelable avec le traitement à la PCPZ. La fréquence des HFOs est ainsi plus importante durant la période d'activité que pendant la période de repos chez les animaux traités à la PCPZ (0.707±0.040 contre 0.467±0.064 p=0.001) (Figure 39C-D).

Ces résultats suggèrent que la rythmicité d'occurrence des HFOs ne serait pas liée à celle des crises car les HFOs surviennent préférentiellement pendant la période de repos. Cette rythmicité est encore présente lors d'un traitement chronique à la PCPZ, ce qui renforce l'idée selon laquelle la PCPZ réduit l'émergence d'activités épileptiformes sur l'ensemble de la journée, sans préférence pour une phase du rythme circadien.

En résumé, ces données mettent en évidence une rythmicité circadienne d'occurrence des IIDs et des HFOs dans le modèle lithium-pilocarpine d'épilepsie. De plus, il semblerait que la rythmicité des IIDs et des HFOs ne soit pas similaire à celle observée pour les crises. En effet, les crises paraissent survenir davantage pendant la période de repos de l'animal, tandis que les IIDs, et surtout les HFOs, semblent survenir pendant la période d'activité de l'animal. Cela suggère que, contrairement à ce qui a été obtenu dans la littérature (Karoly et al. 2016 ; Spencer et al. 2016), la probabilité d'occurrence de crise n'est pas forcément liée à celle des IIDs et des HFOs, bien que ces dernières soit des marqueurs connus de l'épilepsie. Enfin, un traitement chronique avec de la PCPZ, bien que réduisant la fréquence des crises, des IIDs, et des HFOs, ne semble pas modifier la rythmicité d'occurrence des événements épileptiformes, ce qui suggère que la PCPZ réduit la fréquence des crises en ciblant des mécanismes dont la régulation est indépendante des rythmes circadiens. Je discute plus en détail de l'ensemble de ces résultats dans la partie discussion du manuscrit.

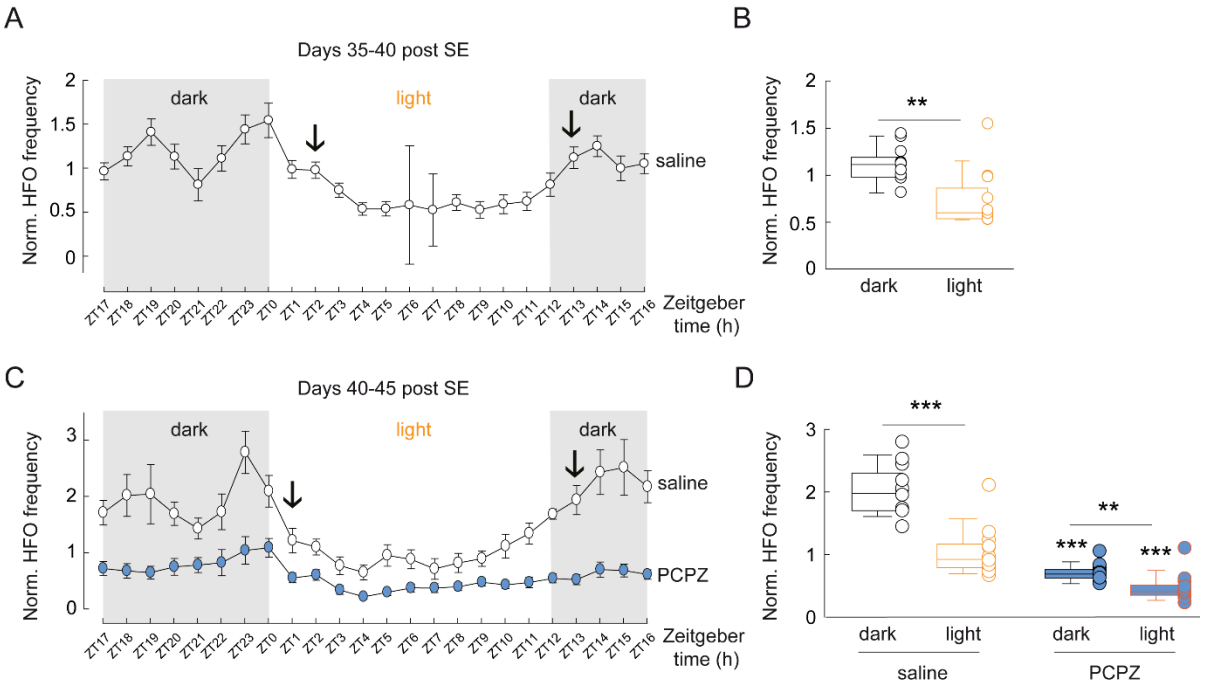


Figure 39. Rythmicité circadienne d'occurrence des HFOs dans un modèle souris lithium-pilocarpine d'ELT.

A. Représentation, pour la période d'enregistrement de 35 à 40 jours après l'état de mal épileptique (SE), de la fréquence normalisée d'oscillations à haute fréquence (HFOs) ((nombre de HFOs par heure/nombre de jours d'enregistrement)/(nombre moyen de HFOs sur la période d'enregistrement)) moyennée pour l'ensemble des souris injectées deux fois par jour (flèche noire) avec de la saline (n=17). Les périodes de lumière et obscurité sont représentées, correspondant pour les souris respectivement aux périodes de repos et d'activité. L'échelle de temps est celle de Zeitgeber. ZT0=heure à laquelle la lumière s'allume, soit 8h du matin dans nos conditions. **B**. Boxplots montrant la distribution de la fréquence normalisée moyennée des HFOs pour les heures de la période de nuit (activité) ou de jour (repos). **C**. Semblable à B, mais pour la période d'enregistrement de 35 à 40 jours post SE, et pour les souris injectées avec de la saline (blanc, n=8) ou avec la PCPZ (2mg/kg, bleu, n=9). **D**. Boxplots montrant la distribution de la fréquence normalisée moyenne des HFOs pour les heures de la période de nuit (activité) ou de jour (repos) des animaux traités avec de la saline (n=8) ou avec la PCPZ (n=9). test t de Student * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

Discussion

Au cours de ma thèse, j'ai exploré les mécanismes régulant l'expression et la fonction du transporteur K^+/Cl^- de type 2 (KCC2) dans le cerveau. En particulier, j'ai évalué pour la première fois le potentiel thérapeutique de composés susceptibles d'augmenter la fonction du transporteur dans le contexte de l'épilepsie du lobe temporal (ELT).

Je me suis tout d'abord intéressé, d'un point de vue général, à l'expression, à la fonction, et aux mécanismes de régulation de KCC2 dans le SNC. J'ai ainsi observé, chez la souris adulte, que KCC2 n'est pas exclusivement exprimé dans les cellules principales de l'hippocampe, mais qu'il est également présent dans les interneurones à parvalbumine (Otsu et al., 2020). Dans ce sens, j'ai mis en évidence que KCC2 régule l'homéostasie neuronale des ions Cl^- de manière similaire entre ces deux types cellulaires (Otsu et al., 2020). En plus de ce rôle central lié à sa fonction de transport des ions Cl^-, KCC2 présente de nombreuses fonctions non canoniques, qui impliquent son interaction avec différents partenaires moléculaires (voir I.2.4). Au cours de ma thèse, j'ai révélé de nouveaux interacteurs de KCC2, tels que les canaux potassiques de fuite Task-3 (Goutierre et al., 2019a), et la géphyrine - une molécule d'ancrage des $GABA_AR$ (Al Awabdh et al., 2022). J'ai également exploré l'impact fonctionnel de l'interaction de KCC2 avec ces partenaires, et mis en évidence que ces interactions stabilisent KCC2 à la membrane (Al Awabdh et al., 2022; Goutierre et al., 2019a), et sa fonction dans le cas de la géphyrine (Al Awabdh et al., 2022). Enfin, elles mettent en évidence un nouveau rôle de KCC2 dans la régulation de l'excitabilité membranaire (Goutierre et al 2019).

Étant donné le rôle central de KCC2 dans le maintien de l'homéostasie neuronale des ions Cl^- et dans la polarité de la transmission GABAergique, ainsi que ses nombreuses fonctions non canoniques, une réduction de son expression ou de sa fonction a été suggérée comme pouvant contribuer à l'émergence d'activités pathologiques et de crises (voir II.3.1). Compenser la dérégulation de la fonction des CCCs dans la pathologie apparaît donc comme une stratégie thérapeutique prometteuse. Dans ce sens, j'ai caractérisé et testé pour la première fois le potentiel thérapeutique de deux candidats potentialisateurs de KCC2, le CLP257 et la prochlorperazine (PCPZ) dans le cadre de l'ELT.

J'ai tout d'abord identifié, dans des neurones hippocampiques *in vitro*, l'effet et le mode d'action de ces composés. J'ai confirmé, par le biais d'expériences d'électrophysiologie, et en accord avec les résultats précédents obtenus dans des lignées de cellules hétérologues ou dans divers modèles de pathologies (Ferrini et al., 2017; Gagnon et al., 2013a), que ces composés augmentent bel et bien la fonction de KCC2. J'ai également observé que le CLP257 agit comme modulateur allostérique des $GABA_AR$ extrasynaptiques, confirmant en partie l'observation de Cardarelli et al., 2017. A l'aide d'expériences de suivi de particule unique, j'ai mis en évidence que ces potentialisateurs réduisent la diffusion latérale de KCC2 à la membrane plasmique. Cet effet s'accompagne d'une augmentation de l'agrégation du transporteur. De façon surprenante, ce mécanisme n'implique pas de changement de l'expression totale ou membranaire de KCC2, ni de modification du niveau de phosphorylation des résidus canoniques du transporteur. Ces résultats suggèrent que le CLP257 et la PCPZ modulent la fonction du transporteur via d'autres voies de régulation que celles fréquemment impliquées telle que la voie WNK/SPAK.

J'ai ensuite testé l'effet de ces composés dans le contexte de l'épilepsie. Les deux composés suppriment les activités de type interictal enregistrées *in vitro* sur du tissu humain épileptique réséqué de patients pharmacorésistants atteints d'ELT. De plus, l'administration chronique de PCPZ réduit l'occurrence de crises et d'activités épileptiformes telles que des décharges interictales et des oscillations à haute fréquence, dans un modèle souris lithium-pilocarpine d'épilepsie du lobe temporal. Ces résultats démontrent donc pour la première fois le potentiel thérapeutique de composés potentialisateurs de KCC2 dans les épilepsies pharmacorésistantes.

Enfin, par le biais de collaborations avec les équipes de Vincent Navarro et Stéphanie Baulac à l'Institut du Cerveau (Paris), j'ai mis à profit les enregistrements *in vitro* de tissu cérébral humain postopératoire afin d'explorer les déterminants cellulaires d'autres formes d'épilepsie pharmacorésistante. J'ai ainsi exploré la corrélation entre les activités pathologiques enregistrées *in vivo* chez les patients, celles enregistrées *in vitro* par matrices d'électrodes, et les altérations cellulaires sous-jacentes. J'ai ainsi observé une corrélation entre la densité de neurones dysmorphiques et la présence d'activités interictales dans le tissu de patients atteints de lipofuscinose neuronale focale (Frazzini et al., 2022) et de dysplasie corticale focale de type II (Ribierre et al, en révision).

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ma thèse, et plus particulièrement dans mon article principal, soulèvent plusieurs questions importantes que je souhaite à présent discuter : I) Quelles sont les voies impliquées dans les effets du CLP257 et de la PCPZ sur KCC2 ? II) Quelles sont les limites à l'utilisation de composés ciblant des partenaires de KCC2 par rapport à l'utilisation de potentialisateurs directs de sa fonction ? III) Comment développer de nouveaux composés ciblant spécifiquement KCC2 ? IV) Comment prendre en compte l'influence des rythmes biologiques sur l'occurrence des crises ou d'activités épileptiformes dans l'approche thérapeutique ?

I- Mécanismes de potentialisation de KCC2

I.1 Potentialisation de KCC2 par le CLP257

I.1.1 Hypothèse 1 : implication des $GABA_AR$.

J'ai montré au cours de ma thèse que le CLP257 potentialise la fonction de KCC2 et qu'il agit également comme modulateur allostérique des récepteurs $GABA_AR$ extrasynaptiques. Étant donné que les flux de Cl^-, via les $GABA_AR$, régulent l'expression membranaire et la fonction de KCC2 en impliquant la voie WNK/SPAK et les pT906 et T1007 (Heubl et al., 2017), on pourrait penser que l'effet du CLP257 sur KCC2 implique également cette voie.

Comme présenté dans les résultats complémentaires (voir RC.1), j'ai dans un premier temps testé l'hypothèse selon laquelle l'effet du CLP257 sur l'agrégation de KCC2 impliquerait les $GABA_AR$. Pour cela, j'ai testé l'effet du CLP257, dans des neurones hippocampiques en culture, en présence ou non de bloqueurs pharmacologiques spécifiques des récepteurs synaptiques (gabazine) ou extrasynaptiques (L655-708). J'ai observé qu'en présence de gabazine (et de bloqueurs de la transmission glutamatergique et des canaux sodiques) l'effet du CLP257 sur l'agrégation de KCC2 était aboli.

Bien que ces résultats semblent compatibles avec une implication des $GABA_AR$ dans l'effet du CLP257, différents points sont à souligner. Le premier est que ces antagonistes des $GABA_AR$ n'ont eux-mêmes aucun effet détectable sur l'agrégation de KCC2. Le L655-708 seul n'avait pas non plus d'effet dans l'étude de Heubl et al., 2017. En effet, seul l'ajout de GABA permettait d'observer un effet. En revanche, Heubl et al., 2017 ont observé que la gabazine diminue l'agrégation de KCC2 dans des neurones matures.

Ces différences pourraient s'expliquer par les limites de résolution du microscope à épifluorescence utilisé, qui pourrait masquer une potentielle diminution de l'aire, et donc de la valeur de l'intensité intégrée de fluorescence des agrégats. Cependant, le même microscope a été utilisé dans l'étude de (Heubl et al., 2017). Une autre explication réside dans le fait que les expériences de l'étude de (Heubl et al., 2017) ont été réalisées dans des conditions de surexpression d'un transporteur recombinant alors que mes résultats ont été obtenus sur le transporteur endogène. De plus, les auteurs se sont intéressés spécifiquement à la fraction membranaire de KCC2 en réalisant un marquage de surface à l'aide d'un anticorps dirigé contre une étiquette Flag extracellulaire. En revanche, mes expériences de pharmacologie ont été effectuées sur des neurones non transfectés ce qui n'a pas permis de détecter spécifiquement le pool membranaire de KCC2. Les conditions de surexpression et l'observation restreinte de la fraction membranaire de KCC2 dans l'étude de (Heubl et al., 2017) ont probablement facilité la visualisation de l'effet de la gabazine sur l'agrégation du transporteur.

En accord avec cette hypothèse, et dans mes expériences, la gabazine induit une diminution de l'agrégation du transporteur seulement en présence de CLP257, c'est-à-dire dans des conditions où KCC2 est davantage agrégé (voir RC.1).

Il semble donc probable que la diminution d'agrégation de KCC2 en présence des deux antagonistes des $GABA_AR$ ne reflète pas une implication de ceux-ci dans l'effet du CLP257 mais plutôt un effet à lui seul du blocage des récepteurs $GABA_A$ (comme observé dans Heubl et al., 2017) et qui serait dominant par rapport à l'effet du CLP257, conduisant ainsi à une occlusion de l'effet de ce dernier.

Afin de tester cette hypothèse, il serait intéressant d'explorer l'agrégation du transporteur par microscopie à super-résolution ou de répliquer ces expériences dans des conditions de surexpression d'un KCC2 recombinant portant une étiquette Flag extracellulaire, afin de se concentrer sur l'expression membranaire. Cela permettrait de tester si les antagonistes GABAergiques à eux seuls ont bien un effet sur l'agrégation du transporteur et si celui-ci compense celui induit par le CLP257.

Afin d'explorer plus en détail l'implication possible de la voie WNK/SPAK/OSR1 dans l'effet du CLP257 sur KCC2, j'ai également testé l'effet de deux antagonistes de cette voie : WNK463 et le closantel.

WNK463 est connu pour inhiber WNK1, réduire la pT1007, et ainsi augmenter la fonction de KCC2 (K. L. Lee et al., 2022). Le closantel, quant à lui, inhibe SPAK/OSR1 et réduit les phosphorylations inhibitrices de KCC2 (Heubl et al., 2017), ce qui pourrait favoriser l'agrégation et la fonction du transporteur. Contrairement aux résultats obtenus dans la littérature, et probablement pour les mêmes raisons que précédemment, je n'ai pas observé d'effet de ces antagonistes sur l'agrégation de KCC2 (voir RC.1). Il est important de noter que bien que l'effet de ces antagonistes sur les phosphorylations et la fonction de KCC2 ait été démontré, leur impact sur l'agrégation du transporteur n'est pas clairement défini, voire ambigu. Par exemple, le closantel n'a pas d'effet sur la diffusion de KCC2 et réduit même son agrégation membranaire dans l'étude de Heubl et al., 2017. Des études restent donc nécessaires pour identifier clairement l'effet de ces composés sur l'agrégation de KCC2.

Afin de complémenter ces approches pharmacologiques, j'ai également manipulé l'activité de la voie WNK/SPAK/OSR1 par transfection avec une forme recombinante de la kinase WNK1 constitutivement active (WNK1-CA, Friedel et al., 2015b; Heubl et al., 2017). Si cette kinase était impliquée dans l'effet du CLP257 sur l'agrégation de KCC2, l'expression d'une forme constitutivement active de WNK1 devrait empêcher l'effet du CLP257. En accord avec cette hypothèse, j'ai observé une absence d'effet du CLP257 en présence de WNK1-CA. Cependant, là encore, je n'ai observé aucun effet de la transfection de WNK1-CA en tant que telle, alors qu'une réduction de la diffusion de KCC2 - et donc probablement de son agrégation - a été observée dans l'étude de Heubl et al., 2017.

Là encore, la résolution du microscope à épifluorescence utilisé pour visualiser les agrégats de KCC2 pourrait avoir constitué un facteur limitant.

Ces résultats, bien qu'ambigus, restent compatibles avec une implication de la voie WNK/SPAK/OSR1 dans l'effet du CLP257 sur KCC2. Cependant mes expériences d'immunoprécipitation et de Western blot des différentes formes phosphorylées de KCC2 ont mis en évidence que le CLP257 n'agit pas sur les phosphorylations activatrices de WNK/SPAK, ni sur les phosphorylations sous-jacentes de KCC2 (Article : Figure 4), ce qui est difficilement conciliable avec notre hypothèse. Il semble donc plus probable que les manipulations de cette voie aient un effet dominant qui masque ou occlut l'effet du CLP257 sur KCC2.

Il est malgré tout important de noter que le fait que la voie WNK/SPAK/OSR1 ne soit vraisemblablement pas impliquée dans l'effet du CLP257, n'exclut pas que le CLP257 module l'agrégation, la diffusion et la fonction de KCC2 via une action sur les $GABA_AR$. En effet, la réduction de la diffusion membranaire de KCC2 par le CLP257 n'est observée qu'à distance des synapses (Article : Figure 3). Il est donc envisageable que le CLP257, en agissant spécifiquement sur les $GABA_AR$ extrasynaptiques, module localement l'agrégation de KCC2 via son action sur ces récepteurs.

Les benzodiazépines sont des modulateurs allostériques des $GABA_AR$ et, tout comme le CLP257, entraînent une réduction de la diffusion et une augmentation de l'agrégation de ces récepteurs (Lévi et al., 2015). De plus, une interaction directe entre KCC2 et les $GABA_AR$ a été mise en évidence (Huang et al., 2012; Wan et al., 2020). Il est donc possible que le CLP257, indépendamment de la voie WNK/SPAK/OSR1, agisse comme un modulateur allostérique des $GABA_AR$ extrasynaptiques en réduisant la diffusion et en augmentant l'agrégation de ces derniers, entraînant un effet similaire sur KCC2. Cette hypothèse pourrait être testée en étudiant l'effet du CLP257 sur la diffusion et l'agrégation des $GABA_AR$ par des expériences de suivi de particule unique et d'immunocytochimie.

Cette dernière hypothèse suggère que l'effet du CLP257 sur KCC2 impliquerait son interaction avec les $GABA_AR$. Cependant, comme on vient de le voir, l'effet du CLP257 sur l'agrégation de KCC2 n'est pas complètement bloqué par le L655-708 ce qui suggère également l'implication d'une voie indépendante des $GABA_AR$ extrasynaptiques. De plus, Il est important de noter que la fraction « extrasynaptique » de KCC2 dans mes expériences de SPT est en réalité une fraction de KCC2 présente en dehors des synapses GABAergiques, car seule une colocalisation avec le marqueur géphyrine a été réalisée. La fraction « extrasynaptique » de KCC2 comprend donc du transporteur situé soit à proximité des synapses glutamatergiques, soit à distance des synapses GABAergiques et glutamatergiques. L'effet du CLP257 sur KCC2 pourrait de ce fait être indépendant des récepteurs $GABA_AR$ et impliquer d'autres partenaires du transporteur situés au niveau des synapses glutamatergiques, tels que la sous-unité GluK2 des récepteurs du kaïnate (Kesaf et al., 2020; Mahadevan et al., 2014) ou la sous-unité auxiliaire Neto2 (Ivakine et al., 2013). Cependant, la liaison du CLP257 à ces partenaires reste à démontrer.

I.1.2 Hypothèse 2 : interaction avec d'autres récepteurs ou transporteurs

L'effet du CLP257 sur KCC2 pourrait impliquer l'un des nombreux partenaires du transporteur, présenté dans l'introduction, et connus pour augmenter la stabilité membranaire et la fonction de KCC2. Des recherches supplémentaires sont en revanche nécessaires pour identifier les cibles potentielles du CLP257. Dans ce sens, l'étude de Cardarelli et al., 2017 a mis en évidence, avec des expériences de liaison de ligands radioactifs, une interaction directe entre le CLP257 et différents récepteurs ou transporteurs. Parmi eux, on trouve :

- Les récepteurs de prolifération du péroxysome (PPARγ)
- La protéine translocatrice TSPO
- Le transporteur à l'adénosine
- Le récepteur 5HT-1A

L'interaction entre ces protéines et KCC2 n'a jamais été observée dans les différentes études d'interactome de KCC2 (Al Awabdh et al., 2022; Mahadevan et al., 2017; Smalley et al., 2020). De plus, aucune étude n'a à ce jour mis en évidence de régulation de KCC2 par ces protéines. Il est donc difficile de prédire l'implication de l'une de ces protéines dans les effets observés du CLP257 sur KCC2. La liaison du CLP257 aux 5HT-1AR est malgré tout intéressante car d'autres récepteurs à la sérotonine, les 5HT-2AR, sont connus pour réguler la stabilité membranaire et la fonction de KCC2 (voir I.3.1).

On pourrait imaginer que les 5HT-1AR régulent de la même manière KCC2. Cependant, la modulation de KCC2 par les 5HT-2AR implique des changements du niveau de phosphorylation de la S940, et des changements de l'expression du transporteur, que nous n'avons pas observés avec le CLP257.

De plus, des agonistes des 5HT-1AR semblent augmenter l'expression de KCC2 (Huang and Grau, 2018), ce qui n'est pas observé avec le CLP257. Il semble donc peu probable que l'effet du CLP257 sur KCC2 implique les 5HT-1ARs.

Par le biais d'un test d'activité enzymatique, (Cardarelli et al., 2017) ont également observé un effet inhibiteur du CLP257 sur une enzyme, la mono-oxydase (MO). De nombreux PEKs ont un effet sur l'expression de KCC2 en inhibant la MO (voir III.2.1.1). Cependant, les résultats obtenus au cours de ma thèse ne montrent pas d'effet du CLP257 sur l'expression de KCC2. Il semble donc peu probable que l'effet du CLP257 sur KCC2 passe par l'inhibition de la MO.

Il est malgré tout important de prendre en compte que l'absence d'effet du CLP257 sur l'expression du transporteur a été observée sur des neurones hippocampiques en culture, dans des conditions physiologiques. Il n'est donc pas impossible que l'effet du CLP257 sur KCC2 dans la pathologie implique son interaction avec les protéines mentionnées ci-dessus. D'autant plus que des changements d'expression de KCC2 ont été observés dans différents modèles de pathologies, associées à une diminution d'expression du transporteur (Barbour et al., 2020; Bilchak et al., 2021; Ferrini et al., 2017; Gagnon et al., 2013a; Gao et al., 2022; Lizhnyak et al., 2019; Sullivan et al., 2021).

L'hypothèse selon laquelle le CLP257 impliquerait des voies de signalisation différentes entre des conditions pathologiques et physiologiques reste donc à explorer.

I.2 Potentialisation de KCC2 par la PCPZ

La PCPZ est connue pour son action antipsychotique via l'antagonisme des récepteurs D2 à la dopamine (Silvestre and Prous, 2005). Au cours de ma thèse, j'ai testé l'effet d'un autre antagoniste des récepteurs D2/D3, l'éticlopride, sur l'agrégation de KCC2. Je n'ai observé aucun effet significatif sur l'agrégation du transporteur (Article : Supplementary fig5), ce qui signifie que l'effet de la PCPZ sur KCC2 ne passe probablement pas par son action sur les D2Rs. Pour confirmer ces observations, il serait également intéressant de tester l'effet de l'éticlopride sur la fonction et la diffusion du transporteur, via des expériences d'électrophysiologie et de suivi de particule unique.

Contrairement au CLP257, la PCPZ agit sur KCC2 mais n'a pas d'effet direct sur les $GABA_AR$ (Article : Figure 2). Pourtant, j'ai observé des effets similaires avec la PCPZ et le CLP257 dans des expériences visant à manipuler ces récepteurs, ou la voie WNK/SPAK/OSR1 qui est inhibée par les ions chlorure (voir RC.1). Ces observations renforcent l'idée selon laquelle la suppression de l'effet des potentialisateurs sur l'agrégation de KCC2 par les manipulations de cette voie serait davantage liée à un effet dominant du blocage de la voie WNK/SPAK/OSR1 conduisant à une occlusion de l'effet des potentialisateurs.

En revanche, j'ai observé que la PCPZ augmente légèrement la fréquence des mIPSCs (Article : Figure 2). Étant donné que la PCPZ a également une action antagoniste sur les récepteurs H3 à l'histamine (Appl et al., 2012, p. 201), et que ces récepteurs au niveau présynaptique semblent moduler la libération de GABA (Cilz and Lei, 2017; He et al., 2016), l'effet de la PCPZ sur les mIPSCs pourrait impliquer ces récepteurs.

En revanche, aucune étude n'a, à ce jour, démontré de lien direct entre les H3Rs et KCC2. L'implication de ces récepteurs dans l'effet de la PCPZ sur KCC2 reste donc à démontrer.

Différentes études ont illustré qu'en plus de son rôle antagoniste des D2Rs et des H3Rs, la PCPZ interagit et bloque d'autres récepteurs et transporteurs (Tableau 3). A nouveau, aucun d'entre eux n'a été identifié comme partenaire direct de KCC2 (Al Awabdh et al., 2022; Mahadevan et al., 2017; Smalley et al., 2020). Cependant, certains de ces récepteurs sont connus pour réguler l'expression ou la fonction de KCC2. En dehors des 5HT-2ARs, dont j'ai déjà parlé, les α1Rs régulent aussi KCC2. En effet, il a été montré que l'activation des α1Rs diminue la fonction de KCC2 et dépolarise E_{GABA} (Hewitt et al., 2009). Le fait que la PCPZ ait un effet antagoniste sur les α1R est intéressant, et suggère que ces récepteurs pourraient être impliqués dans l'effet potentialisateur de la PCPZ sur KCC2. Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse et pour identifier les voies de signalisation impliquées dans la régulation de KCC2 par les α1Rs.

En dehors de ces récepteurs, aucun lien n'a pour l'instant été mis en évidence entre les autres cibles de la PCPZ et KCC2. Cependant, on retrouve les 5HT-1ARs (Silvestre and Prous, 2005) qui, comme je l'ai indiqué plus haut, sont aussi des cibles du CLP257. Il serait donc intéressant d'étudier le lien entre ces récepteurs et KCC2 afin, notamment, d'explorer l'existence d'une interaction directe entre les deux protéines.

Il est intéressant de noter que la PCPZ est aussi un inhibiteur de la dynamine (Daniel et al., 2015), une GTPase associée à la clathrine, et impliquée dans la formation des vésicules d'endocytose. A ce titre, la PCPZ réduit ainsi l'endocytose de certains récepteurs tels que les EGFR (Chew et al., 2020). Étant donné que KCC2 est connu pour interagir avec la dynamine (Al Awabdh et al., 2022) et que son expression membranaire est également fortement régulée par l'endocytose dépendante de la dynamine (Chamma et al., 2013; Zhao et al., 2008b), on pourrait imaginer que l'effet de la PCPZ sur KCC2 implique une inhibition de la dynamine.

Néanmoins, cette hypothèse demeure peu probable dans des conditions physiologiques, car je n'ai observé aucun changement de l'expression membranaire de KCC2 lors d'une incubation avec la PCPZ. En revanche, ce mécanisme pourrait être impliqué dans la pathologie puisque des changements de l'expression membranaire de KCC2 par la PCPZ ont été observés (Liabeuf et al., 2017).

I.3 Autres possibilités et conclusion

Bien que mes résultats mettent en évidence que le CLP257 et la PCPZ ne modifient pas le niveau de phosphorylation des résidus canoniques de KCC2, il est possible que ces composés agissent sur le niveau de phosphorylation d'autres résidus, tels que ceux récemment identifiés dans des études de protéomique à large échelle (Cordshagen et al., 2018a; Weber et al., 2014). Parmi eux, les résidus S932, S937, T934 et T1009 sont intéressants, car leur phosphorylation semble augmenter ou réduire la fonction de KCC2, sans modifier le niveau d'expression totale ou membranaire du transporteur.

Il est donc possible que le CLP257 ou la PCPZ agissent sur KCC2 en modifiant directement le niveau de phosphorylation de ces résidus. Des expériences d'immunoprécipitation des formes phosphorylées de KCC2 seraient idéales pour tester cette hypothèse. Cependant, il n'existe pas à l'heure actuelle d'anticorps reconnaissant spécifiquement ces résidus de KCC2. Une autre possibilité consisterait à utiliser des approches de mutagenèse dirigée afin de muter ces résidus en aspartate ou glutamate (pour mimer la phosphorylation), ou bien en alanine (pour mimer la déphosphorylation).

De telles expériences permettraient de tester si le niveau de phosphorylation de ces résidus joue un rôle dans l'effet du CLP257 ou de la PCPZ sur l'agrégation, la fonction, et la diffusion de KCC2.

Ces deux composés potentialisateurs pourraient aussi cibler d'autres partenaires de KCC2, tels que CIP1 (Wenz et al., 2009) ou CKB (Inoue et al., 2006), connus pour augmenter la fonction du transporteur sans forcément changer son niveau d'expression. Enfin, le CLP257 et la PCPZ pourraient aussi favoriser la formation de radeaux lipidiques, qui selon Watanabe et al., 2009, augmentent l'agrégation et la fonction de KCC2.

En conclusion, même si différentes hypothèses sont envisageables, il est difficile d'identifier les cibles moléculaires de la PCPZ ou du CLP257 qui conduisent à l'effet observé sur KCC2. Cela est lié, notamment, au manque de connaissances exhaustives sur les cibles du CLP257, et à la diversité des cibles de la PCPZ, qui complique les études pharmacologiques. De plus, les partenaires moléculaires de KCC2 et les voies de signalisations régulant KCC2 ne sont encore que partiellement connus. Cela complique donc la recherche des mécanismes d'action des potentialisateurs identifiés par criblage de banques de petites molécules.

Même si l'identification des mécanismes d'action de ces composés pourrait permettrait de mettre en évidence de nouvelles voies de régulation de KCC2, ces potentialisateurs sont intrinsèquement non spécifiques et agissent donc sur plusieurs transporteurs et/ou récepteurs. Ils ne constituent donc pas forcément des composés idéaux d'un point de vue thérapeutique. En revanche, l'identification de ces composés comme potentialisateurs de KCC2 et leur effet bénéfique dans le contexte de l'épilepsie mettent en évidence l'intérêt de cibler KCC2 dans la pathologie. Il serait, de ce fait, intéressant d'utiliser des composés avec davantage de spécificité, c'est-à-dire connus pour agir sur des voies de régulation de KCC2, sur des partenaires du transporteur, ou connus pour potentialiser directement sa fonction.

II- Limites à l'utilisation de composés ciblant les partenaires de KCC2 et avantages de cibler directement le transporteur.

Différentes solutions sont envisageables pour augmenter la stabilité membranaire et la fonction de KCC2. Une première possibilité consisterait à cibler les nombreuses voies de signalisation régulant l'expression, la stabilité membranaire, et la fonction de KCC2, telle que la voie impliquant les kinases WNK/SPAK/OSR1 ou celle impliquant des récepteurs métabotropiques à différents neurotransmetteurs et la PKC (voir III.2.2.1, Figure 26 et Figure 27). Ces voies de signalisation régulent principalement l'expression membranaire et la fonction de KCC2 via des changements du niveau de phosphorylation de KCC2.

Cependant, comme discuté en introduction, les composés ciblant ces voies manquent de spécificité et les voies elles-mêmes ne sont pas spécifiques de KCC2 mais régulent d'autres protéines et fonctions essentielles dans la cellule (voir III.2.2.1), en particulier d'autres CCCs dont les mécanismes de régulation sont souvent communs, même si fonctionnellement opposés.

En dehors de ces voies de signalisation, l'interaction de KCC2 avec de nombreux partenaires moléculaires régule également l'expression membranaire, l'agrégation, et la fonction du transporteur. Théoriquement, cibler ces partenaires permettrait donc d'augmenter de manière indirecte la fonction de KCC2. J'ai déjà mentionné le fait que les benzodiazépines réduisent la diffusion et augmentent l'agrégation de ces récepteurs (Lévi et al., 2015).

Ces composés pourraient donc, par la même occasion, moduler la stabilité membranaire et la fonction de KCC2, étant donné que les deux protéines interagissent ensemble (Huang et al., 2012; Wan et al., 2020).

Des interactions régulant directement la fonction du transporteur, telles que celles avec CIP1 ou CKB, pourraient représenter une alternative avantageuse (Inoue et al., 2006; Wenz et al., 2009). Favoriser la stabilité membranaire de ces protéines permettrait de potentialiser KCC2. Cependant, aucun stabilisateur de CIP1 n'est actuellement connu, et les voies de régulation de ce transporteur restent à identifier. En parallèle, un inhibiteur de CKB, le DNFB, semble réduire la fonction de KCC2 ce qui suggère qu'un potentialisateur de cette protéine aurait l'effet inverse. Malheureusement, là encore, aucun composé ayant cet effet n'est connu à ce jour. De la même manière que cibler les voies de signalisations régulant la stabilité membranaire et la fonction de KCC2, cibler ces partenaires n'est pas forcément pertinent. En effet, ces protéines sont dans la plupart des cas exprimées de façon ubiquitaire dans l'organisme. C'est le cas par exemple de CIP1 qui, comme NKCC1, est exprimé dans de nombreux tissus de l'organisme (voir I.1.3.1 et Figure 3). De plus, elles jouent un rôle dans des processus cellulaires essentiels. CKB fournit ainsi l'énergie nécessaire au fonctionnement des pompes ioniques dans le cerveau (Kaldis et al., 1996, 1994), telles que la NA^+/K^+ ATPase et les canaux potassiques ATP-dépendants. Or, la majorité de l'énergie (environ 50%) consommée par les neurones est utilisée pour transporter les ions via ces transporteurs (Grosse et al., 1980; Kaldis et al., 1996). CKB est donc une enzyme clé impliquée dans le métabolisme énergétique du cerveau.

De son côté, CIP1 est connu pour modifier l'activité de transport et la cinétique des CCCs via la formation d'hétérodimères (Caron et al., 2000). Cela pourrait donc impacter les rôles cruciaux des CCCs dans les nombreux processus physiologiques tels que la régulation du volume cellulaire ou de la pression artérielle, le transport transépithélial d'ions, la sécrétion de potassium, les fonctions rénales, ou celles du système auditif (Adragna et al., 2004; Alvarez-Leefmans and Delpire, 2010; Arroyo et al., 2013; Blaesse et al., 2009; Gagnon and Delpire, 2013; Gamba, 2005; Kahle et al., 2008; Payne et al., 2003).

Afin de restaurer l'expression/la fonction de KCC2, il serait donc idéal d'agir spécifiquement sur le transporteur plutôt que sur des protéines interactrices ou régulatrices. Cibler directement KCC2, pour restaurer son expression membranaire dans la pathologie, permettrait de restaurer à la fois sa fonction d'extrusion des ions Cl^- mais également ses nombreux rôles non canoniques.

La première solution consisterait à augmenter spécifiquement la transcription du gène codant pour KCC2. Récemment, des composés potentialisateurs de l'expression de KCC2, les PEKs, ont été identifiés (Tang et al., 2019; Yeo et al., 2021a). Ces composés sont présentés en III.2.1.1 et certains d'entre eux sont d'ores et déjà utilisés dans différentes pathologies. Le safinamide par exemple est ainsi utilisé en tant que traitement d'appoint à la maladie de Parkinson (Bette et al., 2018; Peña et al., 2021).

De plus, la surexpression de KCC2 semble bénéfique dans la pathologie (Magloire et al., 2019). Cependant, surexprimer KCC2 présente plusieurs risques. D'une part, il est important de prendre en compte le fait que l'homéostasie neuronale des ions Cl^- est régulée par un équilibre fin entre l'expression de NKCC1 et l'expression de KCC2. Bien que cet équilibre soit d'ores et déjà altéré dans la pathologie, la surexpression de KCC2 pourrait avoir un effet néfaste en réduisant de façon trop drastique les niveaux de Cl^- dans les neurones.

D'autre part, KCC2, en couplant l'extrusion de Cl^- à une extrusion de K^+, présente des risques d'augmenter les niveaux de K^+ extracellulaire et par conséquent l'excitabilité globale du réseau, stratégie complètement opposée à celle souhaitée dans le cadre de l'épilepsie. Une étude suggère ainsi, via une approche de modélisation, que le rôle pro-convulsivant de la transmission GABAergique dans l'épilepsie serait favorisé par l'augmentation de $[K^+]$ extracellulaire médié par KCC2 (González et al., 2018).

Cependant, les preuves existantes suggèrent toutefois le contraire : l'inactivation phospho-dépendante de KCC2, qui augmente son activité chez les souris knock-in, semble retarder l'apparition des crises *in vitro*, et limite la gravité des crises dans un modèle de kainate *in vivo* (Moore et al., 2018).

Étant donné les nombreuses interactions protéiques de KCC2, surexprimer le transporteur présente également un risque de perturber l'organisation des autres protéines dans la cellule. Cela est particulièrement vrai étant donné que KCC2 interagit avec des protéines d'échafaudage telles que la géphyrine (Al Awabdh et al., 2022). Enfin la surexpression de KCC2 est connue pour induire des modifications morphologiques et favoriser la synaptogenèse (Nakamura et al., 2019).

Il serait donc plus intéressant de favoriser la stabilité membranaire et la fonction de KCC2 de façon similaire au CLP257 et à la PCPZ, c'est-à-dire en augmentant la stabilité membranaire, l'agrégation et la fonction du transporteur, mais sans forcément changer son niveau d'expression.

III- Développement de composés ciblant spécifiquement et directement KCC2

Une possibilité pour augmenter directement la stabilité membranaire, l'agrégation, et la fonction de KCC2 consisterait à agir sur le niveau de phosphorylation du transporteur. Non pas en ciblant les voies de signalisation régulant la phosphorylation des résidus de KCC2 mais en identifiant de nouveaux composés pharmacologiques, capables de favoriser ou d'empêcher la phosphorylation des résidus d'intérêt de KCC2. On pourrait ainsi imaginer des composés favorisant l'interaction de certaines kinases avec KCC2, lorsque ces dernières sont à l'origine de phosphorylations activatrices. A l'inverse, d'autres composés pourraient empêcher l'interaction de kinases ou masquer les résidus ciblés, dans le cas de phosphorylations inhibitrices. Les phosphorylations d'intérêt de KCC2, c'est-à-dire celles connues pour moduler la stabilité membranaire et/ou la fonction de KCC2 sont les suivantes : T906, S932, T934, S937, S940, T1007, T1009 (voir I.3.2.5). Les kinases phosphorylant les résidus T906, S932, T934, S937 et T1009 n'ont pas encore été identifiées. En revanche, la PKC est connue pour phosphoryler la S940, et SPAK/OSR1 sont connues pour phosphoryler la T1007.

De manière générale, la liaison des kinases à leur substrat implique, soit une liaison directe entre une partie de la kinase et une courte séquence sur son substrat, soit une liaison indirecte mettant en jeu une troisième protéine qui fournit un échafaudage et rapproche la kinase et son substrat (Miller and Turk, 2018). La PKC ne semble pas interagir directement avec KCC2 (Al Awabdh et al., 2022; Mahadevan et al., 2017); il est donc possible qu'une autre protéine rapproche la kinase du transporteur pour permettre la phosphorylation de la S940.

De manière similaire, l'isoforme majoritaire KCC2b ne possède pas de domaine de liaison à SPAK, contrairement à KCC2a (Markkanen et al., 2017). Cela signifie qu'une protéine joue vraisemblablement le rôle d'échafaudage entre SPAK/OSR1 et KCC2 afin de permettre la phosphorylation de la T1007.

On pourrait donc imaginer un composé pharmacologique favorisant 1) le rapprochement de la PKC avec KCC2, ou 2) empêchant la liaison de SPAK/OSR1 au partenaire de KCC2, ou bien encore 3) se fixant sur des résidus proches de la T1007 et masquant ainsi ce résidu aux kinases SPAK/OSR1.

A l'heure actuelle, les deux premières possibilités sont difficilement envisageables étant donné que les partenaires impliqués dans la liaison de ces kinases n'ont pas été clairement identifiés. La 3ème possibilité est en revanche envisageable. Cependant, pour développer ce composé, il faudrait connaître la conformation exacte du transporteur et notamment la portion que l'on souhaite cibler. Or, une problématique réside dans le fait que le domaine C-terminal de KCC2 n'a pas été entièrement modélisé. Différentes portions sont ainsi non résolues dans la structure du KCC2 chez la souris et l'humain, dont celle comprenant la T1007 (Zhang et al., 2021b). Seule une approximation de la localisation des sites phosphorylables a été effectuée (Zhang et al., 2021b) mais cela n'est pas suffisant. Il est donc nécessaire, dans un premier temps, de modéliser le domaine C-terminal de KCC2, si l'on souhaite développer de nouveaux composés potentialisateurs de KCC2.

IV- Rythmicité d'occurrence des crises et activités épileptiformes : impact sur les approches thérapeutiques

Au cours de ma thèse j'ai mis en évidence que l'administration chronique de PCPZ réduit l'occurrence de crises et d'activités épileptiformes (IIDs et HFOs) dans un modèle souris lithium-pilocarpine d'épilepsie du lobe temporal.

Bien que le modèle pilocarpine ait bien été caractérisé, la durée de la période de latence n'est pas clairement définie. Celle-ci peut être comprise entre 4 et 40 jours dans des modèles rongeurs de pilocarpine seule (Bortel et al., 2010; Cavalheiro et al., 1991; Chauvière et al., 2012; Lévesque et al., 2012, 2011; Liu et al., 1994; Soukupová et al., 2014), et une étude montre que toutes les souris induites avec un protocole lithium-pilocarpine ont des crises spontanées 1 mois après le SE (Müller et al., 2009). Cette variabilité de durée de phase latente peut s'expliquer par les différences dans les protocoles d'induction utilisés. Ainsi, des rats injectés avec de la pilocarpine à 380 mg/kg développent de l'épilepsie en 1 à 6 semaines (Cavalheiro et al., 1991). En revanche, lorsque le SE est arrêté par injection de diazépam ou d'autres drogues, la période de latence dépend de la durée du SE. Ainsi, une corrélation négative a été mise en évidence entre la durée du SE et celle de la période de latence (Lemos and Cavalheiro, 1995). Les différences peuvent aussi s'expliquer par les modèles utilisés, ou, pour un même modèle, par des sensibilités variables à la pilocarpine en fonction des lignées (Lévesque et al., 2016).

Au cours de ma thèse, j'ai observé, pour un même protocole, une variabilité importante dans le début de la phase chronique entre des souris d'une même lignée et induites en même temps (voir RC.II). Des questions se posent donc sur les facteurs expliquant cette variabilité interindividuelle.

Étant donné que l'accumulation des changements morphologiques, cellulaires et génétiques ,suite au SE, semble jouer un rôle essentiel dans l'apparition des crises récurrentes et spontanées (Pitkänen et al., 2015; Tan et al., 2021), il est possible que la variabilité dans le début de la phase chronique d'un individu à l'autre s'explique par des modifications épileptogènes sous-jacentes plus ou moins importantes.

Les modifications épigénétiques jouant un rôle important dans les processus d'épileptogenèse (Henshall et al., 2016; Henshall and Kobow, 2015), et étant sensibles au stress (Dion et al., 2022), on pourrait par exemple imaginer que la variabilité des niveaux de stress chez les animaux ait un impact sur les mécanismes d'épileptogenèse, et contribue en partie aux différences observées dans le début de la phase chronique. Cette hypothèse reste à tester en faisant le lien entre le niveau de stress des animaux, le début de leur phase chronique, et les différences dans la progression des marqueurs d'épileptogenèse.

Concernant les animaux ne présentant pas de crises, il est possible que ces animaux n'aient pas développé d'épilepsie à la suite du SE. Il est également possible que ces animaux soient bien épileptiques, mais aient des crises spontanées à une fréquence tellement faible que ces dernières soient manquées lors des périodes d'enregistrement de quelques jours. En effet, les sondes télémétriques utilisées dans mes expériences ayant une durée de vie limitée à 26 jours, les animaux n'ont pas pu être enregistrés en continu pendant des durées supérieures. L'absence de crise chez ces animaux sur la période d'enregistrement peut aussi s'expliquer par le fait que la fréquence des crises chez ces animaux n'est pas régulière (voir RC.II). En effet, il est important de noter que les crises récurrentes et spontanées ne sont pas uniformément réparties dans le temps mais qu'elles ont tendance à se produire en bouffées, aussi bien dans les modèles animaux d'épilepsie que chez l'humain (Williams et al., 2009). Cette occurrence se produit même préférentiellement à certains moments de la journée, ou sur des périodes de quelques jours, définissant des rythmes circadiens et multidien des crises (Baud et al., 2019, 2018; Debski et al., 2020; Quigg, 2000).

Au cours de ma thèse j'ai observé des profils d'occurrence des crises différents selon les animaux, et une rythmicité circadienne (voir RC.II). Les crises enregistrées, entre le jour 35 et le jour 40 après l'état de mal épileptique, surviennent ainsi préférentiellement au cours de la période de repos de l'animal (voir RC.II). Cette observation a d'ailleurs déjà été faite dans un modèle pilocarpine d'ELT, ce qui confirme mes observations (Debski et al., 2020).

Cette période de repos de l'animal comprend entre autre une période de sommeil. Ainsi, même si je n'ai pas évalué la phase de sommeil de mes animaux, il est possible que les crises surviennent préférentiellement pendant cette période. Celle-ci est connue pour être plus propice à l'émergence de crises chez les patients épileptiques (Bazil, 2000; Crespel et al., 1998; Gowers, 1885; Janz, 1962; St Louis, 2011). Gowers, 1885, a ainsi constaté qu'environ 20% des personnes épileptiques subissaient des crises uniquement pendant le sommeil.

Il a également été observé que 45 % des patients souffrant de crises tonico-cloniques généralisées ont une prédominance nocturne (Janz, 1962). Des patients avec une épilepsie du lobe frontal présentent également des crises partielles préférentiellement pendant le sommeil (Bazil, 2000; Crespel et al., 1998), avec une prédominance durant le sommeil non-REM (non-rapid eye movement). Cela peut s'expliquer par l'état d'hypersynchronisation des réseaux neuronaux lors de cet état de sommeil (Herman et al., 2001). Cependant, il est important de noter que, dans des études effectuées chez des patients atteints d'ELT, les crises semblent survenir préférentiellement en milieu d'après-midi, et donc pendant l'éveil (Pavlova et al., 2004; Quigg, 2000).

Ces différences observées entre les études soulignent la variabilité importante de rythmicité d'occurrence des crises d'un patient à l'autre et d'un animal à l'autre (Chen et al., 2021). Cette variabilité importante pourrait d'ailleurs expliquer pourquoi je n'observe pas de rythmicité flagrante dans l'occurrence des crises entre le jour 40 et le jour 45 après l'état de mal épileptique, période pour laquelle l'échantillon de souris testées est plus faible (n=8) par rapport à la période J35-J40 (n=17).

J'ai également observé une rythmicité circadienne dans l'occurrence des IIDs et des HFOs, des évènements considérés comme des biomarqueurs d'épilepsie (Staley and Dudek, 2006; Worrell et al., 2004) .

Les IIDs et surtout les HFOs semblent ainsi survenir pendant la période d'activité de l'animal (voir RC.II). Une rythmicité est en effet observée pour les activités épileptiformes comme les IIDs et les HFOs dans différentes épilepsies du lobe temporal (Balach et al., 2016; Chen et al., 2021; Karoly et al., 2016). Cependant, contrairement à mes observations, les IIDs semblent survenir préférentiellement durant la période de repos (8am-8pm) dans un modèle souris d'ELT (Baud et al., 2019). Les différences entre cette étude et mes résultats s'expliquent probablement par l'importante variabilité de rythmicité d'occurrence des IIDs observée d'une souris à l'autre dans mes conditions (voir RC.II). La moyenne de fréquence d'occurrence des IIDs au cours de la journée masque probablement la rythmicité d'occurrence individuelle. Il serait donc intéressant d'étudier pour chaque animal la rythmicité d'occurrence des IIDs ainsi que le lien entre l'occurrence des IIDs et des crises. Cela permettrait de de tester si l'activité intericta le et la probabilité d'occurrence des crises atteignent toutes deux un pic à des phases préférentielles des cycles circadiens ou multidien, comme cela a été observé dans d'autres études (Baud et al., 2019, 2018; Karoly et al., 2016; Spencer et al., 2016).

La rythmicité d'occurrence des HFOs a en revanche été moins étudiée dans le cadre de l'épilepsie, mais il semble également y avoir une rythmicité diurne des HFOs (Petito et al., 2022), ainsi qu'un lien entre les rythmes circadiens et multidien des HFOs et la survenue des crises (Birk et al., 2021; Chen et al., 2021; Zijlmans et al., 2009). De plus, ces événements se produisent au début des événements ictaux chez les rongeurs, suggérant qu'ils sont associés aux mécanismes de génération des crises, et ne sont pas simplement une conséquence de l'épilepsie (A. Bragin et al., 1999a; Bragin et al., 2005). Cependant, les résultats obtenus dans mes expériences (voir RC.II) vont à l'encontre de ces hypothèses et suggèrent que la rythmicité d'occurrence des HFOs ne serait pas liée à celle des crises. Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour étudier plus en détail le lien entre HFOs et crises.

Ces rythmes biologiques des crises et des activités épileptiformes sont probablement liés à des perturbations de la régulation circadienne ou multidienne de l'expression et de la fonction de nombreuses protéines (Debski et al., 2020). Une explication pourrait être que le remaniement quotidien de l'environnement moléculaire rapproche les réseaux neuronaux du seuil de crise à des moments précis de la journée (Debski et al., 2020; Jirsa et al., 2014).

Il a par exemple été observé une fluctuation physiologique importante, au cours de la journée, de [Cl⁻]i dans les cellules pyramidales corticales. Cette fluctuation est associée à des changements de l'état de phosphorylation et des niveaux d'expression de KCC2 et NKCC1, ainsi qu'à des changements importants dans l'excitabilité du réseau à différents moments de la journée (Pracucci et al., 2021). Cela suggère que le rythme circadien d'expression et de phosphorylation de certaines protéines pourrait jouer un rôle déterminant dans la survenue des crises.

Dans ce sens on pourrait imaginer que des composés ciblant KCC2, tel que la PCPZ, aient un effet spécifique à un certain moment de la journée. Or, dans mes expériences *in vivo*, je n'ai pas observé d'effet sensiblement plus important de la PCPZ sur l'occurrence de crises enregistrées au cours de la journée (voir RC.II). Cela suggère que la PCPZ n'agirait pas sur des mécanismes sensibles à une régulation circadienne. Cette hypothèse est également en accord avec les observations *in vitro* qui mettent en évidence que ce composé n'agit ni sur l'expression ni sur le niveau de phosphorylation du transporteur.

Mis à part cette rythmicité, il est intéressant de noter que la PCPZ réduit significativement la fréquence des crises, mais pas leur durée ni leur amplitude (Article : Supplementary fig9). Cela sous-entend que ce composé agit sur les mécanismes de genèse des crises, plus que sur leur maintenance.

Dans ce sens, de plus en plus d'études ont suggéré l'implication des interneurones et notamment des interneurones PV dans la genèse d'activités de type ictale *in vitro* (Chang et al., 2018; Sessolo et al., 2015; Shiri et al., 2015; Yekhlef et al., 2015). Etant donné le rôle de KCC2 dans le contrôle de l'homéostasie neuronale dans ce type cellulaire (Otsu et al., 2020) ainsi que dans la régulation de l'excitabilité neuronale (Goutierre et al., 2019a), il est possible que la PCPZ, en agissant sur le transporteur, réduise l'activité des interneurones PV et par conséquent la genèse de crises. Cette hypothèse est renforcée par une étude que j'ai mentionnée précédemment qui montre qu'une surexepression de KCC2 dans les cellules principales corticales prévient l'effet pro-épileptique de l'activation des interneurones PV (Magloire et al., 2019). Les auteurs ne se sont pas intéressés à la genèse des crises, mais il est possible que la potentialisation de KCC2 dans ces interneurones ait un effet antiépileptique. Des études supplémentaires restent cependant nécessaires pour confirmer ces hypothèses.

La PCPZ a également un effet sur l'occurrence d'IIDs et d'HFOs, indépendamment de leur rythmicité d'occurrence. Il est possible que l'effet de ce composé sur la fréquence d'IIDs implique son effet potentialisateur sur KCC2. En effet, ces activités semblent générées par des sous populations de neurones présentant des niveaux d'expression réduits de KCC2 ainsi qu'une signalisation GABAergique dépolarisante dans le tissu humain réséqué de patients atteint d'ELT (Huberfeld et al., 2011, 2007a).

Les HFOs épileptiques, quant à eux, représentent le potentiel de champ formé par l'activité de groupes de cellules pyramidales anormalement synchrones (Engel et al., 2009) et d'interneurones GABAergique (Cepeda et al., 2020; Le Van Quyen et al., 2008). Bien que les deux types cellulaires soient impliqués dans la genèse d'HFOs, il est important de noter que des enregistrements *in vivo* au niveau de l'hippocampe chez des patients épileptiques révèlent que les cellules pyramidales déchargent préférentiellement au pic d'amplitude des HFOs, tandis que les interneurones semblent décharger avant les cellules pyramidales (Le Van Quyen et al., 2008). Il est donc probable que la PCPZ agisse sur l'occurrence des HFOs en ayant un impact sur l'excitabilité des interneurones GABAergiques, comme mentionné précédemment dans le cas de la genèse de crises.

En dehors de l'aspect purement théorique, la découverte récente des rythmes et des profils temporels de survenue des crises ou d'évènements épileptiformes questionne quant à la pertinence de nombreuses études qui, encore à l'heure actuelle, testent l'effet de nouveaux traitement antiépileptiques en se basant sur des enregistrements très courts, parfois de seulement quelques heures. Comme on vient de le voir, il est nécessaire de réaliser des enregistrements à plus long terme afin d'éviter que le profil temporel de survenue des crises ne perturbe l'interprétation de l'effet d'un traitement. Au cours de ma thèse, j'ai choisi d'effectuer des enregistrements en continu sur des périodes de 10 jours, avec 5 jours d'injections de saline puis 5 jours de traitement à la PCPZ. Cependant, même dans ce cas, certains animaux n'ont pu être conservés dans nos analyses, car ils ne présentaient qu'une ou deux crises sur cette période de 10 jours (voir RC.II).

Il faudrait donc imaginer des enregistrements peut être sur plusieurs semaines afin d'obtenir une fréquence de crises suffisamment importante et pouvoir tirer des conclusions quant à l'effet ou non d'un traitement.

Cette idée est intéressante mais peut être difficile à mettre en place car la durée des enregistrements peut être limitée par la technique utilisée. Ainsi, au cours de ma thèse j'ai choisi d'utiliser des sondes ECoG télémétriques afin d'enregistrer en continu les animaux épileptiques. Ces sondes sont intéressantes car elles ont un impact modéré sur la locomotion des animaux, et permettent d'enregistrer plusieurs animaux par cage. En revanche, ces sondes sont limitées par la durée de vie de leur batterie, qui dépend de la fréquence d'échantillonnage et n'est actuellement que d'une vingtaine de jours pour la fréquence d'échantillonnage que nous avons choisie. Une autre possibilité consisterait à enregistrer les animaux par ECoG filaire. Cela permettrait d'effectuer des enregistrements à plus long terme mais limite la locomotion de l'animal et ne permet pas d'enregistrer plusieurs animaux en parallèle dans la même cage. L'idéal serait donc de développer des batteries de sondes télémétriques avec une durée de vie plus importante.

En résumé, plusieurs étapes sont nécessaires si l'on souhaite tester l'effet d'un traitement antiépileptique sur l'occurrence de crises enregistrées en phase chronique chez des animaux épileptiques. D'une part, comme on vient de le voir, il est important d'enregistrer les animaux sur des périodes de temps de quelques jours voir de quelques semaines. Cela peut permettre d'identifier le début de la phase chronique ainsi que le profil de survenue des crises.

Étant donné que certaines études suggèrent un lien entre l'occurrence des IIDs et des crises (Baud et al., 2019, 2018; Karoly et al., 2016; Spencer et al., 2016), il serait intéressant de tester si le traitement est plus efficace lorsqu'il est appliqué au moment de la phase ascendante d'occurrence des IIDs.

Cette discussion invite donc à considérer une approche personnalisée lors de la prescription d'un antiépileptique, dans laquelle la rythmicité d'occurrence des crises chez les patients serait prise en compte afin d'optimiser l'efficacité du traitement. Dans ce sens, différentes études ont d'ores et déjà mis en évidence un bénéfice de la chronothérapie dans le traitement des épilepsies (Guilhoto et al., 2011; Yegnanarayan et al., 2006). Dans ces études, l'administration de doses plus élevées d'antiépileptiques à des moments précis de la journée a ainsi permis un meilleur contrôle des crises.

Le développement de la chronothérapie dans le contexte de l'épilepsie reste donc essentiel et présente un potentiel important pour améliorer l'efficacité des traitements actuels.

Publications supplémentaires

Article 3 :

KCC2 régule l'excitabilité neuronale et l'activité hippocampique via son interaction avec les canaux Task-3

Introduction

Comme présenté dans l'introduction, KCC2 contrôle l'homéostasie neuronale des ions Cl^- et, par conséquent, l'efficacité et la polarité de la transmission GABAergique (voir I.2.2). Dans de nombreuses affections neurologiques et psychiatriques, une diminution de l'expression et de la fonction de KCC2 pourrait être à l'origine d'une signalisation GABAergique dépolarisante qui contribuerait à l'émergence d'activités pathologiques (Kahle et al., 2008; Kaila et al., 2014) (voir II.1 et II.3). Rétablir l'homéostasie neuronale des ions Cl^- représente donc un potentiel thérapeutique d'intérêt afin de réduire l'émergence de ces activités. Dans ce sens, des bloqueurs de NKCC1 ou des potentialisateurs de KCC2 montrent des résultats bénéfiques dans la pathologie (Banerjee et al., 2016b; Dargaei et al., 2018b; Gagnon et al., 2013b; Huberfeld et al., 2007b; Liabeuf et al., 2017) (voir III). Potentialiser l'expression et la fonction de KCC2 permet, non seulement d'augmenter l'extrusion des ions Cl^- et de rétablir la polarité de la transmission GABAergique, mais aussi de restaurer les nombreuses fonctions non canoniques du transporteur, qui impliquent son interaction avec différents partenaires moléculaires (voir I.2.4). KCC2 régule ainsi la morphologie des épines dendritiques (Gauvain et al., 2011; H. Li et al., 2007), le cytosquelette d'actine (Chevy et al., 2015; Llano et al., 2015), ainsi que la force et la plasticité à long-terme des synapses glutamatergiques (Chevy et al., 2015; Gauvain et al., 2011). Des analyses de protéomique à grande échelle ont également identifié de nouveaux partenaires de KCC2, dont certains impliqués dans le recyclage et le trafic de protéines transmembranaires et de récepteurs (Mahadevan et al., 2017). Ces partenaires peuvent influencer la fonction de KCC2, ou à l'inverse, être régulés par KCC2. Une perturbation de l'expression de KCC2 et de son interaction avec ces partenaires peut donc affecter les propriétés intrinsèques et synaptiques des neurones, et contribuer à l'émergence d'activités anormales, à l'origine des troubles neurologiques et psychiatriques.

Objectif

Dans ce contexte, j'ai contribué, au cours de ma thèse, à un projet de l'équipe visant à tester l'impact fonctionnel - au niveau cellulaire, synaptique et de l'activité de réseau - d'une diminution chronique d'expression de KCC2 dans le gyrus denté de rat.

Résultats

A l'aide d'expériences d'électrophysiologie, nous avons tout d'abord montré que la diminution d'expression de KCC2 dépolarise, dans les mêmes proportions, E_{GABA} et le potentiel membranaire au repos (V_m). Cela signifie que la diminution d'expression de KCC2 n'a pas d'effet net majeur sur la force électromotrice (V_m-E_{GABA}) des courants médiés par les $GABA_AR$. En revanche, la dépolarisation de V_m est accompagnée d'une augmentation de la résistance membranaire (R_{in}), ce qui conduit à une excitabilité accrue des neurones en grains du gyrus denté.

La dépolarisation de V_m et l'augmentation de R_{in} traduisent généralement une réduction des courants potassiques. Nous avons ainsi montré que la conductance potassique de fuite est réduite, et plus particulièrement pour les courants sortants, suggérant que l'expression des canaux potassiques de fuite pourrait être réduite à la suite d'une diminution d'expression de KCC2. Nous avons ainsi mis en évidence, à l'aide d'expériences d'immunohistochimie et d'imagerie au microscope confocale, une diminution d'expression du canal potassique de fuite Task3.

Nous avons ensuite révélé, via des expériences de co-immunoprécipitation, que Task-3 interagit avec KCC2 et favorise l'expression membranaire du transporteur.

Nous avons également montré que la diminution d'expression de KCC2 dans les cellules granulaires favorise leur recrutement par les afférences entorhinales. Cet effet implique principalement une augmentation de l'excitabilité et du couplage entre potentiels post-synaptiques excitateurs et décharge des potentiels d'action. Contrairement aux résultats observés dans une autre étude (Chen et al., 2017), nous avons observé que les perturbations de l'excitabilité des cellules granulaires à la suite de la diminution d'expression de KCC2 ne sont pas suffisantes pour générer ou favoriser l'émergence d'activités épileptiformes, mais qu'elles augmentent l'amplitude et la fréquence des *dentates spikes*, une activité du gyrus denté associée notamment au sommeil à ondes lentes.

Nous avons enfin montré que les altérations de la rythmogenèse du gyrus denté peuvent être normalisées par une hyperpolarisation chimiogénétique, ce qui démontre que l'effet fonctionnel majeur d'une suppression de KCC2 dans le gyrus denté n'est pas lié à son action sur la signalisation GABAergique, mais plutôt à son effet sur l'excitabilité neuronale.

Conclusion

En résumé, nos résultats mettent en évidence un nouveau partenaire de KCC2, Task-3, dont l'expression membranaire est dépendante de celle du transporteur. Cette interaction révèle donc un nouveau rôle non canonique de KCC2 dans le contrôle de l'excitabilité membranaire. Nous montrons également que bien que la réduction de KCC2 dans les cellules granulaires du gyrus denté augmente l'excitabilité de ces cellules et altère la rythmogenèse hippocampique, cela n'est pas suffisant pour générer ou favoriser l'émergence d'activités épileptiformes. Ces résultats questionnent l'hypothèse d'un rôle causal de la perte d'expression de KCC2 dans l'épilepsie.

Contribution

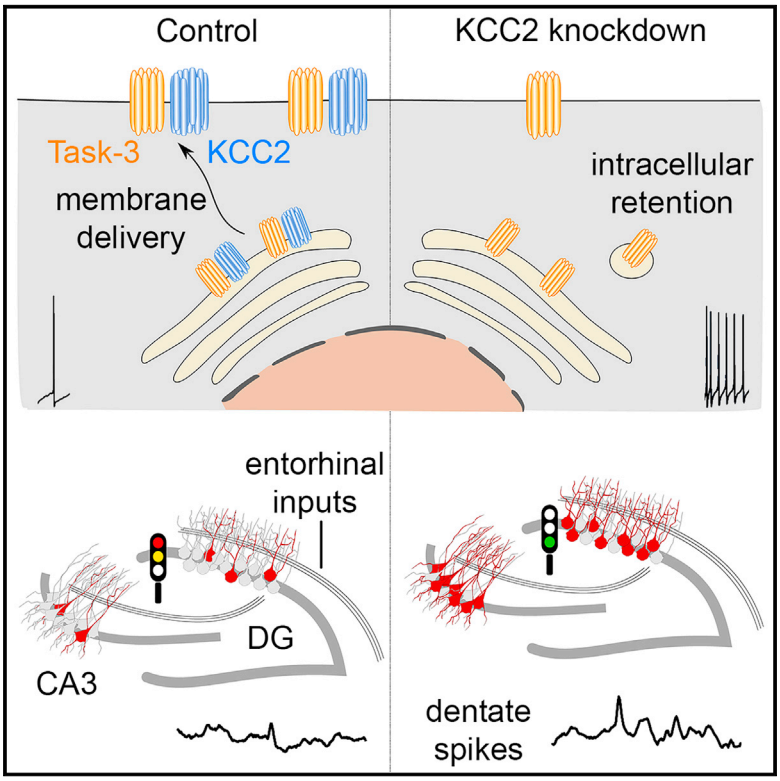
Dans cet article, j'ai contribué à une partie des expériences de biochimie et d'immunohistochimie, et à l'analyse des résultats.

Article

Cell Reports

KCC2 Regulates Neuronal Excitability and Hippocampal Activity via Interaction with Task-3 Channels

Graphical Abstract



Authors

Marie Goutierre, Sana Al Awabdh, Florian Donneger, ..., Theano Irinopoulou, Liset Menendez de la Prida, Jean Christophe Poncer

Correspondence

jean-christophe.poncer@inserm.fr

In Brief

Reduced KCC2 expression is associated with numerous neurological and psychiatric disorders and assumed to primarily affect GABA signaling. Goutierre et al. demonstrate chronic KCC2 knockdown in rat hippocampus has little effect on GABA signaling but affects neuronal excitability and network activity by downregulating membrane expression of Task-3 leak potassium channels.

Highlights

- KCC2 interacts with Task-3 potassium channels and regulates their membrane traffic
- KCC2 knockdown depolarizes rat hippocampal neurons and increases their excitability
- Chronic KCC2 knockdown in rat dentate gyrus is not sufficient to induce seizures
- Network activity is altered by KCC2 knockdown, mostly independent of GABA signaling

Goutierre et al., 2019, Cell Reports *28*, 91–103
July 2, 2019 © 2019 The Author(s).
https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.06.001

CellPress

Cell Reports
Article

OPEN ACCESS
CellPress

KCC2 Regulates Neuronal Excitability and Hippocampal Activity via Interaction with Task-3 Channels

Marie Goutierre,[1,2,3] Sana Al Awabdh,[1,2,3] Florian Donneger,[1,2,3] Emeline François,[1,2,3] Daniel Gomez-Dominguez,[4] Theano Irinopoulou,[1,2,3] Liset Menendez de la Prida,[4] and Jean Christophe Poncer[1,2,3,5,*]
[1]INSERM UMR-S 1270, 75005 Paris, France
[2]Sorbonne Université, 75005 Paris, France
[3]Institut du Fer à Moulin, 75005 Paris, France
[4]Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid 28002, Spain
[5]Lead Contact
*Correspondence: jean-christophe.poncer@inserm.fr
https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.06.001

SUMMARY

KCC2 regulates neuronal transmembrane chloride gradients and thereby controls GABA signaling in the brain. KCC2 downregulation is observed in numerous neurological and psychiatric disorders. Paradoxical, excitatory GABA signaling is usually assumed to contribute to abnormal network activity underlying the pathology. We tested this hypothesis and explored the functional impact of chronic KCC2 downregulation in the rat dentate gyrus. Although the reversal potential of GABAA receptor currents is depolarized in KCC2 knockdown neurons, this shift is compensated by depolarization of the resting membrane potential. This reflects downregulation of leak potassium currents. We show KCC2 interacts with Task-3 (KCNK9) channels and is required for their membrane expression. Increased neuronal excitability upon KCC2 suppression altered dentate gyrus rhythmogenesis, which could be normalized by chemogenetic hyperpolarization. Our data reveal KCC2 downregulation engages complex synaptic and cellular alterations beyond GABA signaling that perturb network activity thus offering additional targets for therapeutic intervention.

INTRODUCTION

Fast synaptic inhibition in the brain is primarily mediated by GABAA receptors (GABAAR), which are ligand-gated receptors associated with an anion-permeable conductance. GABAAR currents are carried by chloride and, to a lesser extent, bicarbonate fluxes (Bormann et al., 1987). Consequently, the net ion flux through GABAAR channels relies on both the transmembrane gradients of these ions and the neuronal resting membrane potential, which determine the driving force of GABAAR currents. In mature neurons, transmembrane chloride gradients are predominantly regulated by the opposing actions of two cation-chloride cotransporters (CCCs), KCC2 and NKCC1, which respectively mediate outward and inward cotransport of chloride and potassium ions under basal conditions (Blaesse et al., 2009). Thus, postnatal upregulation of KCC2 expression is associated with a progressive hyperpolarizing shift in the reversal potential of GABAAR-mediated currents (E_{GABA}) (Rivera et al., 1999).

In mature neurons, KCC2 expression and function are rapidly regulated by neuronal activity via multiple posttranslational mechanisms (Côme et al., 2019; Medina et al., 2014). Thus, Ca^{2+} influx through postsynaptic NMDA receptors or during prolonged postsynaptic firing (Fiumelli et al., 2005) rapidly reduces KCC2 membrane expression and function through protein-phosphatase-1-dependent dephosphorylation of its Ser940 residue and protein cleavage by the calcium-activated protease calpain (Chamma et al., 2013; Lee et al., 2011; Puskarjov et al., 2012). Conversely, Cl^- influx through GABAA receptors stabilizes KCC2 at the plasma membrane via chloride-mediated inhibition of the serine-threonine WNK1 kinase and its downstream effectors SPAK-OSR1, which phosphorylate KCC2 on Thr906 and Thr1007 residues (Caraiscos et al., 2004; Heubl et al., 2017; Kahle et al., 2016). Finally, KCC2 expression is also regulated by several neuromodulators acting on G-protein-coupled receptors (Mahadevan and Woodin, 2016) as well as neurotrophins, such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF), acting via TrkB signaling (Rivera et al., 2002).

KCC2 dysregulation has been associated with numerous neurological and psychiatric disorders (Kaila et al., 2014; Kahle et al., 2008). These include epilepsy (Di Cristo et al., 2018), neuropathic pain (Coull et al., 2003; Gagnon et al., 2013), post-traumatic spasticity (Boulenguez et al., 2010), Huntington disease (Dargaei et al., 2018), schizophrenia (Hyde et al., 2011), and Rett syndrome (Deidda et al., 2015; Banerjee et al., 2016; Tang et al., 2016). In most cases, reduced KCC2 expression was associated with a depolarized E_{GABA} that could be partly rescued using NKCC1 antagonists or KCC2 enhancers (Banerjee et al., 2016; Dargaei et al., 2018; Gagnon et al., 2013; Huberfeld et al., 2007; Liabeuf et al., 2017). Because these drugs also ameliorated the pathological symptoms, those were generally assumed to primarily reflect a defect in neuronal chloride transport and altered GABAergic neurotransmission.

However, KCC2 functions in neurons extend beyond the mere control of chloride transport. Through interactions with multiple

This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

transmembrane and intracellular partners, KCC2 regulates dendritic spine morphology (Gauvain et al., 2011; Li et al., 2007) and actin cytoskeleton (Chevy et al., 2015; Llano et al., 2015), as well as the strength and long-term plasticity of glutamatergic synapses (Chevy et al., 2015; Gauvain et al., 2011). Functional proteomics data revealed additional putative KCC2 partners, including some involved in the recycling and trafficking of various transmembrane proteins and receptors (Mahadevan et al., 2017). Those may then either influence KCC2 function or, conversely, be regulated by KCC2. Thus, dysregulation of KCC2 expression may affect neuronal intrinsic and synaptic properties and thereby contribute to abnormal activity patterns that underlie neurological and psychiatric disorders. Deciphering the relative contribution of these perturbations upon KCC2 downregulation may then help predict the most effective rescue strategies.

Here, we explored the functional impact of chronic KCC2 downregulation in the rat dentate gyrus at the cellular, synaptic, and network activity levels. KCC2 knockdown had no significant effect on the driving force of GABAAR currents at rest but instead enhanced neuronal excitability and excitatory postsynaptic potential (EPSP)/spike coupling through membrane depolarization and increased resistance. Pharmacological and biochemical evidence suggest this effect primarily reflected the downregulation of a leak potassium conductance carried by tandem of pore domain in a weak inwardly rectifying K+ channels (TWIK)-related acid-sensitive 3 (Task-3) channels, the membrane expression and function of which were regulated via interaction with KCC2. KCC2 knockdown in about 40%–70% granule cells was not sufficient to promote epileptiform activity but altered dentate gyrus network activity, which was normalized by restoring granule cell membrane properties. Our results show that KCC2 downregulation affects network activity primarily through enhanced neuronal excitability, suggesting novel targets for therapeutic intervention.

RESULTS

We investigated the impact of a chronic KCC2 suppression in the dentate gyrus using *in vivo* RNAi. Young adult rats (postnatal day 30 [P30]) were stereotaxically injected in the dorsal dentate gyrus with lentiviruses expressing previously validated (Chevy et al., 2015; Gauvain et al., 2011) KCC2-directed small hairpin RNA (shKCC2) or non-target small hairpin RNA (shNT) sequences together with GFP. KCC2 knockdown in transduced neurons was first confirmed by immunofluorescence imaging 2 weeks after *in vivo* infection (Figures 1A and 1B) and quantified by western blot analysis of primary hippocampal neurons 10 days after *in vitro* infection (Figure 1C). Next, we analyzed GABAAR-mediated transmission using gramicidin perforated-patch recordings. GABAAR-mediated currents were evoked by somatic laser uncaging of Rubi-GABA (15 μM) while varying holding potentials (Figure 1D). As expected, the reversal potential of GABAAR currents (E_{GABA}) was significantly more depolarized in KCC2 knockdown neurons (−74.2 ± 2.7 mV) compared to control granule cells (−82.0 ± 2.2 mV; t test; $t_{24} = 2.22$; p = 0.0360; Figure 1E), although their mean conductance was not significantly different (3.6 ± 0.7 versus 2.5 ± 0.4 nS; Mann-Whitney test; p = 0.32). However, KCC2 knockdown neurons also displayed more depolarized resting membrane potential (V_{rest}; −83.6 ± 1.5 versus −89.8 ± 0.8 mV; t test; $t_{24} = 3.41$; p = 0.0023). The shift in E_{GABA} and V_{rest} was of similar magnitude such that the driving force of ion flux through GABAARs at rest was not significantly affected (9.4 ± 2.5 versus 7.8 ± 2.3 mV; t test; $t_{24} = 0.48$; p = 0.63). Additionally, neither the amplitude (14.1 ± 1.2 versus 14.8 ± 0.7 pA; Mann-Whitney; p = 0.42) or mean frequency (0.9 ± 0.1 versus 1.2 ± 0.2 Hz; Mann-Whitney; p = 0.27) of miniature inhibitory postsynaptic currents (mIPSCs) was affected by chronic KCC2 knockdown (Figures 1F and 1G). Therefore, KCC2 suppression in dentate granule cells does not significantly affect steady-state GABAergic transmission, due to an unexpected depolarizing shift in resting membrane potential.

We further explored the mechanisms underlying changes in membrane potential upon KCC2 suppression in granule cells. Whole-cell recordings from infected neurons while blocking synaptic transmission showed that depolarized resting membrane potential in KCC2 knockdown granule cells (−80.8 ± 1.6 versus −87.7 ± 1.1 mV; t test; $t_{37} = 3.45$; p = 0.0014) was accompanied by an increase in input resistance (662.7 ± 47.1 versus 513.4 ± 47.9 MΩ; t test; $t_{37} = 2.21$; p = 0.033; Figure 2A). These changes resulted in higher excitability of KCC2 knockdown neurons following current injection (Figure 2C; repeated-measures ANOVA; $F_{15,555} = 11.98$; $p = 3.2 \times 10^{-7}$), and no difference was observed in action potential threshold (Figure 2D; −50.7 ± 1.9 versus −50.6 ± 1.3 mV; t test; $t_{37} = 0.06$; p = 0.95), waveform, or amplitude (89.6 ± 1.8 versus 88.3 ± 3.3 mV; Mann-Whitney; p = 0.56; Figures 2E and 2F).

Increased neuronal excitability upon KCC2 downregulation was cell autonomous because neighboring uninfected cells had similar properties in slices from animals infected with viruses expressing shNT or shKCC2 (Figure S1). In addition, acute application of the KCC2-specific antagonist VU0463271 (Delpire et al., 2012; 6 μM) for more than 30 min did not affect granule cell membrane resistance (299.0 ± 26.2 versus 356.1 ± 35.7 MΩ; $t_{30} = 1.31$; p = 0.20; Figure S1), indicating KCC2-mediated ion transport per se does not significantly contribute to input resistance. Finally, these modifications were not specific of dentate granule cells, because KCC2 knockdown in CA1 pyramidal cells also resulted in depolarized resting membrane potential (−66.6 ± 1.0 versus −72.1 ± 1.5 mV; t test; $t_{20} = 2.95$; p = 0.0079), increased input resistance (213.0 ± 25.4 versus 134.5 ± 10.2 MΩ, Mann-Whitney; p = 0.0013), and shifted input-output curve (repeated-measures ANOVA; $F_{15,300} = 11.5$; p = 0.0029; Figure S2).

Depolarized membrane potential and increased input resistance likely reflect a reduction in potassium currents operating at rest. We tested this hypothesis by recording potassium currents while blocking synaptic transmission. In KCC2 knockdown granule cells, potassium conductance was reduced (Figures 2G and 2H), particularly for outward currents, as evidenced by reduced rectification index in KCC2 knockdown versus control granule cells (0.5 ± 0.1 versus 0.8 ± 0.1; t test; $t_{37} = 3.62$; p = 0.0009; Figure 2I). This suggests that outwardly rectifying leak potassium channels might be downregulated upon KCC2 suppression. Two-pore-domain potassium channels (K2P) are a large family of leak potassium channels comprising both

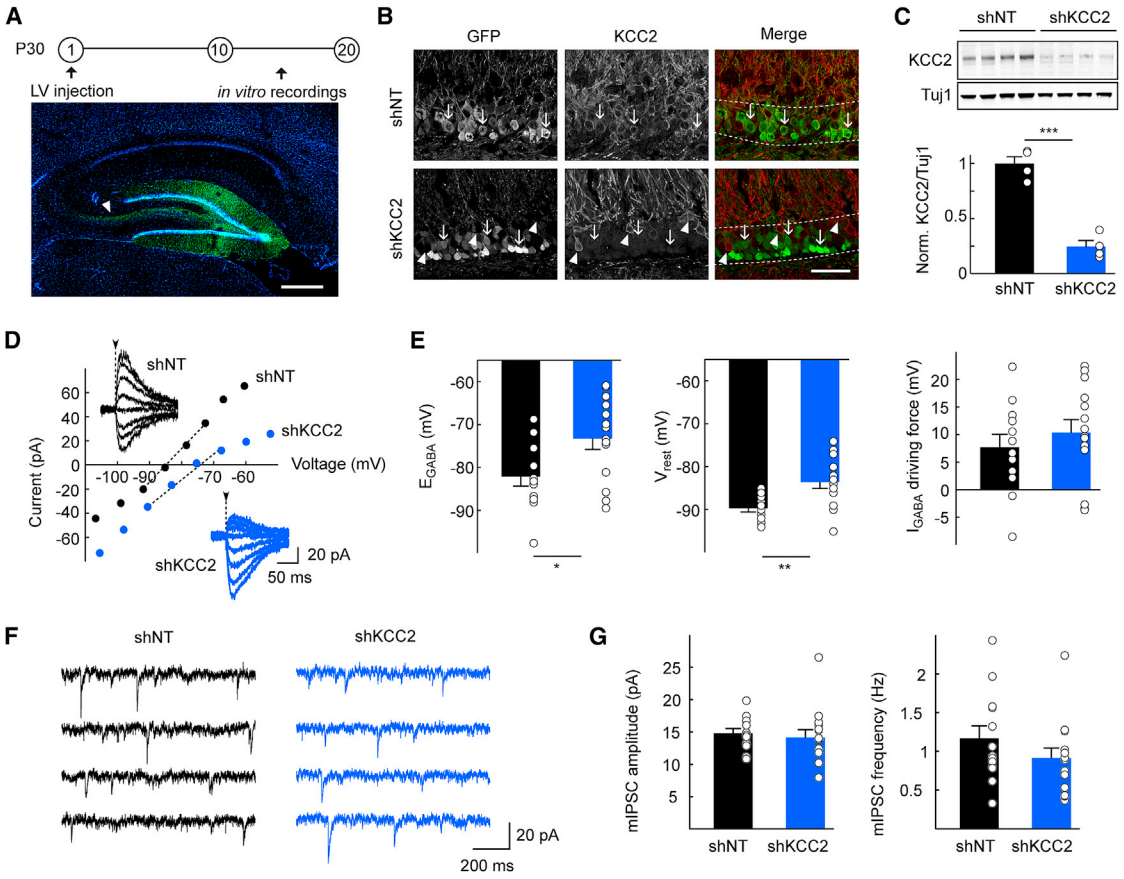


Figure 1. KCC2 Suppression in Dentate Granule Cells Does Not Alter Steady-State GABA Signaling

(A) Top: experimental timeline. Bottom: confocal micrographs show infected cells (GFP, green) and DAPI (blue) staining in a parasagittal hippocampal slice 2 weeks post-infection. Arrowhead indicates mossy fibers from infected granule cells. Scale bar, 500 μm.

(B) Confocal micrographs of infected dentate gyrus areas, showing massive extinction of KCC2 expression in KCC2 knockdown neurons. Dotted line: *st. granulosum*. Neurons expressing shNT, but not shKCC2 (arrows) show pericellular KCC2 immunostaining, as do neighboring uninfected cells (arrowheads). Scale bar, 50 μm.

(C) Western blot from 4 independent hippocampal cultures infected with the same lentiviruses (LVs) as in (A) and (B), expressing either shNT or shKCC2. Bottom: summary graph shows KCC2 immunofluorescence normalized to Tuj1.

(D) Representative currents following Rubi-GABA somatic uncaging (flash, dotted line) recorded in gramicidin perforated-patch configuration during incremental voltage steps and corresponding current-potential (I-V) curves. E_{GABA} is interpolated from the 4 points around reversal.

(E) Summary data (shNT: n = 12 cells, 6 rats; shKCC2: n = 14 cells, 6 rats) show depolarized E_{GABA} upon KCC2 suppression. The resting membrane potential (V_{rest}) is also depolarized, resulting in no significant change in the driving force of GABAergic currents. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001.

(F) 4-s recordings of mIPSCs from granule cells expressing shNT (black) or shKCC2 (blue).

(G) Summary data from shNT (n = 13 cells, 2 rats) and shKCC2 (n = 14 cells, 2 rats) showing no changes in mIPSCs amplitude (left; p = 0.42) or frequency (right; p = 0.27).

inward and outward rectifiers (Lesage and Lazdunski, 2000; Ketchum et al., 1995). We therefore tested whether currents carried by K2P channels may be reduced in KCC2 knockdown neurons. Bath application of bupivacaine (100 μM), a non-selective K2P channel antagonist significantly reduced potassium currents in control neurons, but not in KCC2 knockdown neurons (Figure 2G). Moreover, bupivacaine abolished the difference in resting membrane potential (−77.3 ± 1.9 versus −81.0 ± 1.5 mV; Mann-Whitney test with Bonferroni correction; p = 1; Figure 2J) and input resistance (998.7 ± 118.6 versus 1,343.1 ± 207.4 MΩ; Mann-Whitney test with Bonferroni correction; p = 1) between KCC2 knockdown and control granule cells. Together, these results demonstrate that chronic KCC2 suppression increases neuronal excitability primarily through regulation of an outwardly rectifying leak potassium conductance.

Trek-2 and Task-3 are the most prominent outwardly rectifying K2P in dentate gyrus granule cells (Aller and Wisden, 2008; Marinc et al., 2014; Talley et al., 2001). Immunohistofluorescence imaging of Trek-2, however, revealed a predominant expression in mossy fibers (Figure S3) with little or no somato-dendritic expression, suggesting Trek-2 may not prominently contribute to granule cell resting membrane potential and membrane conductance. Conversely, Task-3 expression was primarily observed in granule cell somata and dendrites (Figure S3). We therefore examined whether Task-3 protein expression in granule cells might be affected by chronic KCC2 suppression.

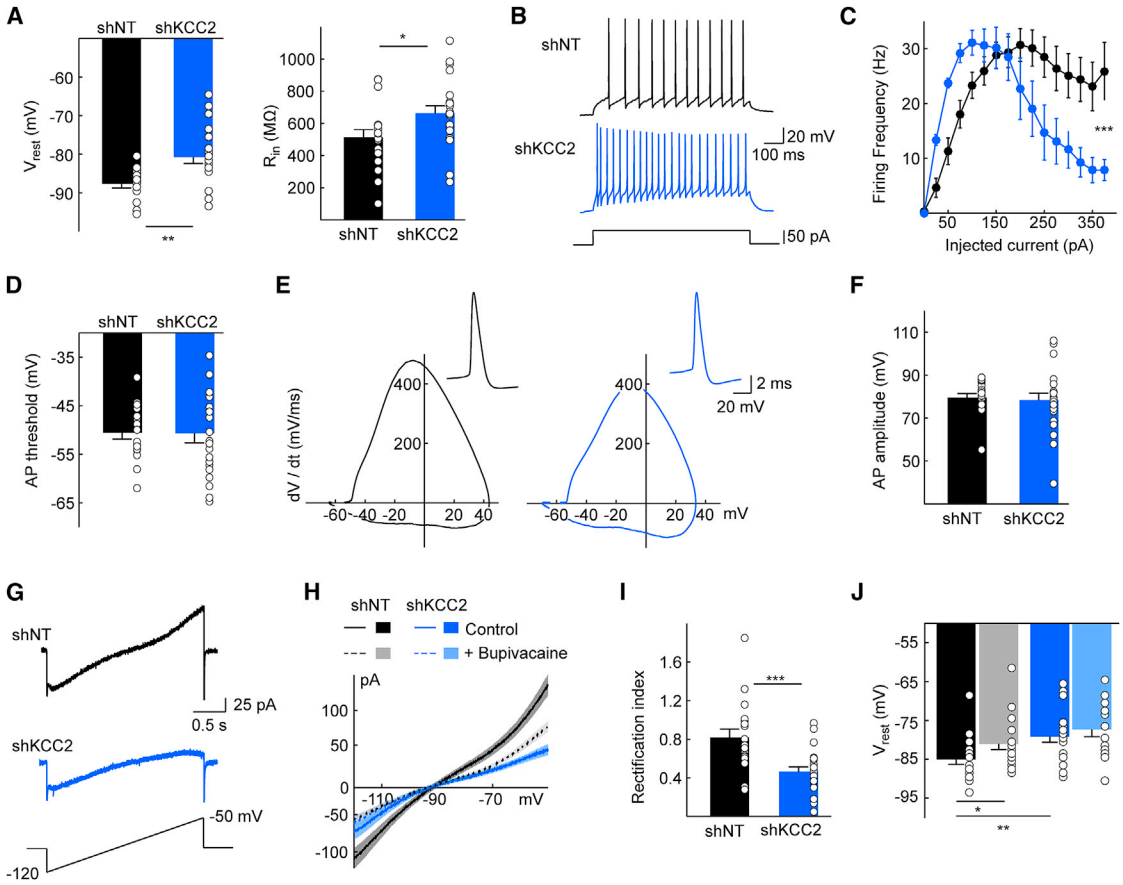


Figure 2. Increased Excitability upon KCC2 Extinction Reflects Downregulation of a Leak Potassium Conductance

(A) Summary graphs of membrane properties of granule cells expressing shNT (n = 18 cells, 5 rats) or shKCC2 (n = 21 cells, 7 rats) recorded in whole-cell patch clamp mode in the presence of synaptic transmission blockers. KCC2 knockdown resulted in depolarized membrane potential and increased input resistance.

(B) Individual traces in both conditions for a depolarizing current pulse of 50 pA.

(C) Input-output curve representing firing frequency as a function of injected current for all cells.

(D) Action potential threshold was determined as the voltage for which derivative of the signal exceeded 15 mV/ms and was not different between conditions.

(E) Individual phase plots of action potentials (insets), showing no change upon KCC2 suppression.

(F) The amplitude of action potentials was also unchanged in KCC2-knockdown cells.

(G) Representative potassium currents recorded during a voltage ramp in the presence of synaptic transmission blockers and TTX.

(H) Summary plots of mean currents in cells expressing shNT (n = 18 cells, 5 rats) versus shKCC2 (n = 21 cells, 7 rats). Bath application of bupivacaine (100 μM) reduced potassium currents only in control cells (shNT: n = 16 cells, 3 rats; shKCC2: n = 19 cells, 5 rats).

(I) Rectification index plot, defined as the ratio of potassium-mediated currents at −60 versus −120 mV.

(J) The difference in V_{rest} between control and KCC2-knockdown neurons is almost entirely suppressed by bath application of bupivacaine (100 μM). *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001.

Immunofluorescence confocal imaging indeed revealed a reduced pericellular Task-3 expression in KCC2 knockdown as compared with control granule cells (Figure 3A). We then investigated the mechanisms underlying Task-3 downregulation upon KCC2 silencing. KCC2 has been shown to interact with a variety of proteins, including some that regulate KCC2 membrane expression (Ivakine et al., 2013; Mahadevan et al., 2017; Wright et al., 2017) or, conversely, are regulated through direct interaction with KCC2 (Chevy et al., 2015; Llano et al., 2015). We therefore asked whether KCC2 might also interact with Task-3 channels and thereby influence their membrane expression and/or function. Co-immunoprecipitation assays from adult rat hippocampal homogenates showed that anti-Task-3 antibodies pulled down KCC2, indicating an interaction between the endogenous proteins in hippocampal neurons (Figure 3B). In order to characterize KCC2-Task-3 interaction further, we co-immunoprecipitated exogenously expressed FLAG-tagged KCC2 and human influenza hemagglutinin (HA)-tagged Task-3 in HEK293 cells. In lysates from double-transfected cells, anti-HA antibodies pulled down FLAG-KCC2 together with HA-Task-3, and anti-FLAG antibodies pulled down HA-Task-3 and FLAG-KCC2 (Figure 3C). However, overexpressed HA-tagged GFP failed to interact with KCC2 in a similar assay (Figure 3C). We then tested whether interaction with KCC2 may influence Task-3 channel expression. HA-Task-3 was expressed in Neuro-2A cells either alone or together with FLAG-KCC2, and HA-Task-3 expression was

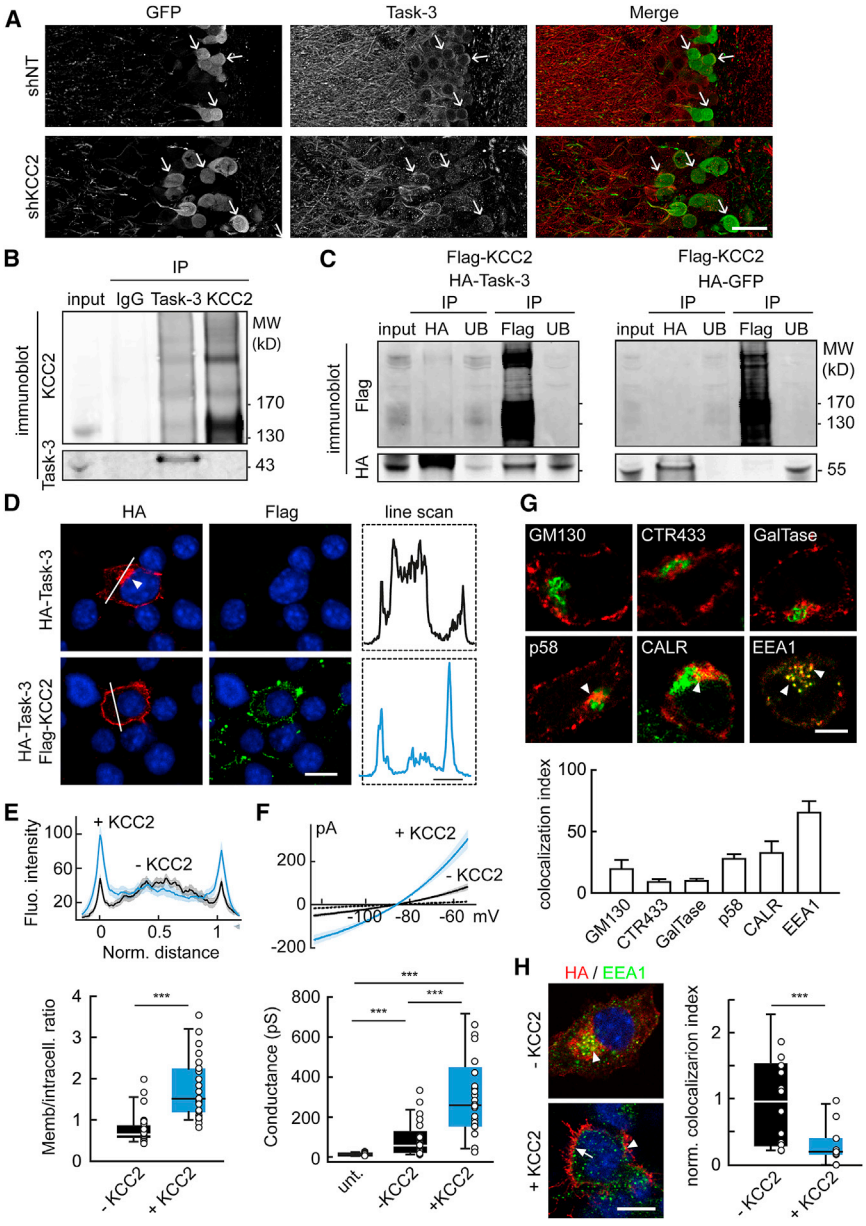


Figure 3. KCC2 Interacts with Task-3 and Promotes Its Membrane Expression

(A) Confocal micrographs of infected dentate gyrus, showing decreased Task-3 pericellular immunostaining in KCC2 knockdown versus control granule cells. Scale bar, 20 μm.

(B) Immunoblot of coIP samples from adult rat hippocampus extracts. Solubilized membrane homogenates (input) were immunoprecipitated with Task-3, KCC2, or control immunoglobulin G (IgG) antibodies. Eluates from immunoprecipitations (IP fractions) were then probed for both Task-3 and KCC2. Representative example of three independent replicates is shown.

(C) Immunoblot of the immunoprecipitates from HEK293 cell homogenates coexpressing FLAG-tagged KCC2 and HA-tagged Task-3 (left) or HA-tagged GFP (right). Immunoprecipitation using FLAG antibodies pulled down Task-3, but not GFP. Conversely, immunoprecipitation with HA antibodies precipitated FLAG-KCC2 only in HA-Task-3-expressing cells. Representative example of three independent experiments is shown.

(D) Representative confocal fluorescent micrographs of Neuro-2a cells transfected with either HA-Task-3 alone (top) or HA-Task-3 together with FLAG-KCC2 (bottom). Note intracellular accumulation of HA immunostaining in absence of FLAG-KCC2 (arrowhead). Scale bar, 10 μm. Fluorescence intensity of HA staining across the cell membrane and cytoplasm was analyzed along the white line shown on the micrographs and plotted in dotted insets (right). Scale bar, 5 μm.

(E) Averaged and scaled cross-section intensity plots from all cells (HA-Task-3, n = 24; HA-Task-3+FLAG-KCC2, n = 27; 3 independent experiments) reveal intracellular accumulation of Task-3 in absence of KCC2, as evidenced by the decreased ratio of pericellular to intracellular intensity (bottom).

(F) Averaged plots of leak potassium currents versus voltage recorded in Neuro-2a cells either untransfected (dotted line) or expressing mGFP together with HA-Task-3 alone (black line) or in combination with FLAG-KCC2 (blue line). n = 15, 25, and 25 cells, respectively, from 2 independent experiments.

(G) Top: representative confocal fluorescent micrographs of Neuro-2a cells expressing HA-Task-3 either alone or with the ERGIC marker p58-GFP or the Golgi-resident recombinant enzyme GalTase-GFP. Cells were immunostained for HA (red) and markers of either *cis*-Golgi (GM130), medial Golgi (CTR433), endoplasmic reticulum (calregulin [CALR]), or early endosomes (EEA1, all in green). Arrowheads indicate colocalization of immunofluorescence between HA and the corresponding marker. Scale bar, 5 μm. Bottom: summary graph represents the colocalization index of HA immunofluorescence with each of the above markers (n = 5–20 cells for each marker; see STAR Methods).

(H) Left: representative confocal fluorescent micrographs of Neuro-2a cells expressing HA-Task-3 with or without FLAG-KCC2 and immunostained for HA (red), EEA1 (green), and DAPI (blue). Note the significant colocalization in cells lacking KCC2 (arrowheads), but not cells expressing KCC2, where HA immunofluorescence is mostly pericellular (arrow). Scale bar, 10 μm. Right: summary graph of HA and EEA1 colocalization in the absence (black) or presence (blue) of FLAG-KCC2. n = 15 and 11 cells, respectively, from 2 independent experiments. ***$p < 0.001$.

tested by immunostaining and confocal imaging. In the absence of KCC2, HA-Task-3 expression at plasma membrane was reduced and accumulated intracellularly (Figure 3D), with a reduced membrane to intracellular intensity ratio in cells lacking KCC2 (0.7 ± 0.1 versus 2.5 ± 0.3; Mann-Whitney; $p = 1.6 \times 10^{-7}$; Figures 3D and 3E). Consistent with reduced Task-3 membrane expression, leak potassium conductance recorded from Neuro-2a cells transfected with HA-Task3 alone were significantly smaller than in cells co-expressing FLAG-KCC2 (87.0 ± 17.3 versus 319.8 ± 45.8 pS; Mann-Whitney; $p = 2.4 \times 10^{-5}$;

Figure 3F). Immunostaining or co-expression of sub-cellular compartment markers in Neuro-2A expressing HA-Task-3 alone revealed preferential accumulation of Task-3 proteins in early endosomes, as detected by colocalization of HA and early endosome antigen 1 (EEA1) immunofluorescence (Figure 3G). HA immunofluorescence also revealed some accumulation in the endoplasmic reticulum and the endoplasmic reticulum Golgi intermediate compartment (ERGIC), as identified by calregulin immunostaining and p58GFP expression, respectively, whereas very little colocalization was observed with markers of the Golgi complex GM130 (*cis*), CTR433 (median), and GalTase (Figure 3G). Finally, co-expression of HA-Task-3 together with KCC2 significantly reduced Task-3 colocalization with EEA1 by about 70% (Mann Whitney; $p = 3.6 \times 10^{-5}$; Figure 3H), suggesting KCC2 may influence Task-3 function at least in part through regulation of its membrane recycling.

We next asked how reduced leak conductance and enhanced excitability upon KCC2 suppression might affect EPSP/spike coupling in granule cells. Previous work showed that KCC2 knockdown in hippocampal neurons leads to reduced synaptic strength at glutamatergic inputs (Gauvain et al., 2011). Enhanced intrinsic excitability may then act as a homeostatic compensatory mechanism for reduced synaptic excitation. We tested this hypothesis by first comparing miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs). As previously reported, KCC2 knockdown granule cells showed a ~20% decrease in mEPSC amplitude (5.1 ± 0.4 versus 6.5 ± 0.3 pA; Mann-Whitney; $p = 0.0009$; Figures 4A and 4B) with no significant change in their mean frequency (1.6 ± 0.4 versus 1.8 ± 0.4 Hz; Mann-Whitney; $p = 0.09$; Figures 4A and 4B) compared to control cells. From these recordings, waveforms of quantal currents were derived, fit, and used as a current command in current-clamp recordings from KCC2 knockdown versus control granule cells maintained at their resting membrane potential (Figure 4C). Although the efficacy of excitatory inputs was reduced in KCC2 knockdown neurons compared to control, enhanced intrinsic excitability overcompensated this reduction, leading to enhanced EPSP/spike coupling. Thus, KCC2 knockdown neurons fired action potentials from ~40 simultaneous quanta, whereas firing of control neurons required at least 60 quanta (Figure 4C; repeated-measures ANOVA; $F_{20,500} = 4.83$; $p = 0.0374$). In addition, synaptic integration during high-frequency (>50 Hz) trains of EPSCs was also facilitated in KCC2 knockdown granule cells, owing to increased membrane resistance compared to control cells (Figure 4D).

Perforant path input to the dentate gyrus provides synaptic excitation to granule cells as well as feedforward inhibition that contributes to their sparse activation by entorhinal afferents (Witter, 2007). We explored EPSP/spike coupling of perforant path inputs in a more physiological setting by recording evoked field EPSP (fEPSP) and population spike in a densely infected area of the granular layer, upon stimulation of perforant path inputs. In KCC2 knockdown slices, fEPSP/population spike coupling was increased by ~47% compared to control slices (2.0 ± 0.3 versus 1.3 ± 0.2 ms^{-1}; t test; $t_{29} = 2.18$; $p = 0.0374$; Figure 4F). This result further supports that increased excitability upon KCC2 knockdown is not homeostatic but instead acts to promote granule cell recruitment by entorhinal afferents. Importantly, bath application of the GABAAR antagonist picrotoxin (100 μM) increased the amplitude of population spike similarly in control slices (1.1 ± 0.2 mV versus 0.9 ± 0.1 mV; paired t test; $t_{13} = 3.33$; $p = 0.0054$) and KCC2 knockdown slices (1.2 ± 0.2 mV versus 0.8 ± 0.1 mV; paired t test; $t_{15} = 4.29$; $p = 0.0006$; Figure 4G). These results suggest that GABAergic transmission, although depolarizing in dentate granule cells (Staley and Mody, 1992; Figure 1E), remains shunting and inhibitory, independent of KCC2 expression. Therefore, KCC2 downregulation in these cells promotes their recruitment by entorhinal afferents primarily through enhanced excitability and EPSP/spike coupling rather than altered GABA signaling.

The dentate gyrus is often considered as a filter or a gate for activity propagation from the entorhinal cortex to the hippocampus (Hsu, 2007), in particular owing to dentate granule cells' sparse firing. Enhanced EPSP/spike coupling in dentate granule cells upon KCC2 knockdown may then act to increase their excitatory drive by entorhinal afferents and thereby alter hippocampal rhythmogenesis. We explored this hypothesis using chronic intrahippocampal recordings from rats injected with lentivirus expressing either shKCC2 or shNT (n = 7 and 5, respectively; Figures 5A and 5B). In these animals, about 40%–70% granule cells were infected over 1 or 2 mm around the injection site (Figures 5B and S4A–S4C). Unlike a recent study using a similar approach (Chen et al., 2017), we did not observe spontaneous seizures in any of these animals. Susceptibility to pilocarpine-induced seizures was also unaffected by KCC2 knockdown in the dorsal dentate gyrus (Figures S4D–S4F). Chronic, intrahippocampal recordings using linear silicon probes did not reveal interictal spikes or fast ripples (Figures S4G and S4H) that could represent hallmarks of an epileptic hippocampal network, even in the absence of behavioral symptoms (Bragin et al., 1999). These results indicate that focal KCC2 knockdown in 40%–70% dorsal dentate granule cells is not sufficient to trigger or promote epileptiform activity.

Further analysis of hippocampal rhythmogenesis during various behavioral states, however, revealed significant alterations upon KCC2 knockdown in the dentate gyrus. Thus, although theta-band activity recorded during exploration and rapid-eye movement (REM) sleep was not significantly affected (Figure S5), we observed a specific increase in both the amplitude (Kolmogorov-Smirnov; $p < 0.001$; Figure 5F) and frequency (Kolmogorov-Smirnov; $p < 0.001$; Figure 5F) of dentate spikes during slow-wave sleep (SWS). Dentate spikes are sharp hilar local field potential (LFP) events associated with rest (Bragin et al., 1995) that arise from a transient increase in the excitatory drive from the entorhinal cortex, as revealed by current source density analysis (Figures 5D and 5E). Our results suggested these changes in dentate spike activity resulted primarily from increased excitability of dentate granule cells. Restoring granule cell excitability independently of chloride export and GABA signaling was then predicted to rescue dentate spike activity. We tested this prediction by co-injecting animals with adeno-associated viruses expressing the inhibitory receptor hM4D(Gi) (Roth, 2016) and either shNT or shKCC2. Using this approach, all granule cells expressing GFP also expressed hM4D(Gi), thereby enabling selective silencing of neurons expressing shRNA sequences (Figures 5G and 5H). We first verified that

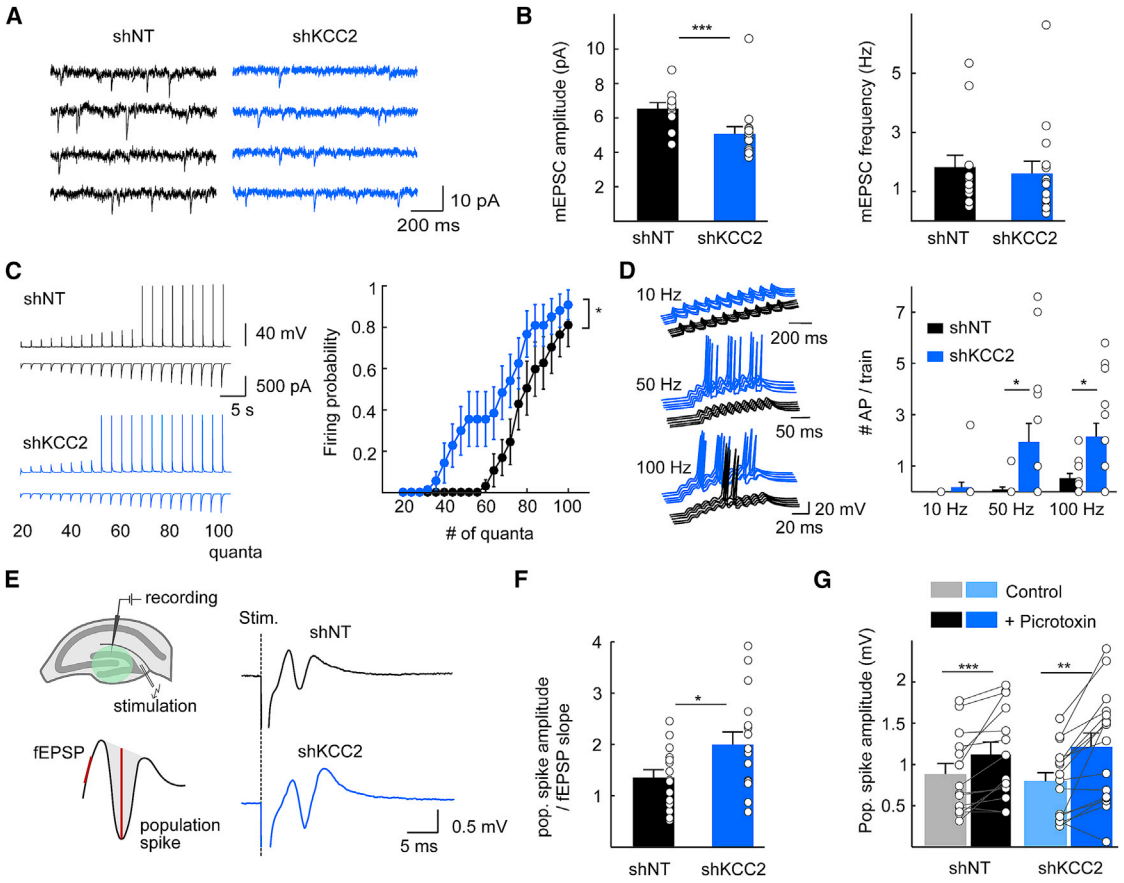


Figure 4. KCC2 Suppression Increases EPSP/Spike Coupling in Dentate Granule Cells

(A) 4-s recordings of mEPSCs from infected granule cells expressing shNT (black; n = 13 cells, 3 rats) or shKCC2 (blue; n = 15 cells, 3 rats).

(B) Summary data showing reduced mEPSC amplitude (left), but not frequency (right).

(C) Left: representative recordings of current clamp recordings (top) from granule cells kept at their resting membrane potential upon somatic injection of multiples of scaled, mEPSC waveforms of increasing amplitude (bottom). Right: summary plots of all data (shNT, n = 13 cells, 2 rats; shKCC2, n = 15 cells, 2 rats) show enhanced EPSP/spike coupling in KCC2 knockdown neurons.

(D) Neurons were kept at −87 mV in current clamp mode and trains of 120 pA mEPSCs (about 20× quantal size) were injected as in (C) at various frequencies. Left: representative traces for trains of 10 EPSC waveforms at 10, 50, and 100 Hz. Right: summary graphs show enhanced firing probability in KCC2 knockdown granule cells (shNT, n = 13 cells, 2 rats; shKCC2, n = 15 cells, 2 rats).

(E) Left: experimental paradigm to test synaptically evoked EPSP/spike coupling (top). fEPSP and population spike amplitudes were measured as shown (bottom). Right: average of 10 consecutive responses recorded at 0.1 Hz is shown.

(F) Data from n = 15 slices infected with shNT (6 animals) and 16 slices infected with shKCC2 (6 animals) confirmed increased coupling of fEPSP to population spike.

(G) Bath application of the GABAAR blocker picrotoxin resulted in increased amplitude of the population spike in both conditions, indicating GABA transmission was functionally inhibitory. *p < 0.05.

hM4D(Gi) activation was sufficient to hyperpolarize transduced granule cells *in vitro*. Indeed, in whole-cell recordings from transduced neurons, bath application of the hM4D(Gi) ligand CNO (10 μM) induced a hyperpolarizing shift of V_{rest} by −5.7 ± 1.4 mV (paired t test; $t_5 = 4.36$; p = 0.0073; Figure 5I). As in lentivirus-infected animals, adeno-associated virus (AAV)-mediated KCC2 knockdown in the dorsal dentate gyrus increased the amplitude and reduced the frequency of dentate spikes during SWS (n = 4 control and 3 KCC2 knockdown rats; Kolmogorov-Smirnov; p < 0.001; Figure 5J). Following systemic CNO injection, the amplitude of dentate spikes in animals injected with shKCC2 was reduced to levels below those of saline-treated control animals (Figure 5J). Similarly, CNO injection reduced the frequency of dentate spikes in both KCC2 knockdown and control animals (Kolmogorov-Smirnov; p < 0.001; Figure 5J). Together, our data demonstrate that KCC2 suppression in dentate granule cells leads to altered dentate gyrus activity through a reduced Task-3-mediated potassium conductance and a subsequent increase in neuronal excitability, independent of GABA signaling.

DISCUSSION

Cation-chloride cotransporters (CCCs) are essential to neuronal chloride homeostasis. Changes in their expression level in the

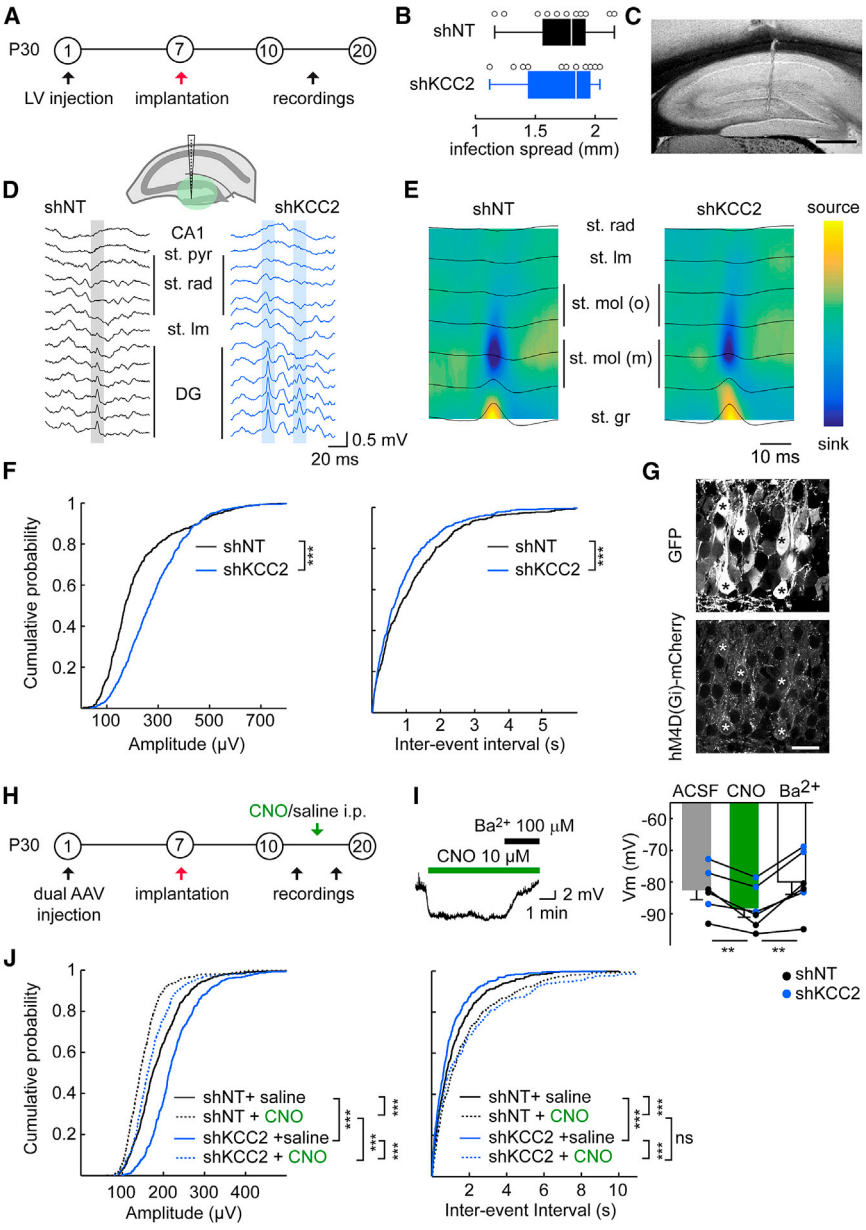


Figure 5. KCC2 Suppression Alters Dentate Gyrus Activity Primarily through Increased Neuronal Excitability

(A) Experimental timeline.

(B) Longitudinal spread of the viral infection determined at the end of each experiment (shNT: n = 5 rats; shKCC2: n = 7 rats; p = 0.45).

(C) Macroscope differential interference contrast (DIC) micrograph revealing probe localization (vertical scar). Scale bar, 250 μm.

(D) Top: representative recordings during non-REM sleep showing dentate spikes (highlighted in gray: shNT; blue: shKCC2).

(E) Averaged current source density plots of at least 100 events per animal reveal similar profiles between groups and allow identification of granule cell layer (presence of a source).

(F) Cumulative amplitude (left) and inter-event intervals (right) histograms of 140 randomly selected events per animal.

(G) Single plane confocal micrographs confirmed most granule cells were co-infected with shRNA^{+}GFP and hM4D(Gi)-mCherry (stars). Scale bar, 20 μm.

(H) Experimental timeline for rescue experiments with DREADD silencing as above.

(I) Left: example current clamp recording of a dentate granule cell expressing shNT and hM4D(Gi) receptor, showing hyperpolarization of the membrane potential upon CNO (10 μM) bath application. Application of Ba^{2+} (100 mM $BaCl_2$) completely blocks CNO-induced hyperpolarization. Right: summary data from 3 cells expressing shNT and 3 cells expressing shKCC2 together with hM4D(Gi). All cells were hyperpolarized following CNO application and repolarized upon Ba^{2+} application. **p < 0.01.

(J) Cumulative amplitude (left) and inter-event intervals (right) histograms from 185 randomly selected events per animal (shNT n = 4 rats; shKCC2 n = 3 rats). ***p < 0.001.

developing brain are associated with changes in the polarity of GABA transmission (Rivera et al., 1999), and altered CCC function or expression is observed in a variety of neurological and psychiatric conditions (Kahle et al., 2008; Kaila et al., 2014). In the pathology, KCC2 downregulation is often assumed to primarily affect GABA signaling and thereby promote hyperexcitability (Ben-Ari, 2017; Boulenguez et al., 2010; Buchin et al., 2016; Dargaei et al., 2018; Gagnon et al., 2013; Huberfeld et al., 2007). However, this hypothesis was not tested in isolation from other, potentially confounding pathological factors. Here, we directly tested the impact of a chronic KCC2 knockdown on the cellular and synaptic properties of hippocampal neurons as well as on network activity associated with behavior. We demonstrate KCC2 knockdown in dentate granule cells has little effect on GABA signaling at rest but instead increases their excitability due to reduced expression of Task-3 potassium channels. This increased excitability strengthens EPSP/spike coupling in granule cells, thereby acting to enhance their recruitment by entorhinal afferents. This in turn results in altered local rhythmogenesis that was normalized by restoring granule cell intrinsic excitability. Thus, KCC2 downregulation affects a variety of synaptic and intrinsic properties in hippocampal neurons beyond the mere control of GABA transmission and concurs to perturb hippocampal activity.

KCC2 interacts with a variety of transmembrane as well as intracellular partners, including postsynaptic receptors (Mahadevan et al., 2014; Wright et al., 2017; Ivakine et al., 2013), actin-related proteins (Chevy et al., 2015; Li et al., 2007; Llano et al., 2015), and others involved in protein trafficking and recycling (Mahadevan et al., 2017). Although these interactions are

most often considered with regard to KCC2 expression or function, they also influence the function of KCC2 partners (Chevy et al., 2015; Llano et al., 2015). Here, we identified the leak potassium channel Task-3 (KCNK*9*) as a KCC2 interactor in hippocampal neurons. We show Task-3 membrane expression and function requires KCC2 co-expression both in neurons and in heterologous cells. Immunocytochemical analysis revealed predominant accumulation of Task-3 proteins in early endosomes and, to a lesser extent, endoplasmic reticulum (ER) and ERGICs. This suggests that, at least in heterologous cells overexpressing recombinant Task-3, membrane expression of the protein is limited by endocytosis and/or ER sequestration. Regulation of Task-3 channel expression through endocytosis was recently reported upon stress-kinase activation (Cornell and Toyo-Oka, 2017). Whether KCC2 co-expression also reduced ER retention was not specifically examined here. However, it is remarkable that several members of the *YWHA* family encoding 14-3-3 proteins were recently identified as putative KCC2 partners (Mahadevan et al., 2017). 14-3-3 are adaptor proteins shown to bind to and influence the membrane traffic in particular of both Task-1 and Task-3 channels (Zuzarte et al., 2009). Thus, phosphorylation-dependent binding of 14-3-3 suppresses coatomer protein I (COPI)-mediated ER retention of Task channels (Kilisch et al., 2016; Zuzarte et al., 2009). KCC2 binding to both 14-3-3 and Task-3 may therefore influence their interaction, thereby preventing COPI-mediated intracellular sequestration of the channels.

Hippocampal granule cells express several leak potassium channels (Aller and Wisden, 2008), including Twik-1 and 2 (KCNK1 and KCNK6), Task-3 (KCNK9; Zhang et al., 2016), and Trek-2 (KCNK10). Our pharmacological and biophysical data (Figures 2G–2J) suggest KCC2 knockdown mostly affects bupivacaine-sensitive, outwardly rectifying channels, therefore limiting the potential targets to Task-3 and Trek-2 channels. We show Trek-2 are expressed mostly in mossy fibers and are therefore unlikely to significantly contribute to granule cell membrane resistance. Therefore, we mostly explored the impact of KCC2 knockdown on Task-3 channel expression and function. Nevertheless, it should be noted that K2P channels can form functional heterodimers (Levitz et al., 2016), and we cannot exclude that KCC2 may be part of a macromolecular complex involving other K2P channel subtypes. Finally, K2P channels are sensitive to both intracellular and extracellular pH (Noël et al., 2011). Because chloride gradients are used to control intracellular pH and KCC2 can effectively transport ammonium ions (Titz et al., 2006), it could be expected that K2P function may be affected upon KCC2 knockdown due to changes in either intracellular or extracellular pH. This, however, seems unlikely to contribute to the reduced leak potassium currents we observed as (1) our whole-cell recordings were performed with HEPES-buffered intracellular solution (Figure 2), (2) this effect was not observed in neighboring uninfected granule cells, and (3) prolonged application of the KCC2 antagonist VU0463271 had no effect on granule cell membrane potential or membrane resistance (Figure S1).

In mature neurons, KCC2 plays a prominent role in maintaining transmembrane chloride gradients, thereby influencing ion flux through the chloride-permeable GABAA receptor channels. Thus, KCC2 pharmacological blockade (Ivakine et al., 2013; Wright et al., 2017), genetic ablation (Seja et al., 2012; Hübner et al., 2001), knockdown (Pellegrino et al., 2011), or activity-dependent modulation (Wright et al., 2017; Fiumelli et al., 2005; Heubl et al., 2017; Lee et al., 2010) all result in a depolarization of the reversal potential of GABAAR-mediated currents (E_{GABA}). Consistent with these observations, we found that chronic KCC2 knockdown in dentate granule cells resulted in a depolarizing shift of E_{GABA} by about 9 mV. This effect was, however, almost fully compensated by a depolarization of their resting membrane potential (V_{rest}) of about the same magnitude (Figure 1), resulting in a driving force of GABAAR currents that was virtually unaffected at rest. This effect was not specific of dentate gyrus granule cells, as it was observed also in CA1 pyramidal neurons (Figure S2). Despite the importance of the membrane potential in setting the efficacy and polarity of GABA signaling, only one study investigated the effect of KCC2 suppression on V_{rest} in cerebellar neurons (Seja et al., 2012). Thus, conditional KCC2 ablation resulted in a depolarization of V_{rest} that also compensated the shift in E_{GABA} in granule cells, but not Purkinje cells. Interestingly, hippocampal and cerebellar granule cells as well as CA1 pyramidal cells strongly express Task-3 channels (Marinc et al., 2014; Ramadoss et al., 2008), whereas Purkinje cells predominantly express Task-1 and Task-5 (Ramadoss et al., 2008; Karschin et al., 2001). Thus, differential expression of leak potassium channels may underlie cell-specific effects of KCC2 knockdown on resting membrane potential and the driving force of GABAAR currents.

KCC2 downregulation has often been linked to epileptogenesis. KCC2 expression is reduced in several animal models of experimental epilepsy, including kindling (Rivera et al., 2004), traumatic brain injury (Bonislawski et al., 2007), and pilocarpine-induced *status epilepticus* (Kourdougli et al., 2017). Moreover, genetic studies identified loss-of-function mutations in the SLC12A5 gene encoding KCC2 in families with idiopathic epilepsy (Kahle et al., 2014; Merner et al., 2015; Saitsu et al., 2016). Finally, lack of KCC2 expression was associated with depolarized E_{GABA} in 20%–30% principal neurons in the subiculum resected from temporal lobe epilepsy patients (Huberfeld et al., 2007), as well as in human peritumoral neocortical slices (Pallud et al., 2014). This work suggested that KCC2 downregulation may be causal to the pathological, interictal activity recorded *in vitro*, and a modeling study supported such conclusion (Buchin et al., 2016). Our experiments allowed us to test this hypothesis. Despite a high density and widespread infection in most of the dorsal dentate gyrus, we did not, however, find any sign of epileptiform activity in rats with suppressed KCC2 expression (Figure S4). Thus, these animals did not show spontaneous seizures, and intrahippocampal recordings around the infected area failed to reveal interictal discharges or fast ripples that occur between seizures both in patients and in animal models of focal epilepsy (Lévesque et al., 2018; Menendez de la Prida and Trevelyan, 2011). Susceptibility to pilocarpine-evoked *status epilepticus* was also unaffected by KCC2 knockdown. Our data therefore argue against a causal link between KCC2 downregulation and the emergence of epileptiform activity, at least in the dentate gyrus. Several arguments may help resolve this apparent discrepancy between our results and

data from human epileptic tissue and animal models. First, epileptic networks undergo a number of physio-pathological alterations that may contribute to or promote epileptiform activities, including cell death, axonal sprouting, inflammation, as well as changes in synaptic and intrinsic neuronal membrane properties (Goldberg and Coulter, 2013). Thus, it is interesting to note that KCC2 suppression failed to produce epileptiform activity in a subicular model network unless extracellular potassium was raised to a non-physiological range, thereby increasing neuronal excitability (Buchin et al., 2016). In addition, our data show that depolarized E_{GABA} upon KCC2 suppression is fully compensated by depolarized V_{rest}, such that KCC2 knockdown neurons are more excitable, although GABA signaling remains inhibitory. Depolarizing GABAergic responses may then require further depolarization of E_{GABA}, for instance through concomitant upregulation of the NKCC1 transporter, as observed in temporal lobe epilepsy models (Kourdougli et al., 2017; Wang et al., 2017) as well as in the cortex and hippocampus from epileptic patients (Pallud et al., 2014; Sen et al., 2007).

Our results show that KCC2 downregulation in the dentate gyrus is nevertheless sufficient to alter local rhythmogenesis. Thus, we report a specific increase in the amplitude and frequency of dentate spikes upon KCC2 knockdown (Figure 5). Dentate spikes are population activities that occur in the dentate gyrus during sleep and immobility and are thought to represent synchronous activation of granule cells by entorhinal afferents (Bragin et al., 1995). Although granule cells fire sparsely under physiological conditions, KCC2 suppression and subsequent increased excitability promoted their recruitment by entorhinal afferents. Thus, fewer simultaneous quantal EPSCs were required for firing KCC2 knockdown granule cells, and they fired more action potentials than control cells during high-frequency trains of afferent inputs (Figures 4C and 4D). Several arguments support that these effects were mostly independent of KCC2-induced alterations in GABA transmission. First, GABA transmission was still inhibitory upon KCC2 suppression, as indicated by the unchanged driving force of GABAAR-mediated currents (Figure 1) and the excitatory effect of picrotoxin on evoked population spikes (Figure 4G). Second, increased dentate spike amplitude was fully compensated by chemogenetic hyperpolarization of KCC2 knockdown neurons (Figure 5). Because GABAAR activation is depolarizing in dentate granule cells (Staley and Mody, 1992), hM4D(Gi)-induced hyperpolarization rescued V_{rest} in infected granule cells but further enhanced the depolarizing nature of GABA transmission. If GABA signaling was involved in the increased dentate spike amplitude and frequency, hM4D(Gi) silencing would then be expected to worsen, not rescue this phenotype.

Together, our work reveals the unexpected effects of a chronic downregulation of KCC2 expression in an intact network. We show these effects are diverse but primarily involve increased neuronal excitability, not reversed GABA signaling. They lead to altered network activity without, however, promoting seizures. Thus, KCC2 suppression in the dentate gyrus primarily affects dentate spike activity with no detectable effect on theta-band activity throughout the hippocampal formation (Figure S5). This rather subtle phenotype may still be of physiopathological relevance for disorders associated with KCC2 downregulation. Dentate spikes coincide with periods of stronger gamma-band activity coherence between hippocampus and cortex and are temporally correlated to the power of sharp-wave ripples (Headley et al., 2017). Because both dentate spikes (Nokia et al., 2017) and sharp-wave ripples (Girardeau et al., 2009) have been associated with memory consolidation in hippocampal-dependent learning, we predict KCC2 suppression in the pathology may impact cognitive performances through a combination of GABA-dependent and independent mechanisms. Our results suggest therapeutic strategies aiming to either restore neuronal chloride homeostasis by blocking NKCC1 function (Ben-Ari, 2017) and neuronal excitability by targeting leak potassium channels (Loucif et al., 2018) or to stabilize KCC2 membrane expression (Gagnon et al., 2013; Liabeuf et al., 2017) may best compensate for altered network activity and associated behavioral or cognitive deficits.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- LEAD CONTACT AND MATERIALS AVAILABILITY
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
  - Animals
  - HEK293 and Neuro-2a cultures
  - Primary hippocampal cultures
- METHOD DETAILS
  - Virus and constructs
  - Stereotaxic viral injection and EcoG electrode implantation
  - Intracerebral probe implantation
  - Electrophysiology
  - Biochemistry
  - Immunocytochemistry
  - Immunohistochemistry
  - Behavior and recordings
  - Data analysis
  - Electrocorticogram (EcoG) recordings and epilepsy induction
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS
  - Statistics

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information can be found online at https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.06.001.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Q. Chevy for sharing original observations related to the present work, X. Marques (Imaging Facility, Institut du Fer à Moulin) for assistance with confocal imaging, and M. Heubl for providing WB analysis of RNAi efficiency. We also thank R. Miles and K. Kaila for critical reading of the manuscript. This work was supported in part by INSERM, Sorbonne Université, as well as the Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM DEQ20140329539 to J.C.P.), the Human Frontier Science Program (RGP0022/2013 to J.C.P. and L.M.d.l.P.), ERANET-Neuron (funded by ANR to J.C.P. and MINECO to L.M.d.l.P.), and the Fondation Française pour la

Recherche sur l'Epilepsie - Fédération pour la Recherche sur le Cerveau (research grant to J.C.P.). M.G. and F.D. were recipients of fellowships from Sorbonne Université, and M.G. was also supported by Fondation pour la Recherche Médicale, as well as an IBRO-InEurope Short Stay Grant. The Poncer lab is affiliated with the Paris School of Neuroscience (ENP) and the Bio-Psy Laboratory of Excellence.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.G., L.M.d.l.P., and J.C.P. designed the research. L.M.d.l.P. and J.C.P. supervised the research. M.G. performed all experiments involving animal surgery, *in vitro* and *in vivo* electrophysiology, immunohistochemistry, and imaging. S.A.A. performed most biochemical assays, immunocytochemistry, and imaging of heterologous cells. F.D. performed some biochemical assays and immunohistochemistry. E.F. and J.C.P. performed experimental epilepsy assays. D.G.-D. and L.M.d.l.P. helped set up *in vivo* electrophysiological recordings and data analysis, and T.I. contributed confocal imaging and quantification. M.G., S.A.A., F.D., and E.F. analyzed the data. M.G. and J.C.P. wrote the paper.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interest.

Received: October 10, 2018
Revised: April 18, 2019
Accepted: May 30, 2019
Published: July 2, 2019

REFERENCES

Aller, M.I., and Wisden, W. (2008). Changes in expression of some two-pore domain potassium channel genes (KCNK) in selected brain regions of developing mice. Neuroscience *151*, 1154–1172.

Ankri, N., Legendre, P., Faber, D.S., and Korn, H. (1994). Automatic detection of spontaneous synaptic responses in central neurons. J. Neurosci. Methods *52*, 87–100.

Banerjee, A., Rikhye, R.V., Breton-Provencher, V., Tang, X., Li, C., Li, K., Runyan, C.A., Fu, Z., Jaenisch, R., and Sur, M. (2016). Jointly reduced inhibition and excitation underlies circuit-wide changes in cortical processing in Rett syndrome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *113*, E7287–E7296.

Ben-Ari, Y. (2017). NKCC1 Chloride Importer Antagonists Attenuate Many Neurological and Psychiatric Disorders. Trends Neurosci. *40*, 536–554.

Blaesse, P., Airaksinen, M.S., Rivera, C., and Kaila, K. (2009). Cation-chloride cotransporters and neuronal function. Neuron *61*, 820–838.

Bonislawski, D.P., Schwarzbach, E.P., and Cohen, A.S. (2007). Brain injury impairs dentate gyrus inhibitory efficacy. Neurobiol. Dis. *25*, 163–169.

Bormann, J., Hamill, O.P., and Sakmann, B. (1987). Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and gamma-aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones. J. Physiol. *385*, 243–286.

Boulenguez, P., Liabeuf, S., Bos, R., Bras, H., Jean-Xavier, C., Brocard, C., Stil, A., Darbon, P., Cattaert, D., Delpire, E., et al. (2010). Down-regulation of the potassium-chloride cotransporter KCC2 contributes to spasticity after spinal cord injury. Nat. Med. *16*, 302–307.

Bragin, A., Jandó, G., Nádasdy, Z., van Landeghem, M., and Buzsáki, G. (1995). Dentate EEG spikes and associated interneuronal population bursts in the hippocampal hilar region of the rat. J. Neurophysiol. *73*, 1691–1705.

Bragin, A., Engel, J., Jr., Wilson, C.L., Vizentin, E., and Mathern, G.W. (1999). Electrophysiologic analysis of a chronic seizure model after unilateral hippocampal KA injection. Epilepsia *40*, 1210–1221.

Buchin, A., Chizhov, A., Huberfeld, G., Miles, R., and Gutkin, B.S. (2016). Reduced Efficacy of the KCC2 Cotransporter Promotes Epileptic Oscillations in a Subiculum Network Model. J. Neurosci. *36*, 11619–11633.

Caraiscos, V.B., Elliott, E.M., You-Ten, K.E., Cheng, V.Y., Belelli, D., Newell, J.G., Jackson, M.F., Lambert, J.J., Rosahl, T.W., Wafford, K.A., et al. (2004). Tonic inhibition in mouse hippocampal CA1 pyramidal neurons is mediated by alpha5 subunit-containing gamma-aminobutyric acid type A receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *101*, 3662–3667.

Chamma, I., Heubl, M., Chevy, Q., Renner, M., Moutkine, I., Eugène, E., Poncer, J.C., and Lévi, S. (2013). Activity-dependent regulation of the K/Cl transporter KCC2 membrane diffusion, clustering, and function in hippocampal neurons. J. Neurosci. *33*, 15488–15503.

Chen, L., Wan, L., Wu, Z., Ren, W., Huang, Y., Qian, B., and Wang, Y. (2017). KCC2 downregulation facilitates epileptic seizures. Sci. Rep. *7*, 156.

Chevy, Q., Heubl, M., Goutierre, M., Backer, S., Moutkine, I., Eugène, E., Bloch-Gallego, E., Lévi, S., and Poncer, J.C. (2015). KCC2 Gates Activity-Driven AMPA Receptor Traffic through Cofilin Phosphorylation. J. Neurosci. *35*, 15772–15786.

Côme, E., Heubl, M., Schwartz, E.J., Poncer, J.C., and Lévi, S. (2019). Reciprocal Regulation of KCC2 Trafficking and Synaptic Activity. Front. Cell. Neurosci. *13*, 48.

Cornell, B., and Toyo-Oka, K. (2017). 14-3-3 Proteins in Brain Development: Neurogenesis, Neuronal Migration and Neuromorphogenesis. Front. Mol. Neurosci. *10*, 318.

Coull, J.A., Boudreau, D., Bachand, K., Prescott, S.A., Nault, F., Sík, A., De Koninck, P., and De Koninck, Y. (2003). Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. Nature *424*, 938–942.

Dargaei, Z., Bang, J.Y., Mahadevan, V., Khademullah, C.S., Bedard, S., Parfitt, G.M., Kim, J.C., and Woodin, M.A. (2018). Restoring GABAergic inhibition rescues memory deficits in a Huntington's disease mouse model. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *115*, E1618–E1626.

Deidda, G., Parrini, M., Naskar, S., Bozarth, I.F., Contestabile, A., and Cancedda, L. (2015). Reversing excitatory GABAAR signaling restores synaptic plasticity and memory in a mouse model of Down syndrome. Nat. Med. *21*, 318–326.

Delpire, E., Baranczak, A., Waterson, A.G., Kim, K., Kett, N., Morrison, R.D., Daniels, J.S., Weaver, C.D., and Lindsley, C.W. (2012). Further optimization of the K-Cl cotransporter KCC2 antagonist ML077: development of a highly selective and more potent in vitro probe. Bioorg. Med. Chem. Lett. *22*, 4532–4535.

Di Cristo, G., Awad, P.N., Hamidi, S., and Avoli, M. (2018). KCC2, epileptiform synchronization, and epileptic disorders. Prog. Neurobiol. *162*, 1–16.

Fiumelli, H., Cancedda, L., and Poo, M.M. (2005). Modulation of GABAergic transmission by activity via postsynaptic Ca2+-dependent regulation of KCC2 function. Neuron *48*, 773–786.

Gagnon, M., Bergeron, M.J., Lavertu, G., Castonguay, A., Tripathy, S., Bonin, R.P., Perez-Sanchez, J., Boudreau, D., Wang, B., Dumas, L., et al. (2013). Chloride extrusion enhancers as novel therapeutics for neurological diseases. Nat. Med. *19*, 1524–1528.

Gauvain, G., Chamma, I., Chevy, Q., Cabezas, C., Irinopoulou, T., Bodrug, N., Carnaud, M., Lévi, S., and Poncer, J.C. (2011). The neuronal K-Cl cotransporter KCC2 influences postsynaptic AMPA receptor content and lateral diffusion in dendritic spines. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *108*, 15474–15479.

Girardeau, G., Benchenane, K., Wiener, S.I., Buzsáki, G., and Zugaro, M.B. (2009). Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory. Nat. Neurosci. *12*, 1222–1223.

Goldberg, E.M., and Coulter, D.A. (2013). Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural circuit dysfunction. Nat. Rev. Neurosci. *14*, 337–349.

Headley, D.B., Kanta, V., and Paré, D. (2017). Intra- and interregional cortical interactions related to sharp-wave ripples and dentate spikes. J. Neurophysiol. *117*, 556–565.

Heubl, M., Zhang, J., Pressey, J.C., Al Awabdh, S., Renner, M., Gomez-Castro, F., Moutkine, I., Eugène, E., Russeau, M., Kahle, K.T., et al. (2017). $GABA_A$ receptor dependent synaptic inhibition rapidly tunes KCC2 activity via the Cl^--sensitive WNK1 kinase. Nat. Commun. *8*, 1776.

Hsu, D. (2007). The dentate gyrus as a filter or gate: a look back and a look ahead. Prog. Brain Res. *163*, 601–613.

Huberfeld, G., Wittner, L., Clemenceau, S., Baulac, M., Kaila, K., Miles, R., and Rivera, C. (2007). Perturbed chloride homeostasis and GABAergic signaling in human temporal lobe epilepsy. J. Neurosci. *27*, 9866–9873.

Hübner, C.A., Stein, V., Hermans-Borgmeyer, I., Meyer, T., Ballanyi, K., and Jentsch, T.J. (2001). Disruption of KCC2 reveals an essential role of K-Cl cotransport already in early synaptic inhibition. Neuron *30*, 515–524.

Hyde, T.M., Lipska, B.K., Ali, T., Mathew, S.V., Law, A.J., Metitiri, O.E., Straub, R.E., Ye, T., Colantuoni, C., Herman, M.M., et al. (2011). Expression of GABA signaling molecules KCC2, NKCC1, and GAD1 in cortical development and schizophrenia. J. Neurosci. *31*, 11088–11095.

Ivakine, E.A., Acton, B.A., Mahadevan, V., Ormond, J., Tang, M., Pressey, J.C., Huang, M.Y., Ng, D., Delpire, E., Salter, M.W., et al. (2013). Neto2 is a KCC2 interacting protein required for neuronal Cl- regulation in hippocampal neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *110*, 3561–3566.

Jasmin, B.J., Cartaud, J., Bornens, M., and Changeux, J.P. (1989). Golgi apparatus in chick skeletal muscle: changes in its distribution during end plate development and after denervation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *86*, 7218–7222.

Kahle, K.T., Staley, K.J., Nahed, B.V., Gamba, G., Hebert, S.C., Lifton, R.P., and Mount, D.B. (2008). Roles of the cation-chloride cotransporters in neurological disease. Nat. Clin. Pract. Neurol. *4*, 490–503.

Kahle, K.T., Merner, N.D., Friedel, P., Silayeva, L., Liang, B., Khanna, A., Shang, Y., Lachance-Touchette, P., Bourassa, C., Levert, A., et al. (2014). Genetically encoded impairment of neuronal KCC2 cotransporter function in human idiopathic generalized epilepsy. EMBO Rep. *15*, 766–774.

Kahle, K.T., Schmouth, J.F., Lavastre, V., Latremoliere, A., Zhang, J., Andrews, N., Omura, T., Laganière, J., Rochefort, D., Hince, P., et al. (2016). Inhibition of the kinase WNK1/HSN2 ameliorates neuropathic pain by restoring GABA inhibition. Sci. Signal. *9*, ra32.

Kaila, K., Price, T.J., Payne, J.A., Puskarjov, M., and Voipio, J. (2014). Cation-chloride cotransporters in neuronal development, plasticity and disease. Nat. Rev. Neurosci. *15*, 637–654.

Karschin, C., Wischmeyer, E., Preisig-Müller, R., Rajan, S., Derst, C., Grzeschik, K.H., Daut, J., and Karschin, A. (2001). Expression pattern in brain of TASK-1, TASK-3, and a tandem pore domain K(+) channel subunit, TASK-5, associated with the central auditory nervous system. Mol. Cell. Neurosci. *18*, 632–648.

Ketchum, K.A., Joiner, W.J., Sellers, A.J., Kaczmarek, L.K., and Goldstein, S.A. (1995). A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. Nature *376*, 690–695.

Kilisch, M., Lytovchenko, O., Arakel, E.C., Bertinetti, D., and Schwappach, B. (2016). A dual phosphorylation switch controls 14-3-3-dependent cell surface expression of TASK-1. J. Cell Sci. *129*, 831–842.

Kourdougli, N., Pellegrino, C., Renko, J.M., Khirug, S., Chazal, G., Kukko-Lukjanov, T.K., Lauri, S.E., Gaiarsa, J.L., Zhou, L., Peret, A., et al. (2017). Depolarizing GABA contributes to glutamatergic network rewiring in epilepsy. Ann. Neurol. *81*, 251–265.

Lee, H.H., Jurd, R., and Moss, S.J. (2010). Tyrosine phosphorylation regulates the membrane trafficking of the potassium chloride co-transporter KCC2. Mol. Cell. Neurosci. *45*, 173–179.

Lee, H.H., Deeb, T.Z., Walker, J.A., Davies, P.A., and Moss, S.J. (2011). NMDA receptor activity downregulates KCC2 resulting in depolarizing GABAA receptor-mediated currents. Nat. Neurosci. *14*, 736–743.

Lesage, F., and Lazdunski, M. (2000). Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. Am. J. Physiol. Renal Physiol. *279*, F793–F801.

Lévesque, M., Salami, P., Shiri, Z., and Avoli, M. (2018). Interictal oscillations and focal epileptic disorders. Eur. J. Neurosci. *48*, 2915–2927.

Levitz, J., Royal, P., Comoglio, Y., Wdziekonski, B., Schaub, S., Clemens, D.M., Isacoff, E.Y., and Sandoz, G. (2016). Heterodimerization within the TREK channel subfamily produces a diverse family of highly regulated potassium channels. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *113*, 4194–4199.

Li, H., Khirug, S., Cai, C., Ludwig, A., Blaesse, P., Kolikova, J., Afzalov, R., Coleman, S.K., Lauri, S., Airaksinen, M.S., et al. (2007). KCC2 interacts with the dendritic cytoskeleton to promote spine development. Neuron *56*, 1019–1033.

Liabeuf, S., Stuhl-Gourmand, L., Gackière, F., Mancuso, R., Sanchez Brualla, I., Marino, P., Brocard, F., and Vinay, L. (2017). Prochlorperazine Increases KCC2 Function and Reduces Spasticity after Spinal Cord Injury. J. Neurotrauma *34*, 3397–3406.

Llano, O., Smirnov, S., Soni, S., Golubtsov, A., Guillemin, I., Hotulainen, P., Medina, I., Nothwang, H.G., Rivera, C., and Ludwig, A. (2015). KCC2 regulates actin dynamics in dendritic spines via interaction with β-PIX. J. Cell Biol. *209*, 671–686.

Loucif, A.J.C., Saintot, P.P., Liu, J., Antonio, B.M., Zellmer, S.G., Yoger, K., Veale, E.L., Wilbrey, A., Omoto, K., Cao, L., Gutteridge, A., Castle, N.A., Stevens, E.B., and Mathie, A. (2018). GI-530159, a novel, selective, mechanosensitive two-pore-domain potassium (K2P) channel opener, reduces rat dorsal root ganglion neuron excitability. Br. J. Pharmacol. *175*, 2272–2283.

Mahadevan, V., and Woodin, M.A. (2016). Regulation of neuronal chloride homeostasis by neuromodulators. J. Physiol. *594*, 2593–2605.

Mahadevan, V., Pressey, J.C., Acton, B.A., Uvarov, P., Huang, M.Y., Chevrier, J., Puchalski, A., Li, C.M., Ivakine, E.A., Airaksinen, M.S., et al. (2014). Kainate receptors coexist in a functional complex with KCC2 and regulate chloride homeostasis in hippocampal neurons. Cell Rep. *7*, 1762–1770.

Mahadevan, V., Khademullah, C.S., Dargaei, Z., Chevrier, J., Uvarov, P., Kwan, J., Bagshaw, R.D., Pawson, T., Emili, A., De Koninck, Y., et al. (2017). Native KCC2 interactome reveals PACSIN1 as a critical regulator of synaptic inhibition. eLife *6*, e28270.

Marinc, C., Derst, C., Prüss, H., and Veh, R.W. (2014). Immunocytochemical localization of TASK-3 protein (K2P9.1) in the rat brain. Cell. Mol. Neurobiol. *34*, 61–70.

Medina, I., Friedel, P., Rivera, C., Kahle, K.T., Kourdougli, N., Uvarov, P., and Pellegrino, C. (2014). Current view on the functional regulation of the neuronal K(+)-Cl(-) cotransporter KCC2. Front. Cell. Neurosci. *8*, 27.

Menendez de la Prida, L., and Trevelyan, A.J. (2011). Cellular mechanisms of high frequency oscillations in epilepsy: on the diverse sources of pathological activities. Epilepsy Res. *97*, 308–317.

Merner, N.D., Chandler, M.R., Bourassa, C., Liang, B., Khanna, A.R., Dion, P., Rouleau, G.A., and Kahle, K.T. (2015). Regulatory domain or CpG site variation in SLC12A5, encoding the chloride transporter KCC2, in human autism and schizophrenia. Front. Cell. Neurosci. *9*, 386.

Noël, J., Sandoz, G., and Lesage, F. (2011). Molecular regulations governing TREK and TRAAK channel functions. Channels (Austin) *5*, 402–409.

Nokia, M.S., Gureviciene, I., Waselius, T., Tanila, H., and Penttonen, M. (2017). Hippocampal electrical stimulation disrupts associative learning when targeted at dentate spikes. J. Physiol. *595*, 4961–4971.

Pallud, J., Le Van Quyen, M., Bielle, F., Pellegrino, C., Varlet, P., Cresto, N., Baulac, M., Duyckaerts, C., Kourdougli, N., Chazal, G., et al. (2014). Cortical GABAergic excitation contributes to epileptic activities around human glioma. Sci. Transl. Med. *6*, 244ra89.

Pellegrino, C., Gubkina, O., Schaefer, M., Becq, H., Ludwig, A., Mukhtarov, M., Chudotvorova, I., Corby, S., Salyha, Y., Salozhin, S., et al. (2011). Knocking down of the KCC2 in rat hippocampal neurons increases intracellular chloride concentration and compromises neuronal survival. J. Physiol. *589*, 2475–2496.

Puskarjov, M., Ahmad, F., Kaila, K., and Blaesse, P. (2012). Activity-dependent cleavage of the K-Cl cotransporter KCC2 mediated by calcium-activated protease calpain. J. Neurosci. *32*, 11356–11364.

Ramadoss, J., Lunde, E.R., Ouyang, N., Chen, W.J., and Cudd, T.A. (2008). Acid-sensitive channel inhibition prevents fetal alcohol spectrum disorders cerebellar Purkinje cell loss. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. *295*, R596–R603.

Rivera, C., Voipio, J., Payne, J.A., Ruusuvuori, E., Lahtinen, H., Lamsa, K., Pirvola, U., Saarma, M., and Kaila, K. (1999). The K+/Cl- co-transporter KCC2

renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. Nature *397*, 251–255.

Rivera, C., Li, H., Thomas-Crusells, J., Lahtinen, H., Viitanen, T., Nanobashvili, A., Kokaia, Z., Airaksinen, M.S., Voipio, J., Kaila, K., and Saarma, M. (2002). BDNF-induced TrkB activation down-regulates the K+-Cl- cotransporter KCC2 and impairs neuronal Cl- extrusion. J. Cell Biol. *159*, 747–752.

Rivera, C., Voipio, J., Thomas-Crusells, J., Li, H., Emri, Z., Sipilä, S., Payne, J.A., Minichiello, L., Saarma, M., and Kaila, K. (2004). Mechanism of activity-dependent downregulation of the neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2. J. Neurosci. *24*, 4683–4691.

Roth, B.L. (2016). DREADDs for Neuroscientists. Neuron *89*, 683–694.

Saitsu, H., Watanabe, M., Akita, T., Ohba, C., Sugai, K., Ong, W.P., Shiraishi, H., Yuasa, S., Matsumoto, H., Beng, K.T., et al. (2016). Impaired neuronal KCC2 function by biallelic SLC12A5 mutations in migrating focal seizures and severe developmental delay. Sci. Rep. *6*, 30072.

Sciaky, N., Presley, J., Smith, C., Zaal, K.J., Cole, N., Moreira, J.E., Terasaki, M., Siggia, E., and Lippincott-Schwartz, J. (1997). J. Cell Biol. *139*, 1137–1155.

Seja, P., Schonewille, M., Spitzmaul, G., Badura, A., Klein, I., Rudhard, Y., Wisden, W., Hübner, C.A., De Zeeuw, C.I., and Jentsch, T.J. (2012). Raising cytosolic Cl- in cerebellar granule cells affects their excitability and vestibulo-ocular learning. EMBO J. *31*, 1217–1230.

Sen, A., Martinian, L., Nikolic, M., Walker, M.C., Thom, M., and Sisodiya, S.M. (2007). Increased NKCC1 expression in refractory human epilepsy. Epilepsy Res. *74*, 220–227.

Staley, K.J., and Mody, I. (1992). Shunting of excitatory input to dentate gyrus granule cells by a depolarizing GABAA receptor-mediated postsynaptic conductance. J. Neurophysiol. *68*, 197–212.

Talley, E.M., Solorzano, G., Lei, Q., Kim, D., and Bayliss, D.A. (2001). Cns distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. J. Neurosci. *21*, 7491–7505.

Tang, X., Kim, J., Zhou, L., Wengert, E., Zhang, L., Wu, Z., Carromeu, C., Muotri, A.R., Marchetto, M.C., Gage, F.H., and Chen, G. (2016). KCC2 rescues functional deficits in human neurons derived from patients with Rett syndrome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *113*, 751–756.

Titz, S., Hormuzdi, S., Lewen, A., Monyer, H., and Misgeld, U. (2006). Intracellular acidification in neurons induced by ammonium depends on KCC2 function. Eur. J. Neurosci. *23*, 454–464.

Wang, F., Wang, X., Shapiro, L.A., Cotrina, M.L., Liu, W., Wang, E.W., Gu, S., Wang, W., He, X., Nedergaard, M., and Huang, J.H. (2017). NKCC1 up-regulation contributes to early post-traumatic seizures and increased post-traumatic seizure susceptibility. Brain Struct. Funct. *222*, 1543–1556.

Witter, M.P. (2007). The perforant path: projections from the entorhinal cortex to the dentate gyrus. Prog. Brain Res. *163*, 43–61.

Wright, R., Newey, S.E., Ilie, A., Wefelmeyer, W., Raimondo, J.V., Ginham, R., McIlhinney, R.A.J., and Akerman, C.J. (2017). Neuronal Chloride Regulation via KCC2 Is Modulated through a $GABA_B$ Receptor Protein Complex. J. Neurosci. *37*, 5447–5462.

Zhang, H., Dong, H., Cilz, N.I., Kurada, L., Hu, B., Wada, E., Bayliss, D.A., Porter, J.E., and Lei, S. (2016). Neurotensinergic Excitation of Dentate Gyrus Granule Cells via Gαq-Coupled Inhibition of TASK-3 Channels. Cereb. Cortex *26*, 977–990.

Zuzarte, M., Heusser, K., Renigunta, V., Schlichthörl, G., Rinné, S., Wischmeyer, E., Daut, J., Schwappach, B., and Preisig-Müller, R. (2009). Intracellular traffic of the K+ channels TASK-1 and TASK-3: role of N- and C-terminal sorting signals and interaction with 14-3-3 proteins. J. Physiol. *587*, 929–952.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Rabbit anti-KCC2	Millipore	Cat# 07-432; RRID:AB_310611
Rabbit anti-Task3	Alomone	Cat# APC-044; RRID:AB_2039953
Nonimmune IgG control antibody	Jackson ImmunoResearch	Cat# 011-000-002; RRID:AB_2337117
Goat anti-Task3	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc-11317; RRID:AB_2131233 *(discontinued)*
Rabbit anti-HA	Cell Signaling Technology	Cat# 3724; RRID:AB_1549585
Mouse anti-HA	Sigma-Aldrich	Cat# H9658; RRID:AB_260092
Mouse anti-Flag M2	Sigma-Aldrich	Cat# F3165; RRID:AB_259529
Rabbit anti-EEA1	Thermofisher	Cat# PA1-063A; RRID:AB_2096819
Rabbit anti-calregulin	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc-11398; RRID:AB_667959 *(discontinued)*
Mouse anti-CTR433	Michel Bornens, Curie Inst., Paris	Jasmin et al., 1989
Mouse anti-GM130	BD Transduction Laboratories	Cat# 610822; RRID:AB_398141
Mouse anti beta-III tubulin (TuJ1)	R&D Systems	Cat# MAB1195; RRID:AB_357520
DyLight Fluorescent Dye Conjugates 800	Rockland	Cat# 611-145-002; RRID:AB_1660964
Rabbit anti-HA	Cell Signaling Technology	Cat# 3724S; RRID:AB_1549585
Alexa647-conjugated donkey anti-rabbit	Jackson ImmunoResearch	Cat# 711-605-152; RRID:AB_2492288
Cy3-conjugated goat anti-mouse	Jackson ImmunoResearch	Cat# 115-165-206; RRID:AB_2338695
Chicken anti-GFP	Millipore	Cat# AB16901; RRID:AB_90890
Rabbit anti-Prox1	Millipore	Cat# AB5475; RRID:AB_177485
Rabbit anti-Trek2	Alomone	Cat# APC-055; RRID:AB_2040138
Cy3-conjugated goat anti-rabbit	Jackson ImmunoResearch	Cat# 111-165-003; RRID:AB_2338000
FITC-conjugated goat anti-chicken	Jackson ImmunoResearch	Cat# 103-095-155; RRID:AB_2337384
Bacterial and Virus Strains		
Lentivirus U6-shNT-PGK-EGFP-WPRE	UNC Vector Core	Chevy et al., 2015
Lentivirus U6-shKCC2-PGK-EGFP-WPRE	UNC Vector Core	Chevy et al., 2015
AAV2.1-hM4D(Gi)-mCherry	Viral Vector Facility. Univ. Zurich	Cat# v107
AAV2.1-U6-shNT-PGK-EGFP-WPRE	Atlantic Gene Therapy, Nantes	This study
AAV2.1-U6-shKCC2-PGK-EGFP-WPRE	Atlantic Gene Therapy, Nantes	This study
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
Choline chloride	Sigma-Aldrich	Cat# C7017
NBQX disodium salt	HelloBio	Cat# HB0443
D-AP5	HelloBio	Cat# HB0225
Tetrodotoxin (TTX)	Latoxan	Cat# L8503
Picrotoxin	HelloBio	Cat# HB0506
Gramicidin	Sigma-Aldrich	Cat# G5002
RubiGABA	Abcam	Cat# ab120409
CGP54626	Tocris Bioscience	Cat# 1088
Bicuculline methochloride	HelloBio	Cat# HB0895
Valium 10mg/2ml (Diazepam)	Roche (Centravet)	N/A
Ketamine 1000	Virbac (Centravet)	N/A
Rompun 2% (Xylazine)	Bayer (Centravet)	N/A

(*Continued on next page*)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Vetergesic 0.3mg/ml (Buprenorphine)	Ceva (Centravet)	N/A
Pilocarpine hydrochloride	Sigma-Aldrich	Cat# P6503
Lithium Chloride	Sigma-Aldrich	Cat# L4408
(-) Scopolamine methyl nitrate	Sigma-Aldrich	Cat# S2250
Clozapine N-oxide	HelloBio	Cat# HB1807
Normal goat serum	FisherScientific	Cat# 11530526
DMEM GlutaMAX (Neuro2a)	FisherScientific	Cat #10567014
DMEM GlutaMAX (HEK)	FisherScientific	Cat #41965039
Fetal bovine serum	FisherScientific	Cat# 15377636
Transfectin	BioRad	Cat# 1703350
Trypsine	FisherScientific	Cat# 11580626
Hank's Balanced Salt Solution	FisherScientific	Cat# 11570476
Minimum Essential Medium	FisherScientific	Cat# 11550556
Horse serum	FisherScientific	Cat# 10368902
L-glutamine	FisherScientific	Cat# 11500626
Sodium Pyruvate (100 mM)	FisherScientific	Cat# 11530396
Neurobasal	FisherScientific	Cat# 11570556
B27 supplement	FisherScientific	Cat# 11530536
Penicillin/streptomycin	FisherScientific	Cat# 11548876
HEPES Buffer 1M	Sigma-Aldrich	Cat# 11560496
Poly-ornithine	Sigma-Aldrich	Cat# P8638
Critical Commercial Assays		
Pierce BCA protein assay	Thermofisher	Cat# 23225
Dynabeads Protein G	Thermofisher	Cat# 10003D
NuPage Novex 4-12% Bis-Tris Gel	FisherScientific	Cat# 10247002
HA-Tag (C29F4) Rabbit mAb beads	Cell Signaling Technology	Cat# 3956S
EZview Red ANTI-FLAG M2 Affinity Gel	Sigma-Aldrich	Cat# F2426
GE Healthcare Amersham Protran NC Nitrocellulose Membrane	FisherScientific	Cat# 10600002
16 channel linear silicon probes	Neuronexus	Cat# A1x16-5mm-100-413-CM16LP
Borosilicate glass capillaries	Hilgenberg GmbH	Cat# 1404513
Tungsten bipolar electrodes	World Precision Instruments	Cat# TST33A05KT
Protease inhibitors	Sigma-Aldrich	Cat# 11697498001
Experimental Models: Cell Lines		
Neuro2a	DSMZ GmbH	Cat# ACC148 (batch #8)
HEK293	ATCC	Cat# CRL-1573
Experimental Models: Organisms/Strains		
Rat: Male wild-type Sprague Dawley	Janvier Labs	N/A
Recombinant DNA		
Flag-tagged rat full-length KCC2	Our lab	Chamma et al., 2013
HA-tagged mouse Task3	G. Sandoz, Nice Univ.	Levitz et al., 2016
HA-EGFP-HaloTag2	Addgene	Cat# 41742
pCAG empty vector	L. Maroteaux, IFM, Paris. Based on Addgene Cat# 89684	N/A
pGeneClip U6shRNA NT-PGK-EGFP	Our lab	Gauvain et al., 2011
pGeneClip U6shRNA KCC2-PGK-EGFP	Our lab	Gauvain et al., 2011
P58-GFP	J Lippincott-Schwartz, Janelia Campus	Sciaky et al., 1997
GalTase-GFP	J Lippincott-Schwartz, Janelia Campus	Sciaky et al., 1997
pEGFP-GalT	Addgene	Cat# 11929

(*Continued on next page*)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Software and Algorithms		
Fiji/ImageJ	National Institutes of Health	https://imagej.net/Fiji
Metamorph	Molecular Devices	N/A
Imaris x64 v9.1.2	Bitplane	N/A
pClamp v10.7	Molecular Devices	N/A
Matlab2017b	The Mathworks	N/A
Detectivent event detection	Norbert Ankri, UNIS, Marseilles	Ankri et al., 1994
Intan Recording Controller software v2.05	Intan Technologies	http://intantech.com
Chronux	Chronux	http://chronux.org/
FMAToolbox	M. Zugaro, College de France, Paris	http://fmatoolbox.sourceforge.net/

LEAD CONTACT AND MATERIALS AVAILABILITY

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Jean Christophe Poncer (jean-christophe.poncer@inserm.fr).

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Animals

Juvenile male Wistar rats were obtained from Janvier Labs (Le Genest Saint Isle, France). All procedures conformed to the International Guidelines on the ethical use of animals, the French Agriculture and Forestry Ministry guidelines for handling animals (decree 87849, license A 75-05-22) and were approved by the Charles Darwin ethical committee (APAFIS2015111011588776v3).

HEK293 and Neuro-2a cultures

HEK293 and Neuro-2a cells were grown in DMEM GlutaMAX (Invitrogen) supplemented respectively with glucose and fetal bovine serum (5 g/l and 10% for HEK293 cells and 1g/l and 10% for Neuro-2a cells, respectively). Cells (60%–70% confluent) were co-transfected using Transfectin (BioRad) according to the manufacturer's instructions.

Primary hippocampal cultures

Primary cultures of hippocampal neurons were prepared as previously described (Gauvain et al., 2011). In brief, hippocampi were dissected from embryonic day 18-19 Sprague-Dawley rats and trypsinized (0.25% v/v) and mechanically dissociated in Hank's Balanced Salt Solution containing buffered with HEPES (10 mM). Neurons were plated at a density of 120.10^3 cells/ml onto 18-mm glass coverslips pre-coated with poly-ornithine (50 μg/ml). The plating medium was prepared with Minimum Essential Medium supplemented with 10% horse serum, L-glutamine (2 mM) and sodium pyruvate (1 mM). Cells were allowed to attach for 3-4 h at 37°C in a 5% CO2 humidified incubator before replacing the medium with Neurobasal supplemented with B27, L-glutamine (2 mM) penicillin/streptomycin (200 units/ml and 200 μg/ml, respectively). Culture medium was supplemented with 20% fresh medium every week. Hippocampal cultures were infected at 15–17 DIV using lentiviral vectors described below, using 500 nl/ml of purified virus solution. Cultures were washed twice in ice-cold PBS and lysed in lysis buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 250 Mm NaCl, 50 mM NaF, 5 mM PPi, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 1 mM sodium orthovanadate, 1% Triton-X, and protease inhibitor mixture; Roche).

After 15 min centrifugation at 14000 g, supernatants were mixed with Laemmli sample buffer and boiled at 95°C for 5 min. Samples were subjected to standard SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Blots were probed with rabbit KCC2 and mouse neuron-specific beta-III tubulin (TuJ1) antibodies, and fluorescent secondary antibodies (DyLight 800) using Odyssey infrared imaging system (LI-COR Bioscience). For quantification, all data were normalized to internal TuJ1 control signals.

METHOD DETAILS

Virus and constructs

Rat SLC12A5-specific and non-target shRNA sequences (Gauvain et al., 2011) were introduced in pTrip vector under U6 promoter and used to produce purified lentiviral particles (titer 7-9 × 10^9 TU/ml, UNC Vector Core Facility) (Chevy et al., 2015). For some experiments, these same sequences were introduced in pAAV vector under U6 promoter and used to produce purified AAV particles (AAV2.1-shRNA-GFP, titer 10^{13} TU/ml, Atlantic Gene Therapy, Nantes). AAV particles expressing inhibitory DREADD under synapsin promoter were obtained from the Viral Vector Facility of Zurich University (AAV2.1-hM4D(Gi)-mCherry, titer 10^{13} TU/ml).

Stereotaxic viral injection and EcoG electrode implantation

30-days Wistar rats were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine / xylazine (75/10 mg/kg) and subcutaneous injection of buprenorphine (0.05 mg/kg) for analgesia. Animals were then head-fixed in a stereotaxic apparatus. 1 μl of lentivirus (concentrated at 10^9 TU/ml) was injected bilaterally in the dentate gyrus (AP −4.0 mm, ML ± 2.5 mm, DV −3.1 mm) at 125 nl/min. For DREADD experiments, 500nL of mix AAV2.1-shRNA-GFP and AAV2.1-hM4D(Gi)-mCherry (ratio 2/3:1/3) was injected bilaterally in the dentate gyrus. For experiments in CA1, animals were injected bilaterally with 1 μl of AAV2.1-shRNA-GFP (AP −4.0 mm, ML ± 2.5 mm, DV −2.35 mm).

For pilocarpine experiments, animals were also implanted with EcoG electrodes soldered to stainless steel screws. Two electrodes were placed above each hippocampus, at the same coordinates as the injection sites. A third screw was placed above the cerebellum and used as reference.

Intracerebral probe implantation

For intra-hippocampal recordings, animals were anesthetized with isoflurane one week following viral injection, and injected subcutaneously with 0.05 mg/kg of buprenorphine for analgesia. One 16-channels silicon probe was implanted in the right hemisphere, at the site of the injection. Signals were monitored during the insertion of the probe to ensure correct localization of the probe in the hippocampus. One stainless steel screw was placed above the cerebellum and connected to the probe as a reference. Four additional screws were placed above the prefrontal cortex and the contralateral hemisphere to secure the dental cement adhesion. During the recovery period (minimum 3 days), rats were daily monitored and additional injection of buprenorphine (subcutaneous, 0.05 mg/kg) were made in case of detectable pain.

Electrophysiology

Slice preparation

10 to 20 days after viral injection, animals were deeply anesthetized with ketamine / xylazine (115/15 mg/kg) and transcardially perfused with an ice-cold choline-based solution containing (in mM): 110 Choline Cl, 25 Glucose, 25 $NaHCO_3$, 11.6 Ascorbic acid, 3.1 Pyruvic acid, 1.25 NaH_2PO_4, 2.5 KCl, 0.5 $CaCl_2$, 7 $MgCl_2$ saturated with 95% O_2/5% CO_2. Rats were then decapitated, hippocampi were rapidly dissected and 400μm transverse sections were prepared using a vibratome (Microm, Thermofisher). Slices were then transferred and allowed to recover for 1 hour in a humidified interface chamber filled with bicarbonate-buffered ACSF pre-heated at 37°C and oxygenated with 5% CO_2 in O_2, containing (in mM): 126 NaCl, 26 $NaHCO_3$, 10 Glucose, 3.5 KCl, 1.25 NaH_2PO_4, 1.6 $CaCl_2$, 1.2 $MgCl_2$. For recordings, slices were transferred in a submerged recording chamber and superfused with ACSF maintained at 32°C.

Patch clamp recordings

Electrophysiological recordings were made with 4-5 MΩ borosilicate glass pipettes. Signals were acquired with a Multiclamp 700B amplifier (Molecular Devices), low-pass filtered at 10 kHz, and digitized at 20 kHz. All cells were recorded in the suprapyramidal blade of the dentate gyrus.

For perforated-patch recordings, internal solution contained (in mM) 140 KCl and 10 HEPES (pH adjusted to 7.4 with KOH). Gramicidin was added in the pipette solution to reach a concentration of 60 μg/ml. Rubi-GABA (15 μM) was added in ACSF together with NBQX (20 μM), APV (50 μM), CGP54626 (10 μM) and TTX (1 μM). Rubi-GABA was photolyzed using a digital modulated diode laser beam at 405 nm (Omicron Deepstar, Photon Lines) delivered through a single path photolysis head (Prairie Technologies). The laser beam diameter was set to a diameter of 3-5 μm and was directed onto the soma of the recorded neuron. Photolysis was induced by a 5 ms/30 mW pulse. Once access resistance was stabilized, cells were held at a potential of −70 mV and 3.5 s voltage steps ranging from −100 to −30 mV were applied to the cell. Laser pulses were delivered at 2.2 s after the onset of the voltage step to allow for stabilization of the holding current. Currents were analyzed offline using Clampfit software. Voltages were corrected for liquid junction potential (4.1 mV) and for the voltage drop through the series resistance and E_{GABA} was derived from a linear regression of the I/V curve over the 4 data points around current reversal.

For all other patch clamp experiments, cells were recorded in whole-cell configuration and maintained at −70 mV. All voltages were corrected offline for liquid junction potential (of 14.5 mV).

Intrinsic properties were evaluated using an internal solution containing (in mM) 120 K-Gluconate, 10 KCl, 10 HEPES, 0.1 EGTA, 4 MgATP, 0.4 Na_3GTP (pH adjusted to 7.4 with KOH) and blocking synaptic transmission with NBQX, APV and picrotoxin (10μM). Resting membrane potential was measured using I = 0 current clamp mode one minute after break-in. Input resistance was measured in current-clamp mode with −50 pA current steps. Input-output curves were generated by plotting firing frequency in response to either series of 800 ms current steps (ranging from −100 to 375 pA, 25 pA step increment, Figures 2C and S3D) or multiples of synaptic current waveforms (Figure 4C). For potassium currents measurements, recorded from either granule cells (Figures 2G and 2H) or Neuro-2a cells expressing mGFP, HA-tagged mouse Task-3 with or without Flag-tagged rat KCC2 (ratio: 1/3/6; Figure 3F), TTX (1 μM) was added to the bath. Currents were recorded in voltage-clamp mode between −120 mV and −60 mV with a continuous ramp at 0.03 mV/ms. Conductance of Task-3 mediated currents were then derived from a linear regression of the last 500 ms of the outward currents. For EPSP/spike coupling recordings, artificial waveforms derived from mEPSC recordings were used as a current command applied to the patch pipette. Effect of CNO application on membrane potential was estimated by whole-cell recordings in current-clamp mode with no current injection.

For miniature excitatory postsynaptic current (mEPSCs) recordings, pipettes were filled with internal solution containing (in mM) 115 Cs-Methylsulfonate, 20 CsCl, 10 HEPES, 0.1 EGTA, 4 MgATP, 0.4 Na_3GTP (pH adjusted to 7.4 with CsOH) and currents were isolated by adding TTX and bicuculline methochloride (20 μM) to the extracellular solution. For miniature inhibitory postsynaptic currents (mIPSCs), pipettes were filled with (in mM) 135 CsCl, 10 HEPES, 10 EGTA, 4 MgATP, 0.4 Na_3GTP, 1.8 $MgCl_2$ (pH adjusted to 7.4 with CsOH) and currents were isolated by adding TTX, NBQX and APV in the bath. Series and input resistance were regularly monitored with −5 mV voltage steps and recordings were interrupted if either value varied by more than 20 %. Miniature synaptic currents were detected and analyzed offline using Detectivent software (Ankri et al., 1994).

Extracellular field recordings

For extracellular recordings, a recording pipette of 2-3 MΩ resistance was filled with ACSF and inserted within the granular layer, in a densely infected area of the dentate gyrus. A tungsten bipolar electrode (0.5 MΩ) was used to stimulate perforant path inputs. Stimulation intensity was adjusted to induce a population spike of about half its maximum amplitude. Field EPSP (fEPSP) slope was determined over a 1ms window preceding the population spike. Population spike amplitude was assessed as the distance between its peak and the baseline extrapolated from its initiation and termination points using a routine written under MATLAB.

Biochemistry

Co-immunoprecipitation assays from rat hippocampal homogenates

Hippocampi were dissected from adult Sprague Dawley female rats and homogenized by sonication in co-immunoprecipitation buffer (1 ml/100 mg of tissue) and solubilized by rotation for 2 to 4 hours at 4°C. After centrifugation at 20,000 g for 40 minutes at 4°C, protein content of the supernatant was measured by BCA protein assay (Pierce). 6.5 mg of proteins were transferred into microtube and 5 μg of primary antibody (Rabbit anti-KCC2, Millipore, and Rabbit anti-Task-3, Alomone) or nonimmune IgG control antibody of the same species (Jackson Immunoresearch) were added. Samples were then incubated overnight at 4°C under rotation. Complexes were precipitated with 20 μl protein-G magnetic beads (Invitrogen) for 2 hours at 4°C. Beads were then washed twice with 1ml of co-immunoprecipitation buffer and once with triton-free co-immunoprecipitation buffer. Bound complexes were eluted in 4X sample buffer (Invitrogen) for 1 hour at 37°C. Samples were analyzed by SDS-PAGE and western blot.

Co-immunoprecipitation assays from HEK293 cells

HEK293 cells were grown in DMEM GlutaMAX (Invitrogen) supplemented with 5 g/l glucose and 10% fetal bovine serum. Cells (60%–70% confluent) were co-transfected using transfectin according to the manufacturer's instructions with plasmids expressing Flag-tagged rat KCC2 (Chamma et al., 2013) and HA-tagged mouse Task-3 (kindly provided by Guillaume Sandoz, Nice Univ., France) or HA-tagged GFP (Addgene) as control (with a 1:1 ratio). 48 hours after transfection, cells were homogenized by sonication in co-immunoprecipitation buffer containing (in mM): 50 Tris-HCl pH 7.4, 150 NaCl, 1 EDTA, as well as 0.5% Triton X-100 and protease inhibitors. Cells were then solubilized by rotation for 2 hours at 4°C and centrifuged at 20,000 g for 30 minutes at 4°C. Supernatants were transferred into a microtube with 20 μl of pre washed HA-Tag (C29F4) Rabbit mAb beads (Cell Signaling Technology) or EZview Red Anti-FLAG M2 Affinity Gel (Sigma-Aldrich). Samples were incubated overnight at 4°C under rotation and processed as above.

Western blotting

Proteins were separated on a 4%–12% SDS polyacrylamide gradient gel (Invitrogen) and transferred onto a nitrocellulose membrane (GE Healthcare). For co-immunoprecipitation assays from rat hippocampal homogenate, blots were probed with antibodies against KCC2 (rabbit, 1/1000, Merck-Millipore) and Task-3 (goat, 1/250, Santa Cruz). This Task-3 antibody has been previously validated in western blots from Task-3 KO mice (Zhang et al., 2016). For co-immunoprecipitation assays from HEK293 cells, blots were probed with HA (mouse, 1/3000, Cell Signaling Technology) and KCC2 (rabbit, 1/1000, Merck-Millipore) or FlagM2 (mouse, 1/1000, Sigma-Aldrich). The primary antibodies were detected with fluorescent secondary antibodies (1/1000-1/3000, DyLight 700 or 800, Rockland) using Odyssey infrared imaging system (LI-COR Bioscience). All biochemical assays were repeated at least 3 times on independent hippocampal extracts or cultures.

Immunocytochemistry

Neuro-2a cells were grown on glass coverslips in DMEM GlutaMAX (Invitrogen) supplemented with 1 g/l glucose and 10% fetal bovine serum. Cells at 60%–70% confluence were co-transfected using Transfectin according to manufacturer's instructions with plasmids expressing HA-tagged mouse Task-3 and either Flag-tagged rat KCC2 (Chamma et al., 2013; Heubl et al., 2017) or a pCAG empty vector as control (with a 1:3 ratio, Figures 3D and 3E). For identification of some subcellular compartments (Figures 3G and 3H), cells were co-transfected with plasmids expressing HA-tagged mouse Task-3 and either p58-GFP or GalTase GFP (kindly provided by Jennifer Lippincott-Schwartz, Janelia Research Campus) with a 1:1 ratio. 48 hours after transfection, cells were washed with PBS, fixed with paraformaldehyde (4%) supplemented with 4% sucrose in PBS and permeabilized with 0.25% Triton X-100 in PBS. After 3 × 10 min washes in PBS, cells were incubated for 30 min in blocking buffer (10% normal goat serum in PBS). Incubation with primary antibodies including HA (rabbit, 1/2000, Chemicon; or mouse, 1/250, Sigma), FlagM2 (mouse, 1/2000, Sigma), CTR433 (mouse, 1/250), Calregulin (rabbit, 1/250, Santa Cruz Biotechnology), EEA1 (rabbit, 1/250, Thermofisher), GM130 (mouse, 1/250, BD Transduction Laboratories) was then performed in blocking buffer for 2 hours at room temperature. After 3 × 10 min washes in PBS, cells were incubated with secondary antibodies for 1 hour (goat anti-rabbit Alexa CY3, goat anti-mouse Alexa CY3, donkey anti-mouse Alexa 647, donkey anti-rabbit Alexa CY3, 1/1000, donkey anti-rabbit Alexa

647, 1/1000 and goat anti-mouse CY3, 1/2000, all from Jackson Immunoresearch). Coverslips were washed 3 times in PBS and mounted in Mowiol/Dabco (25 mg/ml) solution. Stacks (z-step: 0.29 μm) of immunofluorescence images were acquired using an upright confocal microscope (Leica TCS SP5), using a 63x 1.40-N.A. objective and lasers set at 488, 561 and 633 nm for excitation of GFP, Cy3 and Alexa 647, respectively.

Colocalization analysis (Figures 3G and 3H) was performed from 3D images using Imaris (Bitplane) colocalization tool. In brief, individual transfected cells were isolated from 3D stacks using either automatic or manual surface-based masks. Cytofluorograms were then constructed using Imaris colocalization tool and a threshold was set manually for each channel. "Colocalization index" was then computed as the percentage of suprathreshold material (integrated intensity) of HA-Task-3 immunofluorescence channel localized within suprathreshold voxels of immunofluorescent signal corresponding to each subcellular marker.

Immunohistochemistry

At least 2 weeks following viral injections, rats were anesthetized by intraperitoneal ketamine/xylazine injection (110/15 mg/kg) and perfused transcardially with ice-cold cutting solution of choline as above. Brain were removed, postfixed in PFA 4% for 48 hours and stored at 4°C in 30% sucrose PBS. Parasagittal sections (40 μm thick) were obtained using a cryotome. After washes, brain slices were preincubated 3 hours with 0.5% Triton and 10% goat serum in PBS and then 48 hours at 4°C with primary antibodies: GFP (chicken, 1:1000, Millipore), KCC2 (rabbit, 1:400, Millipore), Prox1 (rabbit, 1:10000, Millipore), Task-3 (rabbit, 1:400, Alomone), Trek-2 (rabbit, 1:400, Alomone). After rinsing in PBS, slices were incubated 3 hours with secondary antibody (Cy3-coupled goat anti-rabbit and FITC-coupled goat anti-chicken) and mounted with Mowiol/Dabco (25 mg/mL). Images were acquired on an upright confocal microscope (Leica TCS SP5), using a 63X 1.40-N.A. objective with 2X electronic magnification and lasers set at 488 and 561 nm for excitation of FITC and Cy3, respectively. Stacks of 4 to 6 μm, 0.2 μm apart, optical sections were acquired. For images of the entire dentate gyrus, images were acquired using a 10X objective and stacks of 10 to 20 μm optical sections.

Behavior and recordings

All recordings took place in a dimly lit area enclosed by black curtains. Animals were handled for at least 3 days for habituation and to ensure stability of the recordings (location of the probe, power of the signal) before experiments started. A 80 cm x 80 cm arena with 50 cm high black plastic walls was used for exploration phase. A white card on one of the wall was used as spatial cue. For sleep recordings, animals were put in a white cylinder box (20 cm of diameter, 40 cm high). During the habituation phase, animals were placed in the cylinder box then in the empty arena for 10 min each, twice a day.

For recordings of awake behavior, new objects were placed in the open-field to stimulate exploration. All sleep recording sessions took place during the 2 hours following exploration of novel objects. For DREADD experiments, saline or CNO (1 mg/kg) was injected in i.p. 30 minutes before starting recording. All recordings took place less than 3 hours after i.p. injection.

Data were acquired at 20 kHz using an Intan recording controller (Intan Technologies) and Intan Recording Controller software (version 2.05).

Data analysis

All analyses were performed offline using MATLAB built-in functions and custom-written scripts as well as Chronux (http://chronux.org/) and the FMAToolbox (http://fmatoolbox.sourceforge.net/). Power spectra and spectrograms were computed using multitapers estimates on the raw LFP. Theta power was determined in the 5–10 Hz band. Dentate spikes detection was performed after high-pass filtering (> 30Hz), squaring and normalizing the field potential in the dentate gyrus. DS were defined as events of positive deflection peaking at > 8 s.d. and remaining above 4 s.d. for less than 30 ms. Current source density analysis (CSD) revealed two distinct DS profiles, previously described as DS1 and DS2 (Bragin et al., 1995). Since most (70%–80%) DS in our recording conditions were of type 2, we did not further attempt to distinguish between DS subtypes in our analysis.

Ripple detection was performed by band-pass filtering (100–600 Hz), squaring and normalizing, followed by thresholding of the field potential recorded in CA1 pyramidal layer. SPW-Rs were defined as events starting at 4 s.d., peaking at > 6 s.d., and remaining at > 4 s.d. for < 150 ms and > 15 ms

Electrocorticogram (EcoG) recordings and epilepsy induction

EcoG data were acquired at 20 kHz using Epoch Wireless recording system (Ripple) and Clampex software (Molecular Devices). Video recording (29 frames/s) was synchronized to data acquisition to enable offline analysis.

For epilepsy induction, animals received intraperitoneal injection of 127 mg/kg of lithium chloride 18 hours before treatment. The following day, animals received i.p. injection of 1 mg/kg of methylscopolamine in order to prevent peripheral effects of pilocarpine. 30 min later, 40 mg/kg of pilocarpine was injected i.p. Both video and EcoG data were acquired for one hour following pilocarpine injection. Status epilepticus was then interrupted by i.p. injection of 5 mg/kg diazepam. Animals were then sacrificed and brain were recovered and processed for visualization of the infected area.

Rat behavior was scored according to the following modified Racine's scale: stage 1, immobility and chewing; stage 2, neck and body clonus; stage 3, forelimb clonus and rearing; stage 4, *status epilepticus*, uninterrupted seizures. The onset of *status epilepticus* was assessed based on EcoG recordings.

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Statistics

All statistical tests were performed using MATLAB functions (Statistics and Machine Learning Toolbox). Data are presented as mean ± sem unless stated otherwise. All tests are two-tailed tests. Comparison of means was performed using Student's t test for normally distributed variables (tested with Shapiro-Wilk test) of equal variances (tested with Bartlett test). Otherwise, comparison was performed using the non-parametric Mann-Whitney test. Kolmogorov-Smirnov test was used for comparison of distributions. Significance was determined as $p < 0.05$. Repeats for experiments and statistical tests carried out are indicated in the figure legends and in the main text, respectively.

Cell Reports, Volume *28*

Supplemental Information

KCC2 Regulates Neuronal Excitability and Hippocampal Activity via Interaction with Task-3 Channels

Marie Goutierre, Sana Al Awabdh, Florian Donneger, Emeline François, Daniel Gomez-Dominguez, Theano Irinopoulou, Liset Menendez de la Prida, and Jean Christophe Poncer

Supplementary figures

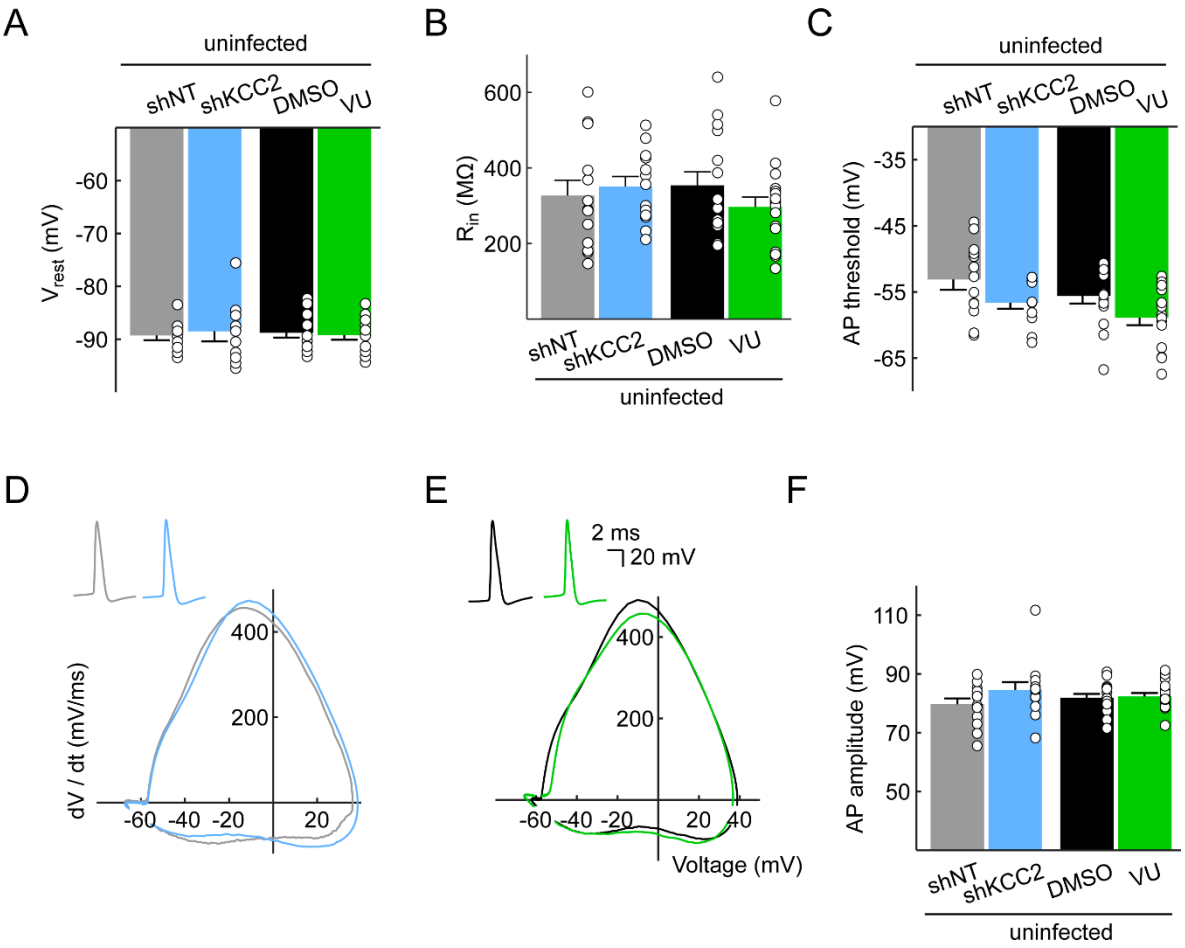


Figure S1. Increased excitability upon KCC2 knockdown is cell-autonomous and independent of KCC2-mediated ion transport *(related to Figure 1).*

Membrane and spike properties were analyzed for uninfected cells from slices infected with lentiviral vectors expressing non-target (grey, n=13 cells, 5 rats) or KCC2-directed (light blue, n=13 cells, 7 rats) shRNA sequences. Effect of KCC2 blockade for >30 min with its specific antagonist VU0463271 was also analyzed (green, n=17 cells, 5 rats) and compared to DMSO treatment (black, n=15 cells, 4 rats) in slices from control, non-infected rats. No differences were observed in membrane potential (**A,** shNT *vs* shKCC2 p=0.83, DMSO *vs* VU p=0.75), input resistance (**B,** shNT *vs* shKCC2 p=0.63, DMSO *vs* VU p=0.20) as well as AP threshold (**C,** shNT *vs* shKCC2 p=0.063, DMSO *vs* VU p=0.055), waveform (**D-E**) and amplitude (**F,** shNT *vs* shKCC2 p=0.24, DMSO *vs* VU p=0.77).

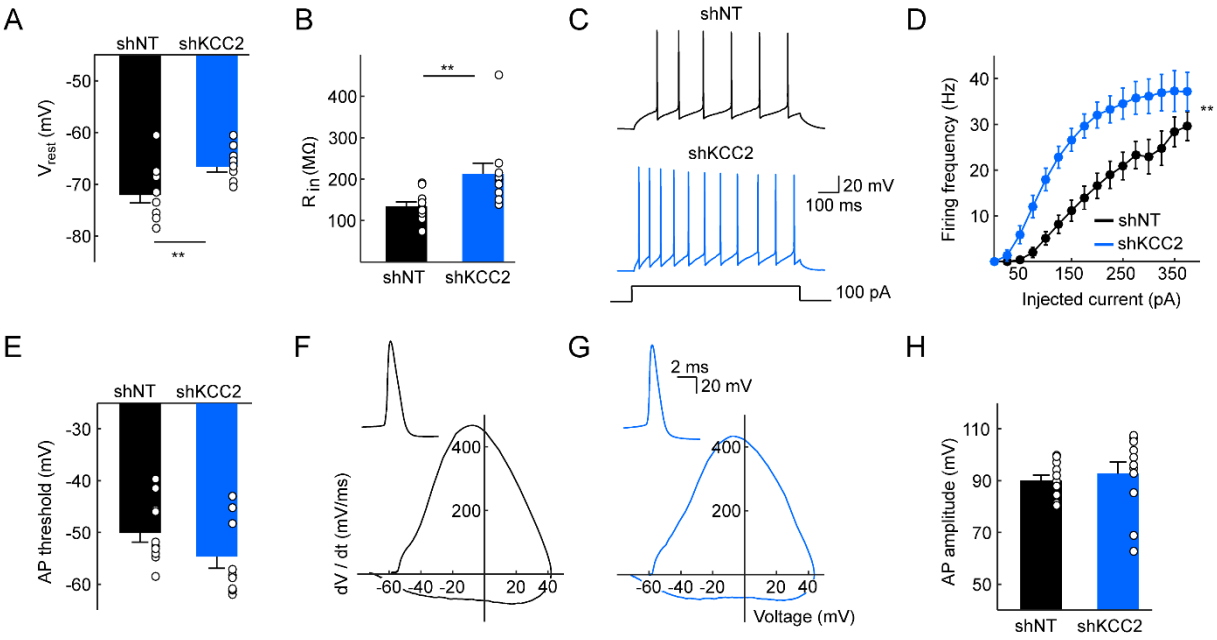


Figure S2. Increased excitability in CA1 pyramidal cells upon KCC2 suppression *(related to Figure 1).*

A-B, Membrane properties of CA1 superficial pyramidal cells expressing non-target (n=11 cells, 3 rats) or KCC2-directed (n=11 cells, 3 rats) shRNA, as detected in whole-cell patch clamp recordings while blocking synaptic transmission. KCC2 knockdown resulted in depolarized membrane potential (A) and increased input resistance (B). **C,** Individual traces in both conditions for a depolarizing current pulse of 100 pA. **D,** Mean input/output relationships representing the frequency of APs as a function of injected current. No difference was observed between shNT and shKCC2-expressing CA1 pyramidal cells with regard to action potential threshold (**E**, p=0.13), spike waveform (**F-G**) or spike amplitude (**H**, p=0.59). **p<0.01.

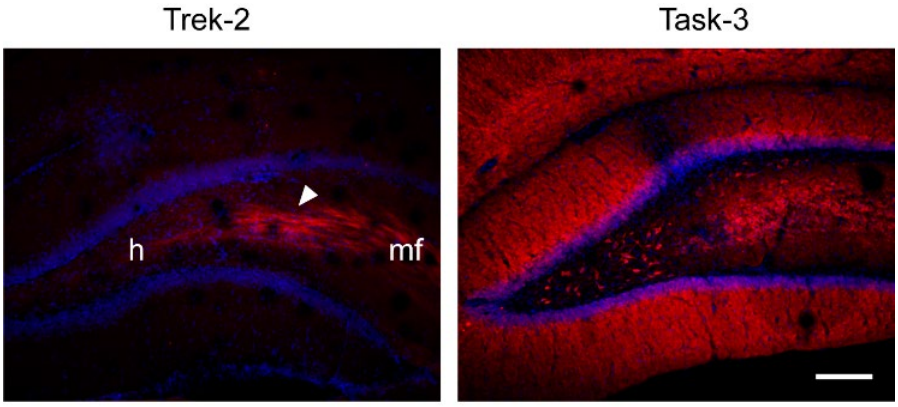


Figure S3. Differential subcellular localization of leak-potassium channels in the dentate gyrus *(related to Figure 3).*

Left**,** Average intensity projection of confocal micrographs of dentate gyrus immunostained with Trek-2 antibody. Note the massive expression of Trek-2 in mossy fibers (arrowhead) and its relative absence in the granular and molecular layers of the dentate gyrus. h : hilus, mf : mossy fibers. Right**,** Average intensity projection of confocal micrographs of dentate gyrus immunostained with Task-3 antibody revealing a strong expression in both granular and molecular layers as well as in hilar mossy cells. Scale, 200 µm.

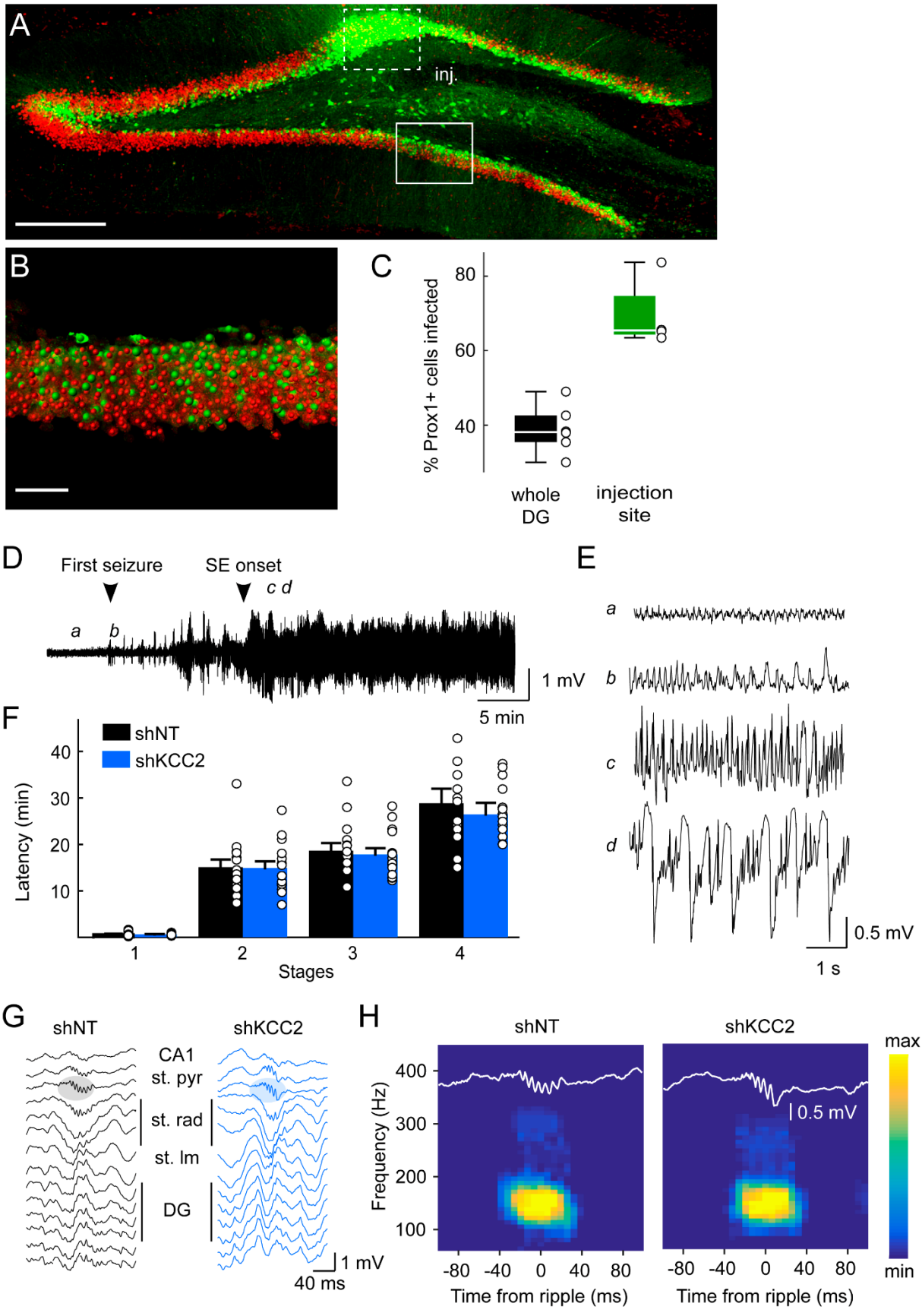


Figure S4. KCC2 suppression in the dentate gyrus does not induce or promote epileptiform activity *(related to Figure 5).*

A, Maximum intensity projection of confocal micrographs showing infected cells (GFP, green) and Prox1 (red) immunostaining in a parasagittal hippocampal slice 2 weeks after lentivirus injection. Dotted box: injection site. Scale, 300 µm. **B,** Imaris 3D rendering of plain boxed area shown in A. For colocalization estimates, dentate granule cell nuclei were automatically detected based on Prox1 immunostaining (red spheres) while infected cells were detected based on GFP fluorescence (green spheres). **C,** Summary of mean infection rate through the whole dentate gyrus (n=6 slices, 3 animals) and within 250 µm around the infection site (n=4 slices, 2 animals). **D,** Example trace of an EcoG recording during epilepsy induction with a pilocarpine protocol. Arrowheads indicate the timing of the first seizure and the onset of the *status epilepticus*. **E,** Expanded sections of the recording shown in A, showing the evolution of the EcoG signal at different time points of ictogenesis. **F,** Behavioral state was classified according to modified Racine's scale as follows: stage 1, immobility and chewing; stage 2, neck and body clonus; stage 3, forelimb clonus and rearing; stage 4, *status epilepticus*, uninterrupted seizures. The onset of *status epilepticus* was assessed based on EcoG recordings. Latency to different stages was similar between groups (n=15 animals each). **G,** Traces of ripple events recorded in CA1 during sleep for rats implanted with 16-channels silicon probes as in Fig. 5. **H,** Ripples were automatically detected and 100 events per animal were randomly selected (shNT n=5 rats, shKCC2 n=7 rats). Suppression of KCC2 in the dentate gyrus did not lead to pathological fast ripples as evidenced by the absence of band around 300 Hz in the average time-frequency spectra.

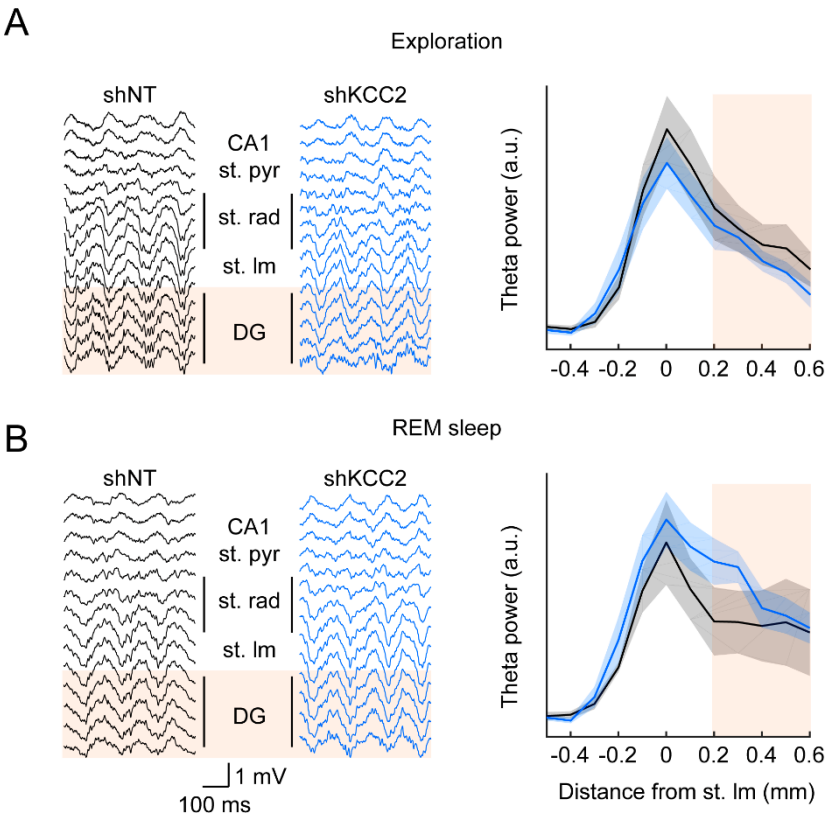


Figure S5. KCC2 suppression in the dentate gyrus does not affect hippocampal theta rhythm *(related to Figure 5).*

A, Left, 500 ms stretches of intrahippocampal recordings (as in Fig. 5) during exploratory behavior in rats expressing non-target shRNA (left, black) or KCC2-directed shRNA (blue, right) in the dentate gyrus. Note the prominent theta oscillation in all channels. The localization of the *stratum lacunosum moleculare* was defined by the highest power of theta and CA1 was identified by the presence of action potentials and of ripples during sleep. Localization of the dentate gyrus is highlighted in orange. Right, theta power in the 5-10 Hz frequency band measured over >1 min of recording using multi-tapers estimates. Power (in arbitrary units, a.u.) is represented as a function of the electrode localization. Depth of the electrode is expressed as the distance from *stratum lacunosum moleculare* (SLM). (2-way ANOVA, $F_{11,144}$=2.03, p=0.15). **B,** Similar as A, but during REM sleep. Depth profile was slightly different between groups (2-way ANOVA, $F_{11,133}$=5.96, p=0.016). However, comparisons for each layer individually did not yield any significant difference (Mann-Whitney, p>0.05 for all layers).

Article 4 :

Epilepsie liée à une lipofuscinose neuronale focale : localisation extra-frontale, signatures EEG et implication du GABA

Introduction

La lipofuscinose neuronale focale (FNL) est un trouble épileptique peu fréquent caractérisé par un excès d'accumulation de lipofuscine au sein de neurones d'apparence dysmorphique (NAD). Bien que la FNL partage certaines caractéristiques cliniques et de neuro-imagerie avec la dysplasie corticale focale de type IIb (FCDIIb), elle représente une entité neuropathologique différente actuellement décrite chez sept patients (Blümcke et al., 2011; Liu et al., 2016). À ce jour, on ne sait toujours pas si la FNL présente des caractéristiques électrophysiologiques ictales ou interictales particulières et on connaît mal les bases de son épileptogénicité.

Objectif

Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Vincent Navarro à l'ICM, j'ai contribué à un travail visant à décrire les caractéristiques électrocliniques, métaboliques, et neuropathologiques de deux patients atteints d'une épilepsie focale pharmacorésistante due à une FNL, et qui ont bénéficié d'une investigation pré-chirurgicale complète.

Résultats

Contrairement aux études précédentes qui montraient une localisation de la lésion dans le lobe frontal, la FNL a été identifiée dans le lobe temporal chez l'un des patients. De plus, les examens EEG chez les deux patients ont montré une activité interictale focale et fréquente, ressemblant à celle décrite dans le cas de la FCDIIb.

En plus de l'accumulation focale de lipofuscine intraneuronale, l'analyse neuropathologique a démontré que les somas des NAD sont entourés d'une grande quantité de boutons présynaptiques GABAergiques, suggérant l'implication des interneurones dans l'épileptogénicité du FNL.

Afin d'explorer plus en détail le rôle de la transmission GABAergique dans la génération de l'activité épileptiforme dans le FNL, j'ai effectué des enregistrements *in vitro* sur le tissu post-chirurgical d'un patient à l'aide de matrices de multi-électrodes (MEA). Ces enregistrements nous ont permis de révéler que des décharges spontanées de type interictal (IILDs) sont générées dans une zone restreinte présentant la plus forte densité de NADs contenant de la lipofuscine. Cela suggère donc une corrélation étroite entre la densité de neurones contenant de la lipofuscine et le caractère épileptogène. De plus, nous avons pu bloquer ces IILDs avec de la gabazine, un antagoniste des récepteurs $GABA_A$, suggérant une implication de la signalisation GABAergique dans la genèse d'une activité de type interictal.

Conclusion

Dans cette étude, nous suggérons l'existence d'une corrélation entre la densité de neurones d'apparence dysmorphique contenant de la lipofuscine, et l'émergence d'activité épileptiforme. De plus, les interneurones GABAergiques semblent jouer un rôle dans la genèse de cette activité.

Contribution

Dans cet article, j'ai effectué les enregistrements *in vitro* de l'activité épileptiforme, sur le tissu post-chirurgical d'un patient, à l'aide de matrices de multi-électrodes (MEA).

Journal of Neurology
https://doi.org/10.1007/s00415-022-11024-y

ORIGINAL COMMUNICATION

Epilepsy related to focal neuronal lipofuscinosis: extra-frontal localization, EEG signatures and GABA involvement

Valerio Frazzini[1,2,3] · Bertrand Mathon[2,3,4] · Florian Donneger[2,7,8] · Louis Cousyn[1,2,3] · Aurélie Hanin[2] · V.-H. Nguyen-Michel[1] · Claude Adam[1] · Virginie Lambrecq[1,2,3] · Sophie Dupont[1,3,5] · Jean Christophe Poncer[2,7,8] · Franck Bielle[2,3,6] · Vincent Navarro[1,2,3]

Received: 11 October 2021 / Revised: 7 February 2022 / Accepted: 11 February 2022
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany 2022

Abstract

Focal neuronal lipofuscinosis (FNL) is an uncommon epileptic disorder related to an excess of lipofuscin accumulation within dysmorphic-appearing neurons (DANs), whose epileptogenic mechanisms are still poorly understood. It shares some clinical and neuroimaging similarities with focal cortical dysplasia of type IIb (FCDIIb), but it represents a different pathological entity. Here, we identified two patients with FNL among a 10-year cohort of 323 patients who underwent neurosurgery for a focal pharmacoresistant epilepsy. We describe the electroclinical, metabolic and neuropathological features of both patients with FNL who benefited from a comprehensive presurgical investigation. While the previous reports showed frontal lobe localization of the lesion, FNL was identified in the temporal lobe, in one of our patients. EEG investigations in both patients showed striking focal and rich interictal activity resembling that described in FCDIIb. Besides focal intraneuronal lipofuscin accumulation, the neuropathological analysis demonstrated that somata of DANs were surrounded by a large amount of GABAergic presynaptic buttons, suggesting the involvement of interneurons in the epileptogenicity of FNL. To further explore the role of GABAergic transmission in the generation of epileptiform activity in FNL, we performed in vitro multi-electrode array recordings on the post-surgery tissue from one patient. Spontaneous interictal-like discharges (IILDs) were identified only in the restricted area displaying the highest density of lipofuscin-containing DANs, suggesting a close correlation between the density of lipofuscin-containing neurons and epileptogenicity. Moreover, IILDs were blocked by the GABAA receptor antagonist gabazine. All together, these findings showed how GABA signaling may contribute to the generation of interictal-like activity in FNL tissue.

Keywords Lipofuscinosis · Focal seizures · SEEG · Dysmorphic appearing neurons · Focal cortical Dysplasia · MEA · GABA

Abbreviations

DANs	Dysmorphic-appearing neurons
FCDIIb	Focal cortical dysplasia of type IIb
FLE	Frontal lobe epilepsy
FNL	Focal neuronal lipofuscinosis
STG	Superior temporal gyrus
MEA	MultiElectrode Array

Franck Bielle and Vincent Navarro contributed equally to this work.

✉ Vincent Navarro
vincent.navarro@aphp.fr

[1] Epilepsy Unit, Department of Neurology and EEG Unit, Department of Clinical Neurophysiology, AP-HP, Pitié Salpêtrière Hospital, Reference Center for Rare Epilepsies, 75013 Paris, France

[2] Paris Brain Institute, ICM, INSERM, CNRS, 75013 Paris, France

[3] Sorbonne Université, 75013 Paris, France

[4] Department of Neurosurgery, AP-HP, Pitié Salpêtrière Hospital, 75013 Paris, France

[5] Rehabilitation Unit, AP-HP, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France

[6] Department of Neuropathology, AP-HP, Pitié Salpêtrière Hospital, 75013 Paris, France

[7] Inserm UMR-S 1270, 75005 Paris, France

[8] Institut du Fer À Moulin, 75005 Paris, France

Published online: 07 March 2022

Introduction

Focal neuronal lipofuscinosis (FNL) corresponds to an excess of lipofuscin accumulation within dysmorphic-appearing neurons (DANs) and was described as the pathological hallmark of a distinct type of pharmaco-resistant frontal lobe epilepsy (FLE) [1, 2]. While FNL shares some clinical and neuroimaging features with focal cortical dysplasia of type IIb (FCDIIb), it represents a different neuropathological entity currently described in seven patients [1, 3]. To date, it is still unclear if FNL displays peculiar ictal or interictal electrophysiological features and little is known about the basis of its epileptogenicity. Here, we describe the electroclinical, metabolic and neuropathological features of two patients with focal pharmaco-resistant epilepsy due to FNL who benefited from a comprehensive presurgical investigation. Post-surgical specimen from one patient was further explored using multi-electrode array recordings in vitro to explore the microscopic organization of the locally generated epileptiform activity. The goal of the study is to offer a multilevel description of this challenging epileptogenic pathology with particular emphasis on the relationship between neurophysiological and neuropathological features.

Methods

We screened all patients who underwent epilepsy surgery between January 2010 and December 2020 in the Pitié-Salpêtrière Hospital and for which neuropathological examinations were available. On a total of 323 patients, we identified 2 patients whose histological examination revealed microscopic abnormalities compatible with FNL. Both patients underwent a complete presurgical evaluation in the Epileptology Unit of the Pitié-Salpêtrière Hospital. It included 3 T brain MRI, 27-electrode long-term video-EEG recordings (MicroMed System, Italy) and interictal 18FDG-PET. Interictal and ictal (SISCOM) Tc-99 m-HMPAO SPECT evaluation were performed in both patients. For patient 1, we conducted an intracerebral SEEG investigation exploring the right temporal, parietal and occipital lobes. Nine intracerebral electrodes (AdTech®) were inserted using the robotic ROSA® device (Medtech). Signals were continuously and synchronously recorded at 4 kHz using a hardware filter at 0.01 Hz (Atlas Recording System; NeuraLynx, Tucson, AZ, USA). Post-implantation electrode locations were based on a pre-implantation 3 T 3D-MRI, post-implantation 1.5 T 3D-MRI and CT scan, integrated using the Epiloc toolbox, an in-house developed plugin for the 3D-Slicer visualization software. The study design and report are in accordance with the STROBE statement [4].

Neuropathology

After surgery, brain specimens were formalin-fixed and paraffin-embedded. Three micrometers-thick tissue sections were studied by hematoxylin–eosin, Periodic Acid Schiff (PAS) and Luxol blue stainings or were processed for immunostainings by a fully automated stainer Ultra (Ventana, Roche) using diaminobenzidine as a chromogen and the following primary antibodies and dilutions: monoclonal mouse anti-non phosphorylated neurofilament SMI32 (Biolegend, 1/1000), mouse monoclonal anti-p62 (Becton Dickinson, 1/500), polyclonal rabbit anti-glutamate decarboxylase 65 & 67 (Sigma, 1/3000).

Human tissue and multi-electrode recordings

A written consent was obtained for the in vitro study, according to a procedure validated by the national ethical committee (TIPI project, INSERM C16-16). Cortical specimens collected in the operating room were immediately transported in ice-cold (0–4 °C), oxygenated solution (O2/CO2 95/5%), containing (in mM): N-methyl-d-glucamine 93, KCl 2.5, NaH2PO4 1.2, NaHCO3 30, HEPES 20, D-glucose 20, ascorbic acid 5, sodium pyruvate 3, MgSO4 10 and CaCl2 0.5 (300–310 mOsm, pH 7.4) and transported within 15 min to the laboratory. Transverse cortical slices (400 µm thick) were prepared in the same solution using a vibratome (HM650V, Microm). They were maintained at 37 °C in an interface chamber containing artificial cerebrospinal fluid (ACSF) composed of (in mM): D-glucose 10, KCl 3.5, NaHOC3 26, NaH2PO4 1.25, NaCl 126, CaCl2 1.6 and MgCl2 1.2 (290 mOsm), equilibrated with 5% CO2 in 95% O2. Multielectrode array recordings were performed using a MEA2100 station (Multi Channel Systems) equipped with a 120-microelectrode array chamber (12 × 12 layout, 30 µm titanium nitride electrodes spaced 100 µm). Slices were maintained in the recording chamber using a home-made platinum-nylon harp and superfused with pre-warmed (37 °C) oxygenated ACSF at a rate of 6 ml/min. Slices were imaged using a video-microscope table (MEA-VMT1, Multi Channel Systems) to register the location of electrodes with respect to the slice. Extracellular signals were acquired at a sampling rate of 10 kHz and post-hoc filtered with a low pass Bessel filter (order 2; 40 Hz) using Multi Channel Experimenter (MultiChannelSystems). Analyses were performed offline using homemade software (Matlab, The Mathworks).

Results

Clinical presentation

Patient 1, a 24-year-old woman, suffered from focal epilepsy since the age of 12. Seizures consisted of dizziness and spatiotemporal disorientation, followed by loss of awareness and atonia, sometimes associated with falls. Patient 2, a 30-year-old woman, developed focal seizures since the age of 3 months. A mild right hemiplegia appeared during the second year of life. Seizures were controlled by pharmacological treatment until the age of 26, then the patient experienced a progressive increase in seizure frequency. Seizures usually consisted of paresthesia of the right hemi-body, including the face, followed by hypertonic contraction and then clonus of the upper limb. Awareness was preserved.

Structural and metabolic imaging

In patient 1, brain MRI was normal (Fig. 1a, left). Brain ^{18}FDG-PET found a right temporal hypometabolism including the lateral cortex, up to the parieto-temporal junction

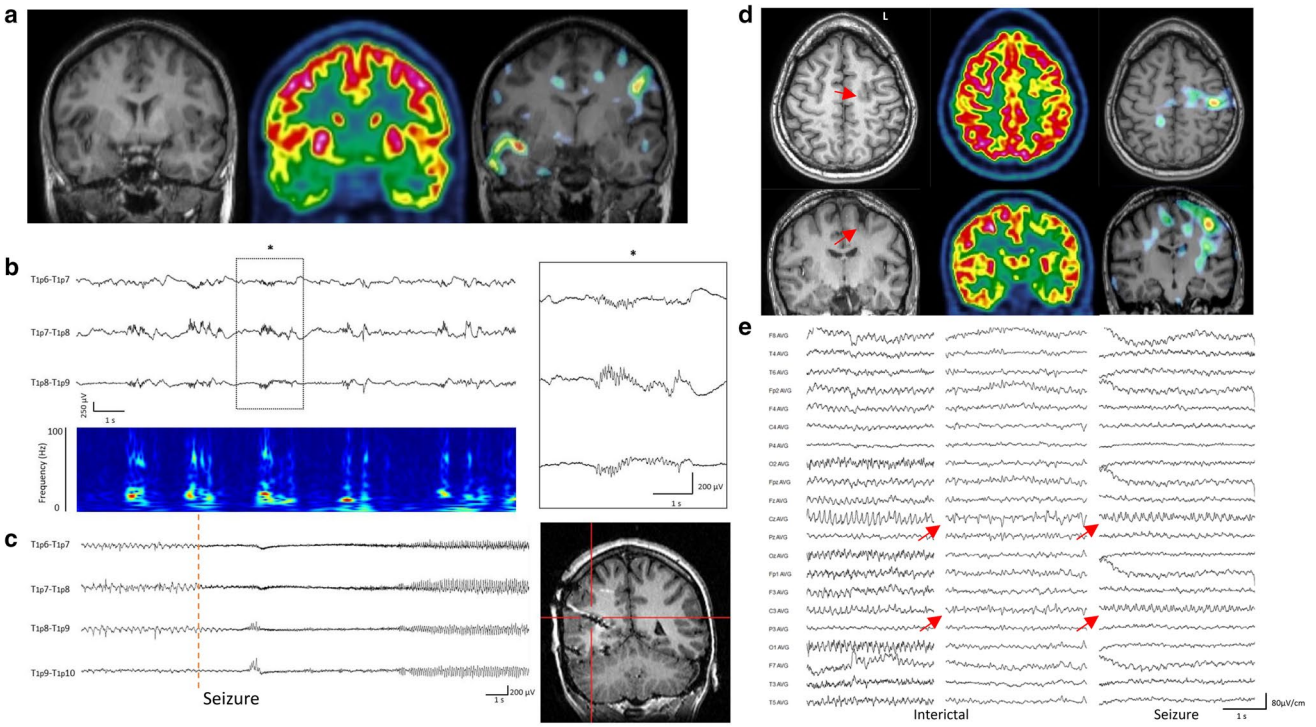


Fig. 1 Imaging, metabolic and electrophysiological features of two epileptic patients with a final diagnosis of FNL. **a**, Brain MRI and metabolic imaging from patient 1. Left panel: anatomical T1WI MRI showing no obvious lesion. Middle Panel: interictal PET showing hypometabolism in the right temporal lobe. Right panel: ictal versus interictal SPECT showing an area of hyperperfusion in the right temporopolar cortex, in particular within the superior temporal gyrus. The radiotracer was injected 27 s after the seizure onset. **b**, Interictal pattern recorded from contacts 6 to 9 of the intracerebral electrode located in the right superior temporal gyrus (see brain location on the right part of panel **c**). Interictal activity consisted of periodic discharges of fast oscillations superimposed on isolated or repetitive slow waves, sometime entangled with isolated epileptic spikes. The insert shows a magnification of the sEEG trace enclosed in the dotted rectangle. T1p: *T1* superior temporal gyrus, *p* posterior. sEEG signals are showed in bipolar montage. Lower panel: Time–Frequency Analysis (TFA) of interictal sEEG signal showed overhead (T1p7–8 channel). TFA showed periodic modulation of frequency power at around 30 Hz together with spots of higher frequency power up to 80 Hz. **c**, Left panel: Representative trace of a seizure from patient 1. Seizures were found to originate from brain tissue around the contacts 6–7-8 of the electrode T1p, and consisted of a low voltage fast activity. Right panel: Anatomical MRI showing the trajectory of the intracerebral electrode exploring the posterior part of the right superior temporal lobe. **d**, Brain MRI and metabolic imaging from patient 2. Left, upper and lower panel: axial and coronal view of brain T1WI MRI. Discrete focal blurring of the cortico-subcortical junction of the bottom of the superior left frontal sulcus (red arrow). Middle, upper and lower panel: axial and coronal view of the ^{18}FDG-PET showing hypometabolism of the left superior frontal sulcus. Right, upper and lower panel: axial and coronal view of the ictal versus interictal SPECT disclosing an area of cortical hyperperfusion centered on the lesion and the left inferior pre-central cortex. **e**, Representative traces of interictal and ictal scalp EEG of patient 2. EEG showed intermittent low amplitude rhythmic spiky activity at 6–7 Hz, on the left fronto-central and anterior midline electrodes (left panel). Interictal activity can also acquire a pseudoperiodic, short interval, appearance (middle panel). During seizures (right panel), the rhythmic ictal abnormalities showed a peculiar "sawtooth" morphology. EEG signals are showed with an average reference montage

and the pericentral region (Fig. 1a, middle panel). Ictal versus interictal SPECT (SISCOM) disclosed a hyperperfused area in the right temporopolar cortex, predominating in the superior temporal gyrus (STG; Fig. 1a right). In patient 2, brain MRI demonstrated a focal blurring at the cortico-subcortical junction of the bottom of the superior left frontal sulcus (Fig. 1d, left panel). This lesion was hypometabolic on ^{18}FDG-PET (Fig. 1d, middle). Ictal versus interictal SPECT disclosed a cortical hyperperfusion involving the lesion, extending to the homolateral inferior pre-central cortex (Fig. 1d, right panel).

EEG investigations

In patient 1, surface EEG disclosed spikes and sharp waves on the right temporal lobe. Based on the electrophysiological and metabolic features, the patient 1 underwent to a first intracranial investigation (stereoelectroencephalography, SEEG) exploring the left lateral and antero-basal temporal cortices, the left temporal pole, the left amygdalohippocampal complex and entorhinal cortex. Left orbitofrontal cortex was also explored. This SEEG investigation did not identify the origin of seizures, pointing to a more posterior location of the seizure onset zone (SOZ). A second SEEG investigation explored the posterior part of the left temporal lobe, the temporo-occipital junction and the left inferior parietal lobule (Supplementary Fig. 1). This latter SEEG investigation identified a highly active focus of interictal epileptiform discharges in the posterior part of the right STG (Fig. 1b). They consisted of quasi-continuous periodic spikes and spikes and waves with superimposed short-lasting bursts of fast activity during wakefulness. The latter increased dramatically during non-REM sleep, and appeared as short-interval (1–2 s), periodic discharges at 80 Hz oscillations (brushes), alternating with transient suppression of background activity (Fig. 1b). Recorded seizures consisted of a low voltage fast activity at seizure onset and originated from the same contacts where the interictal discharges (IIDs) were identified. (Fig. 1c). In patient 2, scalp EEG showed quasi-continuous rhythmic (6–7 Hz), low amplitude spikes/sharp waves interictal epileptiform discharges, on the left fronto-central electrodes (Fig. 1e). Seizures mainly occurred during sleep and consisted of a left frontocentral rhythmic ictal activity with a "sawtooth" morphology (Fig. 1e, right panel).

Surgery outcome

In patient 1, surgical cortectomy removed the posterior part of right STG (Fig. 2a, left right part). In patient 2, surgery removed the bottom of the posterior part of the superior left frontal sulcus (Fig. 2b, right panel). No significative reduction of seizure frequency was achieved after one year since surgery (ILAE Class 5) in both patients. These results are in line with previous observation on FNL surgery [1].

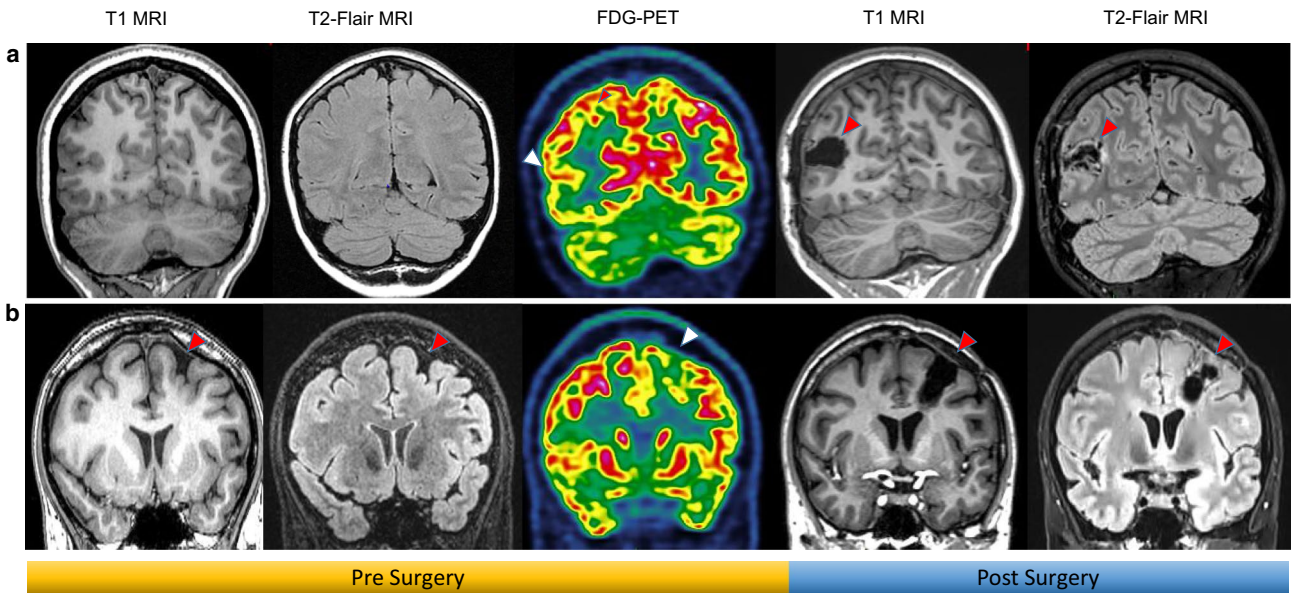


Fig. 2 Pre and Post-surgery neuroimaging showing the postsurgical cavity. **a** (from the left to the right): presurgical T1WI and T2 Flair WI from patient 1, showing no evident macroscopic focal lesion. Interictal ^{18}FDG-PET showing the posterior part of the right temporal hypometabolism. Post-surgery T1WI and T2 Flair MRI showing the post-surgical cavity located in the posterior part of right STG. **b**, Presurgical T1WI and T2 Flair WI from patient 2, showing a focal blurring at the cortico-subcortical junction of the bottom of the superior left frontal sulcus. Interictal ^{18}FDG-PET showing a focal hypometabolism associated to the lesion. Post-surgery T1WI and T2 Flair MRI showing the post-surgical cavity located in the bottom of the posterior part of the superior left frontal sulcus

Both patients underwent a second surgical intervention to remove the tissue surrounding the previous postsurgical cavity. These surgeries did not modify seizure frequency in both patients after the following months.

Neuropathological study

In both patients, neuropathological analysis of first postsurgical specimens disclosed enlarged, pyramidal or globoid neurons resembling DANs (Fig. 3a). The cytoplasm of DANs was markedly distended, showing intracellular granular material on hematoxylin–eosin. Granular material was both PAS and Luxol blue positive, suggesting excessive lipofuscin accumulation (Fig. 3b). All DANs were negative for anti-GAD staining, suggesting that they were not interneurons (Fig. 3b). p62—a protein involved in ubiquitin-proteasome system and in autophagy [5, 6]—was weakly expressed in DANs, in contrast to the strong expression found in abnormal cells of FCDIIb (Fig. 3a) [1]. The somata of lipofuscin-containing DANs were surrounded by crown-like, GAD-immunopositive puncta, compatible with peri-somatic GABAergic presynaptic buttons (Fig. 3b and c). Interestingly, no normal pyramidal neuron in the specimen showed a similar morphological feature (Fig. 3b). In both patients, lipofuscin-containing neurons showed a heterogeneous distribution within the resected tissues. Some lipofuscin-containing DANs were organized in clusters while others appeared as isolated cells. The resected tissue was fragmented, which did not allow to control the presence of neuronal lipofuscinosis at margins of the resections. The neuropathological examination of cerebral specimens after second surgery showed rare lipofuscine-containing neurons for patient 1 and no pathological neuron for patient 2.

In vitro electrophysiological recordings from post-surgery human tissue from patient 1

To correlate these morphological features with neuronal activity, we next performed in vitro recordings from the second postsurgical specimens from patient 1 using multielectrode arrays. Spontaneous, periodic (1.2 Hz), interictal-like discharges (IILDs) were identifiable in a restricted area of the slice (red electrodes in Fig. 4a). Upon application of a pro-convulsive extracellular solution (9 mM K+; 0.25 mM

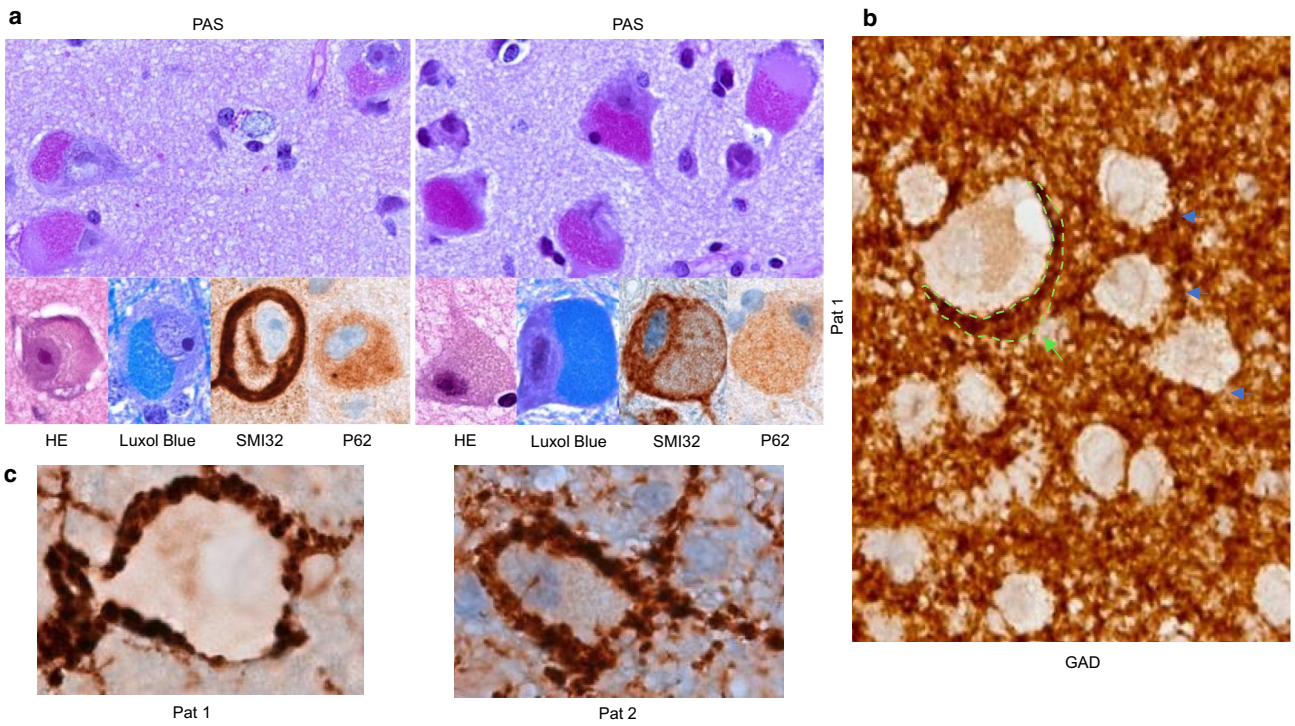


Fig. 3 Neuropathological analysis of the postsurgical specimen from Patient 1 and 2. **a**, Upper pictures: periodic Acid Schiff (PAS) coloration. In both patients dysmorphic-appearing neurons (DANs) showed intracytoplasmic granular accumulation on PAS. Lower pictures: intracytoplasmic granular accumulation was also stained by hematoxylin–eosin and displayed Luxol blue positivity, all suggesting of lipofuscin material. DANs showed strong ring-like labeling with anti-neurofilament SMI32 antibodies. DANs showed a weak positivity for p62. **b**, Anti-GAD staining revealed that DANs neurons are not inhibitory cells. DANs were surrounded by multiple extracellular, perisomatic puncta, compatible with presynaptic GABAergic boutons. This finding was observed only around DANs (dotted green lines with arrow), and not around neurons of normal appearance (blue arrows). **c**, Perisomatic GABA staining of the DANs was found in both patients

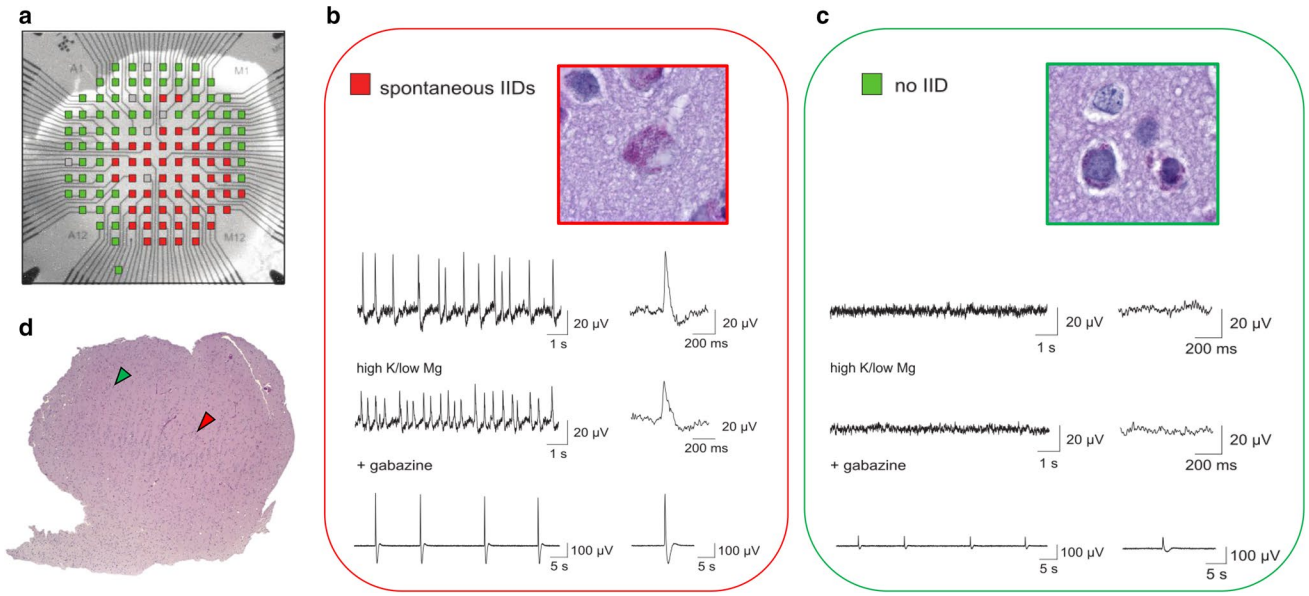


Fig. 4 Gabazine suppresses spontaneous interictal-like discharges (IILDs) recorded in vitro in human FNL tissue. **a**, Example of a cortical slice from a post-operative tissue, recorded on a 120-channel multielectrode array. The schematic representation of the electrode layout is superimposed on the image of the slice. Electrodes recording spontaneous IILDs are shown in red whereas those without IILDs are shown in green. Noisy electrodes are represented in grey and were not used for recording. Note that the epileptogenic zone is restricted to a portion of the slice. **d**, Same slice as in A, stained with PAS for lipofuscin visualization. Arrows indicate the sites from which insets in panels **b–c** were obtained. **b–c**, Representative local field potential recordings from both spontaneously active (**b**, red) and inactive (**c**, green) areas from the slice shown in panels **a–d**. Insets, magnification of the areas indicated with red (**b**) and green (**c**) arrows, respectively, in panel **d**. Note the presence of a dysmorphic neuron containing a strong intracytoplasmatic lipofuscin staining (purple) in the spontaneously active area. Top traces, spontaneous IILDs represented on different timescales, recorded from a red (**b**) but not a green (**c**) electrode. Middle traces, upon perfusion with a pro-convulsive solution (9 mM K+, 0.25 mM Mg2+, 1.6 mM Ca2+), the frequency of IILDs increased while their amplitude was reduced. No activity was induced in areas without spontaneous IILDs. Lower traces, upon addition of gabazine (10 µM), IILDs were suppressed and replaced with large amplitude, rhythmic, LFP oscillations spreading throughout the slice

Mg2+, 1.6 mM Ca2+), the frequency of IILDs increased by 27% whereas their amplitude decreased by 58% (Fig. 4b). However, no ictal-like activity was induced outside the spontaneously active area. Importantly, this area also displayed the highest density of lipofuscin-containing DANs (Fig. 4b, red arrow; Fig. 4c, red contoured square) which were virtually absent from the silent areas (Fig. 3b, green arrow; Fig. 4d, green contoured square). These findings suggest a correlation between the density of lipofuscin-containing neurons and epileptogenicity. Finally, since DANs were surrounded by a high density of putative perisomatic GABAergic synaptic boutons, we tested the role of GABA signaling in the generation of epileptic activity. Thus, application of the specific GABAA receptor antagonist gabazine (10 µM) resulted in the complete suppression of epileptiform activity detected on previously active electrodes and the emergence of slow, high-amplitude LFP oscillations in the whole slice.

Discussion

FNL is a rare and recently described pathology [1, 2]. According to the reports of a total of seven patients, FNL was systematically located in the frontal lobes. Here, we report that FNL can also be identified in the temporal lobe, as shown in one of our two patients. Previous reports did not provide details on EEG findings. Here, we report, in both patients, strikingly focal and rich interictal EEG activities. They consisted of focal rhythmic or periodic interictal epileptiform discharges resembling those described in FCDIIb [7, 8]. However, in line with the previous reports on FNL [1], surgical outcome was not satisfying in our two patients, when compared to that observed with FCD patients [1, 2, 8]. It is not clear whether these differences are due to a greater difficulty in

correctly delineating and resecting the affected tissue or to differences in network organizations around the lesion as compared with FCDIIb. Neuropathological examination of post-operative tissues from both patients showed intraneuronal lipofuscin accumulation within dysmorphic neurons, a hallmark of FNL. In line with a previous report, post-surgical tissues from our patients revealed a cortical and juxtacortical location of FNL 1 [1, 2]. Contrary to FCDIIb, lipofuscin-containing DANs were less clustered, appearing as small group of pathological cells as well as isolated ones. In addition, all DANs were GAD-immunonegative, suggesting they were not GABAergic interneurons (Fig. 3c). In contrast, their soma were surrounded by a crown-like zone of dense GABAergic presynaptic buttons. This suggested GABAergic interneurons may either contribute to the epileptogenicity of FNL or, impose an inhibitory restraint to the propagation of epileptiform activity [12–14], or both. A similar organization was reported in FCDIIb, where interneurons provide increased GABAergic innervation of DANs [9, 10]. In addition, hypertrophic basket formations established by putative parvalbumin interneurons also surround DANs in FCDs [11]. The contribution of GABAergic interneurons to epileptic activity is, however, a highly dynamic and multifaceted process. Thus, whereas GABA-mediated inhibition may prevent the spread of epileptic activity [12–14], GABAA receptor-mediated currents can also paradoxically promote epileptiform activity [15] due to altered neuronal chloride homeostasis resulting in depolarizing and excitatory GABA signaling [20, 21]. Consistent with this scenario, spontaneous seizure generation in vivo was associated with increased GABAergic interneuron activity preceding pyramidal neuron activity [16]. In human FCD tissue recorded in vitro, epileptiform activity was initiated by synchronizing mechanisms relying on GABAA receptors [16–19]. Our in vitro data from FNL resective tissue demonstrate that the epileptogenic zone is confined within a highly restricted area enriched in lipofuscin-rich neurons. In addition, we showed that spontaneous IILDs were blocked by the GABAA receptor antagonist gabazine which, however, induced widespread, large amplitude LFP oscillations beyond the limits of the spontaneously active area. These observations suggest GABA signaling in FNL tissue may both contribute to the generation of interictal-like activity and constrain the spreading of synchronous, epileptiform activity. In conclusion, we suggest that FNL is not exclusive of FLE but can be found in other types of focal epilepsies such as temporal lobe epilepsy. Although FNL and FCDIIb represent two distinct pathologies, they share some neuropathological and electrophysiological features. Histological analyses reveal an abnormal density of GABAergic terminals around the soma of lipofuscin-containing DANs, suggesting a role of GABAergic interneurons in epileptic activities. In vitro electrophysiological recordings from resected tissue further supported this hypothesis.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1007/s00415-022-11024-y.

Funding This work received support from the "Investissements d'avenir" program ANR-10-IAIHU06, and from the Fondation Assistance Publique Hôpitaux de Paris (EPIRES—Marie Laure PLV Merchandising)

Declarations

Conflicts of interest On behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest. We confirm that we have read the journal's position on issues involved in ethical publication and affirm that this report is consistent with those guidelines. Valerio Frazzini, Bertrand Mathon, Florian Donneger, Louis Cousyn, Aurélie Hanin, Vi-Huong Nguyen-Michel, Claude Adam, Virginie Lambrecq, Jean Christophe Poncer reports no disclosure. Sophie Dupont reports fees from Boards with UCB Pharma, EISAI, Liva Nova, GW Pharma, Takeda, Novartis. Franck Bielle reports funding of research out of the scope of this article by Abbvie, a next-of-kin employed by Bristol-Myers Squibb, fees of travel and conference out of the scope of this article by Bristol-Myers Squibb, Vincent Navarro reports fees from Boards with UCB Pharma, EISAI, Liva Nova, GW Pharma.

Ethical approval The study was performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

References

1. Liu JY, Reeves C, Diehl B et al (2016) Early lipofuscin accumulation in frontal lobe epilepsy. Ann Neurol 80(6):882–895
2. Mhatre R, Jagtap SA, Kurwale N, Santhoshkumar R, Deshmukh Y, Mahadevan A (2020) Frontal lobe epilepsy with focal neuronal lipofuscinosis—case report of a rare entity. Epilepsy Behav Rep. 14:100369
3. Blümcke I, Thom M, Aronica E et al (2011) The clinicopathologic spectrum of focal cortical dysplasias: a consensus classification proposed by an ad hoc task force of the ILAE diagnostic methods commission. Epilepsia 52(1):158–174
4. Cuschieri S (2019) The STROBE guidelines. Saudi J Anaesth 13(1):S31–S34
5. Iyer A, Prabowo A, Anink J et al (2014) Cell injury and premature neurodegeneration in focal malformations of cortical development. Brain Pathol 24:1–17
6. Ichimura Y, Komatsu M (2010) Selective degradation of p62 by autophagy. Semin Immunopathol 32:431–436
7. Epitashvili N, San Antonio-Arce V, Brandt A et al (2018) Scalp electroencephalographic biomarkers I epilepsy patients with focal cortical dysplasia. Ann Neurol 84(4):564–575
8. Tassi L, Garbelli R, Colombo N et al (2012) Electroclinical, MRI and surgical outcomes in 100 epileptic patients with type II FCD. Epileptic Disord 14(3):257–266
9. Garbelli R, Munari C, De Biasi S, Vitellaro-Zuccarello L, Galli C, Bramerio M, Mai R, Battaglia G, Spreafico R (1999) Taylor's cortical dysplasia: a confocal and ultrastructural immune histochemical study. Brain Pathol 9:445–461

10. Tassi L, Colombo N, Garbelli R, Francione S, Lo Russo G, Mai R, Cardinale F, Cossu M, Ferrario A, Galli C, Bramerio M, Citterio A, Spreafico R (2002) Focal cortical dysplasia: neuropathological subtypes, EEG, neuroimaging and surgical outcome. Brain 125:1719–1732
11. Alonso-Nanclares L, Garbelli R, Sola RG, Pastor J, Tassi L, Spreafico R, DeFelipe J (2005) Microanatomy of the dysplastic neocortex from epileptic patients. Brain 128:58–173
12. Schevon CA, Weiss SA, McKhann G, Goodman RR, Yuste R, Emerson RG (2012) Evidence of a inhibitory restraint of seizure activity in humans. Nat Commun 3:1060
13. Trevelyan AJ, Sussillo D, Watson BO, Yuste R (2006) Modular propagation of epileptiform activity: evidence for an inhibitory veto in neocortex. J Neurosci 26(48):12447–12455
14. Trevelyan AJ, Sussillo D, Yuste R (2007) Feedforward inhibition contributes to the control of epileptiform propagation speed. J Neurosci 27:3383–3387
15. Avoli M, de Curtis M (2011) GABAergic synchronization in the limbic system and its role in the generation of epileptiform activity. Prog Neurobiol 95(2):104–132
16. Elahian B, Lado NE, Mankin E, Vangala S, Misra A, Moxon K, Fried I, Sharan A, Yeasin M, Staba R, Bragin A, Avoli M, Sperling M, Engel J, Weiss SA (2018) Low-voltage fast seizures in humans begin with increased interneuron firing. Ann Neurol 84(4):588–600
17. Andre VM, Flores-Hernandez J, Cepeda C, Starling AJ, Nguyen S, Lobo MK, Vinters HV, Levine MS, Mathern GW (2004) NMDA receptor alterations in neurons from pediatric cortical dysplasia tissue. Cereb Cortex 14:634–646
18. Cepeda C, Chen JC, Wub JY, Fisher RS, Vinters HV, Mathern GW, Levine MS (2014) Pacemaker GABA synaptic activity may contribute to network synchronization in pediatric cortical dysplasia. Neurobiol Dis 62:208–217
19. Avoli M, Louvel J, Mattia D, Olivier A, Esposito V, Pumain R, D'Antuono M (2003) Epileptiform synchronization in the human dysplastic cortex. Epileptic Disord 5(Suppl 2):45–50
20. Lévesque M, Ragsdale D, Avoli M (2019) Evolving mechanistic concepts of epileptiform synchronization and their relevance in curing focal epileptic disorders. Curr Neuropharmacol 17(9):830–842
21. Cohen I, Navarro V, Clemenceau S, Baulac M, Miles R (2002) On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. Science 298:1418–1421

Article 5:

Ablation thérapeutique ciblée des cellules pathogènes dans l'épilepsie neurodéveloppementale

Introduction

Les malformations corticales sont souvent associées à une épilepsie pédiatrique pharmacorésistante (Desikan and Barkovich, 2016). Dans ce cas, la seule option possible pour contrôler les crises reste la chirurgie. Parmi les enfants opérés pour une épilepsie, la dysplasie corticale focale de type II (FCDII) reste la malformation corticale la plus fréquente (Blumcke et al., 2017). La FCDII est causée par des mutations somatiques postzygotiques, impliquant la voie mTOR, qui produisent des cellules cytomégaliques anormales, telles que des neurones dysmorphiques et des cellules « ballons ». Ces cellules, et en particulier les neurones dysmorphiques, pourraient jouer un rôle central dans le déclenchement des crises (Abdijadid et al., 2015). L'identification des altérations moléculaires et des biomarqueurs potentiels de ces cellules apparaît donc essentielle pour mieux comprendre la pathogenèse de la FCD et envisager de nouveaux traitements.

Objectif

Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Stéphanie Baulac à l'ICM, j'ai contribué à une étude visant à examiner les caractéristiques moléculaires, cellulaires, et électrophysiologiques des cellules FCDII anormales, à la fois sur du tissu réséqué de patients atteints de FCDII, et dans des modèles murins de la pathologie.

Résultats

Nous avons mis en évidence, par le biais d'enregistrement de tissu réséqué de patients atteints de FCDII par matrices de multi-électrodes, que l'activité épileptiforme est corrélée à la densité de neurones dysmorphiques, ce qui confirme leur rôle pro-épileptogène.

L'article étant actuellement en révision, le reste des données est confidentiel.

Contribution

Dans cet article, j'ai effectué les enregistrements *in vitro* de l'activité épileptiforme, sur le tissu post-chirurgical d'un patient, à l'aide de matrices de multi-électrodes (MEA)

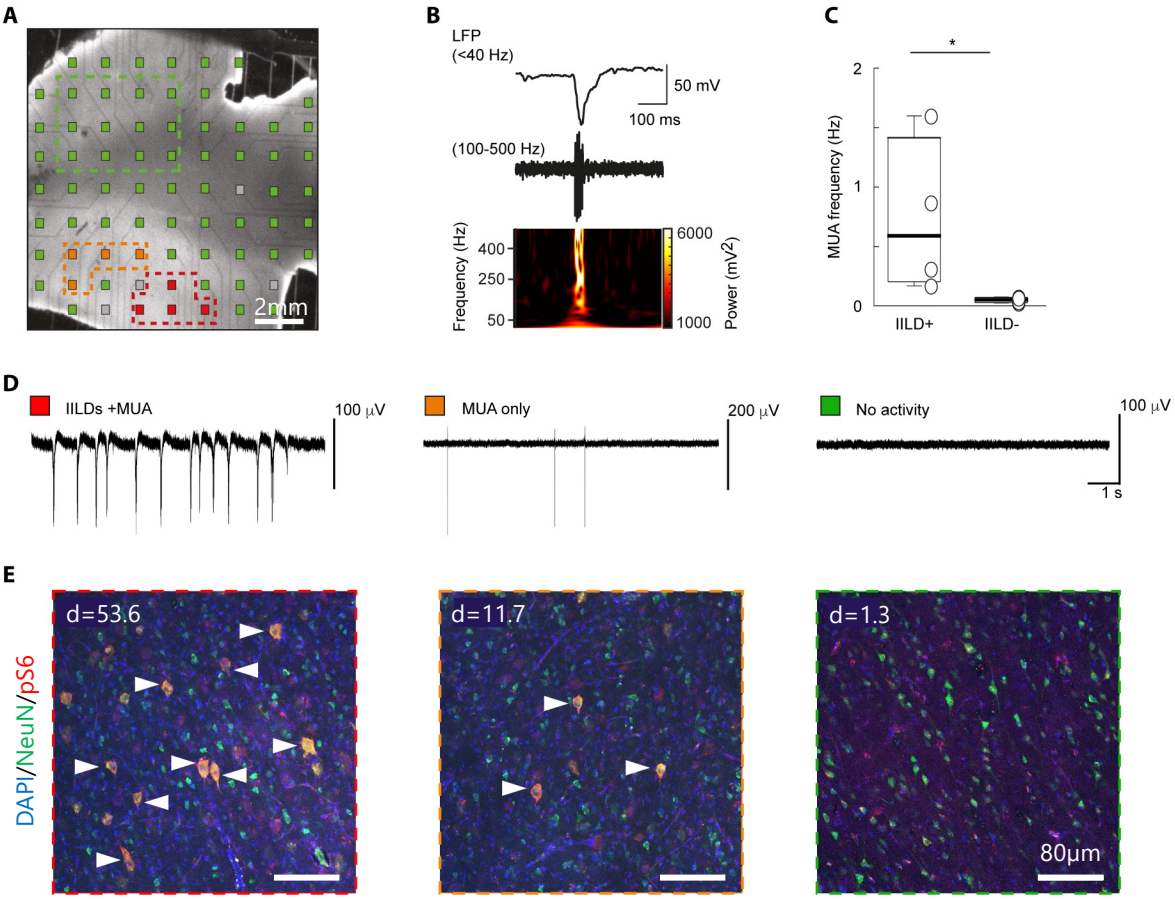


Fig. 1. Spontaneous interictal-like activity and dysmorphic neurons topography in human FCDIIb brain resected tissue.

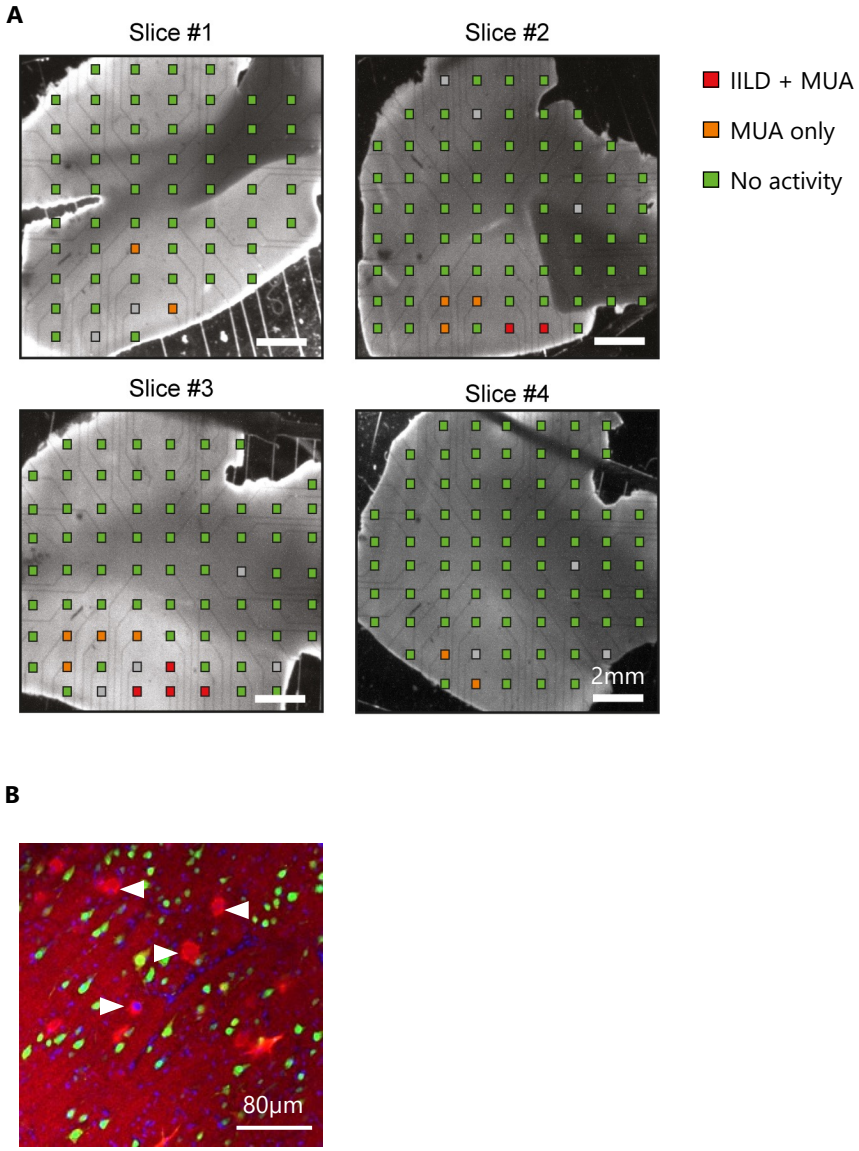


Fig. S1. Cortical activity and histology in human FCDIIb resective tissue.

Figure Legends

Fig. 1. Spontaneous interictal-like activity and dysmorphic neurons topography in human FCDIIb brain resected tissue. (**A**) Micrograph of a cortical slice (slice #3) of resected brain tissue from an FCDIIb patient (ID#8) showing multi-electrode array (MEA) layout. Electrodes are color-coded to show the type of activity detected (red: interictal-like discharges (IILDs) and multi-unit activity (MUA), orange: MUA only, green: no activity, grey: defect electrodes). Scale bar: 2mm. (**B**) Top: representative local field potential (LFP) recording of an IILD, lowpass (<40Hz) and high-pass (>100Hz) filtered to reveal associated high-frequency oscillations (100-500Hz). Bottom: time-frequency plot of the IILD shown above. (**C**) Mean MUA frequency recorded in slice #3 from electrodes displaying IILDs or not. *$p<0.05$, Mann-Whitney rank sum test. **(D)** Representative recordings from electrodes shown in (A). MUA was recorded only within and in the vicinity of the area displaying spontaneous IILDs. (**E**) Immunofluorescent staining from slice #3 with antibodies against pS6 and NeuN in regions delineated by color-coded dashed lines in (A). Scale bar: 80µm. d: density = number of dysmorphic neurons per mm^2.

Fig. S1. **Cortical activity and histology in human FCDIIb resective tissue. (A)** Micrographs of 4 adjacent cortical slices of resected brain tissue from an FCDIIb patient (ID#8) showing multi-electrode assay (MEA) layout. Electrodes are color-coded as in Fig. 1 to show the type of activity detected. Slice #3 is illustrated in Fig. 1. Scale: 2mm. **(B)** Representative image of pS6 and NeuN staining in the area containing balloon-cells at the grey-white matter boundary. White arrows indicate round-shaped cytomegalic pS6+/NeuN- balloon-cells. Scale bar: 80µm.

Bibliographie

Abbas, L., Whitfield, T.T., 2009. Nkcc1 (Slc12a2) is required for the regulation of endolymph volume in the otic vesicle and swim bladder volume in the zebrafish larva. Development 136, 2837–2848.

Abdijadid, S., Mathern, G.W., Levine, M.S., Cepeda, C., 2015. Basic mechanisms of epileptogenesis in pediatric cortical dysplasia. CNS Neurosci. Ther. 21, 92–103.

Abou-Khalil, B., Auce, P., Avbersek, A., Bahlo, M., Balding, D.J., Bast, T., Baum, L., Becker, A.J., Becker, F., Berghuis, B., Berkovic, S.F., Boysen, K.E., Bradfield, J.P., Brody, L.C., Buono, R.J., Campbell, E., Cascino, G.D., Catarino, C.B., Cavalleri, G.L., Cherny, S.S., Chinthapalli, K., Coffey, A.J., Compston, A., Coppola, A., Cossette, P., Craig, J.J., de Haan, G.-J., De Jonghe, P., de Kovel, C.G.F., Delanty, N., Depondt, C., Devinsky, O., Dlugos, D.J., Doherty, C.P., Elger, C.E., Eriksson, J.G., Ferraro, T.N., Feucht, M., Francis, B., Franke, A., French, J.A., Freytag, S., Gaus, V., Geller, E.B., Gieger, C., Glauser, T., Glynn, S., Goldstein, D.B., Gui, H., Guo, Y., Haas, K.F., Hakonarson, H., Hallmann, K., Haut, S., Heinzen, E.L., Helbig, I., Hengsbach, C., Hjalgrim, H., Iacomino, M., Ingason, A., Jamnadas-Khoda, J., Johnson, M.R., Kälviäinen, R., Kantanen, A.-M., Kasperavičiūte, D., Kasteleijn-Nolst Trenite, D., Kirsch, H.E., Knowlton, R.C., Koeleman, B.P.C., Krause, R., Krenn, M., Kunz, W.S., Kuzniecky, R., Kwan, P., Lal, D., Lau, Y.-L., Lehesjoki, A.-E., Lerche, H., Leu, C., Lieb, W., Lindhout, D., Lo, W.D., Lopes-Cendes, I., Lowenstein, D.H., Malovini, A., Marson, A.G., Mayer, T., McCormack, M., Mills, J.L., Mirza, N., Moerzinger, M., Møller, R.S., Molloy, A.M., Muhle, H., Newton, M., Ng, P.-W., Nöthen, M.M., Nürnberg, P., O'Brien, T.J., Oliver, K.L., Palotie, A., Pangilinan, F., Peter, S., Petrovski, S., Poduri, A., Privitera, M., Radtke, R., Rau, S., Reif, P.S., Reinthaler, E.M., Rosenow, F., Sander, J.W., Sander, T., Scattergood, T., Schachter, S.C., Schankin, C.J., Scheffer, I.E., Schmitz, B., Schoch, S., Sham, P.C., Shih, J.J., Sills, G.J., Sisodiya, S.M., Slattery, L., Smith, A., Smith, D.F., Smith, M.C., Smith, P.E., Sonsma, A.C.M., Speed, D., Sperling, M.R., Steinhoff, B.J., Stephani, U., Stevelink, R., Strauch, K., Striano, P., Stroink, H., Surges, R., Tan, K.M., Thio, L.L., Thomas, G.N., Todaro, M., Tozzi, R., Vari, M.S., Vining, E.P.G., Visscher, F., von Spiczak, S., Walley, N.M., Weber, Y.G., Wei, Z., Weisenberg, J., Whelan, C.D., Widdess-Walsh, P., Wolff, M., Wolking, S., Yang, W., Zara, F., Zimprich, F., The International League Against Epilepsy Consortium on Complex Epilepsies, 2018. Genome-wide mega-analysis identifies 16 loci and highlights diverse biological mechanisms in the common epilepsies. Nat. Commun. 9, 5269.

Acton, B.A., Mahadevan, V., Mercado, A., Uvarov, P., Ding, Y., Pressey, J., Airaksinen, M.S., Mount, D.B., Woodin, M.A., 2012. Hyperpolarizing GABAergic Transmission Requires the KCC2 C-Terminal ISO Domain. J. Neurosci. 32, 8746–8751.

Adragna, N.C., Fulvio, M.D., Lauf, P.K., 2004. Regulation of K-Cl Cotransport: from Function to Genes. J. Membr. Biol. 201, 109–137.

Agez, M., Schultz, P., Medina, I., Baker, D.J., Burnham, M.P., Cardarelli, R.A., Conway, L.C., Garnier, K., Geschwindner, S., Gunnarsson, A., McCall, E.J., Frechard, A., Audebert, S., Deeb, T.Z., Moss, S.J., Brandon, N.J., Wang, Q., Dekker, N., Jawhari, A., 2017. Molecular architecture of potassium chloride co-transporter KCC2. Sci. Rep. 7, 16452.

Aguado, F., Carmona, M.A., Pozas, E., Aguiló, A., Martínez-Guijarro, F.J., Alcantara, S., Borrell, V., Yuste, R., Ibañez, C.F., Soriano, E., 2003. BDNF regulates spontaneous correlated activity at early developmental stages by increasing synaptogenesis and expression of the K+/Cl- co-transporter KCC2. Development 130, 1267–1280.

Ahmad, B.S., Hill, K.D., O'Brien, T.J., Gorelik, A., Habib, N., Wark, J.D., 2012. Falls and fractures in patients chronically treated with antiepileptic drugs. Neurology 79, 145–151.

Ahmed, S.N., Spencer, S.S., 2004. An approach to the evaluation of a patient for seizures and epilepsy. WMJ Off. Publ. State Med. Soc. Wis. 103, 49–55.

Aihua, L., Lu, S., Liping, L., Xiuru, W., Hua, L., Yuping, W., 2014. A controlled trial of transcutaneous vagus nerve stimulation for the treatment of pharmacoresistant epilepsy. Epilepsy Behav. EB 39, 105–110.

Akerman, C.J., Cline, H.T., 2006. Depolarizing GABAergic conductances regulate the balance of excitation to inhibition in the developing retinotectal circuit in vivo. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 26, 5117–5130.

Akiyama, K., Miyashita, T., Matsubara, A., Mori, N., 2010. The Detailed Localization Pattern of Na+/K+/2Cl− Cotransporter Type 2 and Its Related Ion Transport System in the Rat Endolymphatic Sac. J. Histochem. Cytochem. 58, 759–763.

Al Awabdh, S., Donneger, F., Goutierre, M., Séveno, M., Vigy, O., Weinzettl, P., Russeau, M., Moutkine, I., Lévi, S., Marin, P., Poncer, J.C., 2022. Gephyrin Interacts with the K-Cl Cotransporter KCC2 to Regulate Its Surface Expression and Function in Cortical Neurons. J. Neurosci. 42, 166–182.

Ala-Kurikka, T., Pospelov, A., Summanen, M., Alafuzoff, A., Kurki, S., Voipio, J., Kaila, K., 2021. A physiologically validated rat model of term birth asphyxia with seizure generation after, not during, brain hypoxia. Epilepsia 62, 908–919.

AlAmri, M.A., Kadri, H., Alderwick, L.J., Jeeves, M., Mehellou, Y., 2018. The Photosensitising Clinical Agent Verteporfin Is an Inhibitor of SPAK and OSR1 Kinases. ChemBioChem 19, 2072–2080.

AlAmri, M.A., Kadri, H., Alderwick, L.J., Simpkins, N.S., Mehellou, Y., 2017a. Rafoxanide and Closantel Inhibit SPAK and OSR1 Kinases by Binding to a Highly Conserved Allosteric Site on Their C-terminal Domains. ChemMedChem 12, 639–645.

AlAmri, M.A., Kadri, H., Dhiani, B.A., Mahmood, S., Elzwawi, A., Mehellou, Y., 2017b. WNK Signaling Inhibitors as Potential Antihypertensive Drugs. ChemMedChem 12, 1677–1686.

Alfonsa, H., Merricks, E.M., Codadu, N.K., Cunningham, M.O., Deisseroth, K., Racca, C., Trevelyan, A.J., 2015. The Contribution of Raised Intraneuronal Chloride to Epileptic Network Activity. J. Neurosci. 35, 7715–7726.

Alper, S.L., 2009. Molecular physiology and genetics of Na+-independent SLC4 anion exchangers. J. Exp. Biol. 212, 1672–1683.

Alshahrani, S., Alvarez-Leefmans, F.J., Di Fulvio, M., 2012. Expression of the Slc12a1 gene in pancreatic β-cells: molecular characterization and in silico analysis. Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol. 30, 95–112.

Alshahrani, S., Fulvio, M.D., 2012. Expression of the Slc12a1 Gene in Pancreatic β-cells: Molecular Characterization and in silico Analysis. Cell. Physiol. Biochem. 30, 95–112.

Alvarez, B.V., Gilmour, G.S., Mema, S.C., Martin, B.T., Shull, G.E., Casey, J.R., Sauvé, Y., 2007. Blindness Caused by Deficiency in AE3 Chloride/Bicarbonate Exchanger. PLoS ONE 2, e839.

Alvarez-Leefmans, F.J., 2001. 20 - Intracellular Chloride Regulation, in: Sperelakis, N. (Ed.), Cell Physiology Source Book (Third Edition). Academic Press, San Diego, pp. 301–318.

Alvarez-Leefmans, F.J., Delpire, E., 2010. Preface, in: Alvarez-Leefmans, F. Javier, Delpire, E. (Eds.), Physiology and Pathology of Chloride Transporters and Channels in the Nervous System. Academic Press, San Diego, pp. ix–x.

Amin, H., Marinaro, F., De Pietri Tonelli, D., Berdondini, L., 2017. Developmental excitatory-to-inhibitory GABA-polarity switch is disrupted in 22q11.2 deletion syndrome: a potential target for clinical therapeutics. Sci. Rep. 7, 15752.

Amiry-Moghaddam, M., Ottersen, O.P., 2003. The molecular basis of water transport in the brain. Nat. Rev. Neurosci. 4, 991–1001.

Andersohn, F., Schade, R., Willich, S.N., Garbe, E., 2010. Use of antiepileptic drugs in epilepsy and the risk of self-harm or suicidal behavior. Neurology 75, 335–340.

Andersson, M., Avaliani, N., Svensson, A., Wickham, J., Pinborg, L.H., Jespersen, B., Christiansen, S.H., Bengzon, J., Woldbye, D.P.D., Kokaia, M., 2016. Optogenetic control of human neurons in organotypic brain cultures. Sci. Rep. 6, 24818.

Andrew, R.D., Labron, M.W., Boehnke, S.E., Carnduff, L., Kirov, S.A., 2007. Physiological Evidence That Pyramidal Neurons Lack Functional Water Channels. Cereb. Cortex 17, 787–802.

Anstötz, M., Fiske, M.P., Maccaferri, G., 2021. Impaired KCC2 Function Triggers Interictal-Like Activity Driven by Parvalbumin-Expressing Interneurons in the Isolated Subiculum In Vitro. Cereb. Cortex N. Y. N 1991 31, 4681–4698.

Appl, H., Holzammer, T., Dove, S., Haen, E., Strasser, A., Seifert, R., 2012. Interactions of recombinant human histamine H_1R, H_2R, H_3R, and H_4R receptors with 34 antidepressants and antipsychotics. Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 385, 145–170.

Apsel, B., Blair, J.A., Gonzalez, B.Z., Nazif, T.M., Feldman, M.E., Aizenstein, B., Hoffman, R., Williams, R.L., Shokat, K.M., Knight, Z.A., 2008. Targeted polypharmacology: Discovery of dual inhibitors of tyrosine and phosphoinositide kinases. Nat. Chem. Biol. 4, 691–699.

Arciniegas Ruiz, S.M., Eldar-Finkelman, H., 2021. Glycogen Synthase Kinase-3 Inhibitors: Preclinical and Clinical Focus on CNS-A Decade Onward. Front. Mol. Neurosci. 14, 792364.

Arida, R.M., Scorza, F.A., Peres, C.A., Cavalheiro, E.A., 1999. The course of untreated seizures in the pilocarpine model of epilepsy. Epilepsy Res. 34, 99–107.

Arion, D., Lewis, D.A., 2011. Altered expression of regulators of the cortical chloride transporters NKCC1 and KCC2 in schizophrenia. Arch. Gen. Psychiatry 68, 21–31.

Aronica, E., Mühlebner, A., 2017. Neuropathology of epilepsy. Handb. Clin. Neurol. 145, 193–216.

Arosio, D., Ratto, G.M., 2014. Twenty years of fluorescence imaging of intracellular chloride. Front. Cell. Neurosci. 8, 258.

Arroyo, J.P., Kahle, K.T., Gamba, G., 2013. The SLC12 family of electroneutral cation-coupled chloride cotransporters. Mol. Aspects Med., The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series) 34, 288–298.

Arzimanoglou, A., French, J., Blume, W.T., Cross, J.H., Ernst, J.-P., Feucht, M., Genton, P., Guerrini, R., Kluger, G., Pellock, J.M., Perucca, E., Wheless, J.W., 2009. Lennox-Gastaut syndrome: a consensus approach on diagnosis, assessment, management, and trial methodology. Lancet Neurol. 8, 82–93.

Asbury, M.J., Gatenby, P.B., O'Sullivan, S., Bourke, E., 1972. Bumetanide: potent new "loop" diuretic. Br. Med. J. 1, 211–213.

Asiedu, M.N., Mejia, G., Ossipov, M.K., Malan, T.P., Kaila, K., Price, T.J., 2012. Modulation of spinal GABAergic analgesia by inhibition of chloride extrusion capacity in mice. J. Pain 13, 546–554.

Asoklis, R., Cimbalas, A., Augyte, A., Jasinskiene, E., Strupaite, R., 2018. Late ocular changes after closantel poisoning in five women. Eye 32, 1800–1802.

Asraf, H., Bogdanovic, M., Gottesman, N., Sekler, I., Aizenman, E., Hershfinkel, M., 2022a. SNAP23 regulates KCC2 membrane insertion and activity following mZnR/GPR39 activation in hippocampalneurons. iScience 25, 103751.

Asraf, H., Bogdanovic, M., Gottesman, N., Sekler, I., Aizenman, E., Hershfinkel, M., 2022b. SNAP23 regulates KCC2 membrane insertion and activity following mZnR/GPR39 activation in hippocampalneurons. iScience 25, 103751.

Atefimanash, P., Pourhamzeh, M., susanabadi, A., Arabi, M., Jamali-Raeufy, N., Mehrabi, S., 2021. Hippocampal chloride transporter KCC2 contributes to excitatory GABA dysregulation in the developmental rat model of schizophrenia. J. Chem. Neuroanat. 118, 102040.

Auer, T., Schreppel, P., Erker, T., Schwarzer, C., 2020. Impaired chloride homeostasis in epilepsy: Molecular basis, impact on treatment, and current treatment approaches. Pharmacol. Ther. 205, 107422.

Awad, P.N., Amegandjin, C.A., Szczurkowska, J., Carriço, J.N., Fernandes do Nascimento, A.S., Baho, E., Chattopadhyaya, B., Cancedda, L., Carmant, L., Di Cristo, G., 2018. KCC2 Regulates Dendritic Spine Formation in a Brain-Region Specific and BDNF Dependent Manner. Cereb. Cortex N. Y. NY 28, 4049–4062.

Ba, X., Ran, C., Guo, W., Guo, J., Zeng, Q., Liu, T., Sun, W., Xiao, L., Xiong, D., Huang, Y., Jiang, C., Hao, Y., 2022a. Three-Day Continuous Oxytocin Infusion Attenuates Thermal and Mechanical Nociception by Rescuing Neuronal Chloride Homeostasis via Upregulation KCC2 Expression and Function. Front. Pharmacol. 13, 845018.

Ba, X., Ran, C., Guo, W., Guo, J., Zeng, Q., Liu, T., Sun, W., Xiao, L., Xiong, D., Huang, Y., Jiang, C., Hao, Y., 2022b. Three-Day Continuous Oxytocin Infusion Attenuates Thermal and Mechanical Nociception by Rescuing Neuronal Chloride Homeostasis via Upregulation KCC2 Expression and Function. Front. Pharmacol. 13, 845018.

Babb, T.L., Kupfer, W.R., Pretorius, J.K., Crandall, P.H., Levesque, M.F., 1991. Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentata. Neuroscience 42, 351–363.

Bachur, R.G., Monuteaux, M.C., Neuman, M.I., 2015. A Comparison of Acute Treatment Regimens for Migraine in the Emergency Department. Pediatrics 135, 232–238.

Bagshaw, A.P., Jacobs, J., LeVan, P., Dubeau, F., Gotman, J., 2009. Effect of sleep stage on interictal high-frequency oscillations recorded from depth macroelectrodes in patients with focal epilepsy. Epilepsia 50, 617–628.

Balach, J., Jezdik, P., Janca, R., Cmejla, R., Krsek, P., Marusic, P., Jiruska, P., 2016. Circadian Dynamics of High Frequency Oscillations in Patients with Epilepsy:, in: Proceedings of the 9th International Joint Conference on Biomedical Engineering Systems and Technologies. Presented at the 9th International Conference on Bio-inspired Systems and Signal Processing, SCITEPRESS - Science and and Technology Publications, Rome, Italy, pp. 284–289.

Balakrishnan, V., Becker, M., Löhrke, S., Nothwang, H.G., Güresir, E., Friauf, E., 2003. Expression and Function of Chloride Transporters during Development of Inhibitory Neurotransmission in the Auditory Brainstem. J. Neurosci. 23, 4134–4145.

Báldi, R., Varga, C., Tamás, G., 2010. Differential distribution of KCC2 along the axo-somato-dendritic axis of hippocampal principal cells. Eur. J. Neurosci. 32, 1319–1325.

Banerjee, A., Rikhye, R.V., Breton-Provencher, V., Tang, X., Li, C., Li, K., Runyan, C.A., Fu, Z., Jaenisch, R., Sur, M., 2016a. Jointly reduced inhibition and excitation underlies circuit-wide changes in cortical processing in Rett syndrome. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 113, E7287–E7296.

Banerjee, A., Rikhye, R.V., Breton-Provencher, V., Tang, X., Li, C., Li, K., Runyan, C.A., Fu, Z., Jaenisch, R., Sur, M., 2016b. Jointly reduced inhibition and excitation underlies circuit-wide changes in cortical processing in Rett syndrome. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 113, E7287–E7296.

Banke, T.G., Gegelashvili, G., 2008a. Tonic activation of group I mGluRs modulates inhibitory synaptic strength by regulating KCC2 activity. J. Physiol. 586, 4925–4934.

Banke, T.G., Gegelashvili, G., 2008b. Tonic activation of group I mGluRs modulates inhibitory synaptic strength by regulating KCC2 activity. J. Physiol. 586, 4925–4934.

Banke, T.G., McBain, C.J., 2006. GABAergic Input onto CA3 Hippocampal Interneurons Remains Shunting throughout Development. J. Neurosci. 26, 11720–11725.

Barber, H.S., 1938. The Mercurial Diuretics. Postgrad. Med. J. 14, 288–294.

Barbour, A.J., Hauser, K.F., McQuiston, A.R., Knapp, P.E., 2020. HIV and opiates dysregulate K+-Cl- cotransporter 2 (KCC2) to cause GABAergic dysfunction in primary human neurons and Tat-transgenic mice. Neurobiol. Dis. 141, 104878.

Barbour, A.J., Nass, S.R., Hahn, Y.K., Hauser, K.F., Knapp, P.E., 2021. Restoration of KCC2 Membrane Localization in Striatal Dopamine D2 Receptor-Expressing Medium Spiny Neurons Rescues Locomotor Deficits in HIV Tat-Transgenic Mice. ASN Neuro 13, 17590914211022088.

Bar-Klein, G., Cacheaux, L.P., Kamintsky, L., Prager, O., Weissberg, I., Schoknecht, K., Cheng, P., Kim, S.Y., Wood, L., Heinemann, U., Kaufer, D., Friedman, A., 2014. Losartan prevents acquired epilepsy via TGF-β signaling suppression. Ann. Neurol. 75, 864–875.

Bar-Klein, G., Lublinsky, S., Kamintsky, L., Noyman, I., Veksler, R., Dalipaj, H., Senatorov, V.V., Jr., Swissa, E., Rosenbach, D., Elazary, N., Milikovsky, D.Z., Milk, N., Kassirer, M., Rosman, Y., Serlin, Y., Eisenkraft, A., Chassidim, Y., Parmet, Y., Kaufer, D., Friedman, A., 2017. Imaging blood–brain barrier dysfunction as a biomarker for epileptogenesis. Brain 140, 1692–1705.

Barmashenko, G., Hefft, S., Aertsen, A., Kirschstein, T., Köhling, R., 2011. Positive shifts of the GABAA receptor reversal potential due to altered chloride homeostasis is widespread after status epilepticus. Epilepsia 52, 1570–1578.

Barthó, P., Payne, J.A., Freund, T.F., Acsády, L., 2004. Differential distribution of the KCl cotransporter KCC2 in thalamic relay and reticular nuclei. Eur. J. Neurosci. 20, 965–975.

Bartolomei, F., Wendling, F., Régis, J., Gavaret, M., Guye, M., Chauvel, P., 2004. Pre-ictal synchronicity in limbic networks of mesial temporal lobe epilepsy. Epilepsy Res. 61, 89–104.

Bartschat, D.K., Blaustein, M.P., 1985. Potassium channels in isolated presynaptic nerve terminals from rat brain. J. Physiol. 361, 419–440.

Baud, M.O., Ghestem, A., Benoliel, J.-J., Becker, C., Bernard, C., 2019. Endogenous multidien rhythm of epilepsy in rats. Exp. Neurol. 315, 82–87.

Baud, M.O., Kleen, J.K., Mirro, E.A., Andrechak, J.C., King-Stephens, D., Chang, E.F., Rao, V.R., 2018. Multi-day rhythms modulate seizure risk in epilepsy. Nat. Commun. 9, 88.

Baudin, P., Whitmarsh, S., Cousyn, L., Roussel, D., Lecas, S., Lehongre, K., Charpier, S., Mahon, S., Navarro, V., 2022. Kv1.1 channels inhibition in the rat motor cortex recapitulates seizures associated with anti-LGI1 encephalitis. Prog. Neurobiol. 213, 102262.

Bazil, C.W., 2000. Sleep and epilepsy. Curr. Opin. Neurol. 13, 171–175.

Bazúa-Valenti, S., Chávez-Canales, M., Rojas-Vega, L., González-Rodríguez, X., Vázquez, N., Rodríguez-Gama, A., Argaiz, E.R., Melo, Z., Plata, C., Ellison, D.H., García-Valdés, J., Hadchouel, J., Gamba, G., 2015. The Effect of WNK4 on the Na+–Cl− Cotransporter Is Modulated by Intracellular Chloride. J. Am. Soc. Nephrol. JASN 26, 1781–1786.

Becker, M., Nothwang, H.G., Friauf, E., 2003. Differential expression pattern of chloride transporters NCC, NKCC2, KCC1, KCC3, KCC4, and AE3 in the developing rat auditory brainstem. Cell Tissue Res. 312, 155–165.

Beghi, E., Carpio, A., Forsgren, L., Hesdorffer, D.C., Malmgren, K., Sander, J.W., Tomson, T., Hauser, W.A., 2010. Recommendation for a definition of acute symptomatic seizure. Epilepsia 51, 671–675.

Belaïdouni, Y., Diabira, D., Zhang, J., Graziano, J.-C., Bader, F., Montheil, A., Menuet, C., Wayman, G.A., Gaiarsa, J.-L., 2021. The Chloride Homeostasis of CA3 Hippocampal Neurons Is Not Altered in Fully Symptomatic Mepc2-null Mice. Front. Cell. Neurosci. 15, 724976.

Belenky, M.A., Sollars, P.J., Mount, D.B., Alper, S.L., Yarom, Y., Pickard, G.E., 2010. Cell-type Specific Distribution of Chloride Transporters in the Rat Suprachiasmatic Nucleus. Neuroscience 165, 1519.

Bell, G.S., Sinha, S., Tisi, J. de, Stephani, C., Scott, C.A., Harkness, W.F., McEvoy, A.W., Peacock, J.L., Walker, M.C., Smith, S.J., Duncan, J.S., Sander, J.W., 2010. Premature mortality in refractory partial epilepsy: does surgical treatment make a difference? J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 81, 716–718.

Ben-Ari, Y., 2012. Kainate and Temporal Lobe Epilepsies: 3 decades of progress, in: Noebels, J.L., Avoli, M., Rogawski, M.A., Olsen, R.W., Delgado-Escueta, A.V. (Eds.), Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies. National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD).

Ben-Ari, Y., 2007. GABA Excites and Sculpts Immature Neurons Well before Delivery: Modulation by GABA of the Development of Ventricular Progenitor Cells. Epilepsy Curr. 7, 167–169.

Ben-Ari, Y., Cherubini, E., Corradetti, R., Gaiarsa, J.L., 1989. Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. J. Physiol. 416, 303–325.

Ben-Ari, Y., Delpire, E., 2021. Phenobarbital, midazolam, bumetanide, and neonatal seizures: The devil is in the details. Epilepsia 62, 935–940.

Ben-Ari, Y., Gaiarsa, J.-L., Tyzio, R., Khazipov, R., 2007. GABA: A Pioneer Transmitter That Excites Immature Neurons and Generates Primitive Oscillations. Physiol. Rev. 87, 1215–1284.

Ben-Ari, Y., Khalilov, I., Kahle, K.T., Cherubini, E., 2012a. The GABA Excitatory/Inhibitory Shift in Brain Maturation and Neurological Disorders. The Neuroscientist 18, 467–486.

Ben-Ari, Y., Khalilov, I., Kahle, K.T., Cherubini, E., 2012b. The GABA excitatory/inhibitory shift in brain maturation and neurological disorders. Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry 18, 467–486.

Ben-Ari, Y., Tremblay, E., Ottersen, O.P., Meldrum, B.S., 1980. The role of epileptic activity in hippocampal and "remote" cerebral lesions induced by kainic acid. Brain Res. 191, 79–97.

Benarroch, E.E., 2013. HCN channels: Function and clinical implications. Neurology 80, 304–310.

Ben-Menachem, E., Kyllerman, M., Marklund, S., 2000. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase function in progressive myoclonus epilepsies. Epilepsy Res. 40, 33–39.

Benson, M.J., Manzanero, S., Borges, K., 2015. Complex alterations in microglial M1/M2 markers during the development of epilepsy in two mouse models. Epilepsia 56, 895–905.

Berg, A.T., 2008. The natural history of mesial temporal lobe epilepsy. Curr. Opin. Neurol. 21, 173–178.

Berg, A.T., 2004. Postsurgical Treatment of Epilepsy. Epilepsy Curr. 4, 127–130.

Berg, A.T., Mathern, G.W., Bronen, R.A., Fulbright, R.K., DiMario, F., Testa, F.M., Levy, S.R., 2009. Frequency, prognosis and surgical treatment of structural abnormalities seen with magnetic resonance imaging in childhood epilepsy. Brain J. Neurol. 132, 2785–2797.

Berkovic, S.F., Harkin, L., McMahon, J.M., Pelekanos, J.T., Zuberi, S.M., Wirrell, E.C., Gill, D.S., Iona, X., Mulley, J.C., Scheffer, I.E., 2006. De-novo mutations of the sodium channel gene SCN1A in alleged vaccine encephalopathy: a retrospective study. Lancet Neurol. 5, 488–492.

Berman, H.M., Battistuz, T., Bhat, T.N., Bluhm, W.F., Bourne, P.E., Burkhardt, K., Feng, Z., Gilliland, G.L., Iype, L., Jain, S., Fagan, P., Marvin, J., Padilla, D., Ravichandran, V., Schneider, B., Thanki, N., Weissig, H., Westbrook, J.D., Zardecki, C., 2002. The Protein Data Bank. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 58, 899–907.

Bernard, C., Anderson, A., Becker, A., Poolos, N.P., Beck, H., Johnston, D., 2004. Acquired dendritic channelopathy in temporal lobe epilepsy. Science 305, 532–535.

Besag, F.M.C., 2017. Epilepsy in patients with autism: Links, risks and treatment challenges. Neuropsychiatr. Dis. Treat. 14.

Bette, S., Shpiner, D.S., Singer, C., Moore, H., 2018. Safinamide in the management of patients with Parkinson's disease not stabilized on levodopa: a review of the current clinical evidence. Ther. Clin. Risk Manag. 14, 1737–1745.

Bien, C.G., Holtkamp, M., 2017. "Autoimmune Epilepsy": Encephalitis With Autoantibodies for Epileptologists. Epilepsy Curr. 17, 134–141.

Bikbaev, A., Ciuraszkiewicz-Wojciech, A., Heck, J., Klatt, O., Freund, R., Mitlöhner, J., Enrile Lacalle, S., Sun, M., Repetto, D., Frischknecht, R., Ablinger, C., Rohlmann, A., Missler, M., Obermair, G.J., Di Biase, V., Heine, M., 2020. Auxiliary α2δ1 and α2δ3 Subunits of Calcium Channels Drive Excitatory and Inhibitory Neuronal Network Development. J. Neurosci. 40, 4824–4841.

Bilchak, J.N., Yeakle, K., Caron, G., Malloy, D., Côté, M.-P., 2021. Enhancing KCC2 activity decreases hyperreflexia and spasticity after chronic spinal cord injury. Exp. Neurol. 338, 113605.

Billard, J.-M., 2011. Brain free magnesium homeostasis as a target for reducing cognitive aging, in: Vink, R., Nechifor, M. (Eds.), Magnesium in the Central Nervous System. University of Adelaide Press, Adelaide (AU).

Binnie, C.D., Marston, D., 1992. Cognitive correlates of interictal discharges. Epilepsia 33 Suppl 6, S11-7.

Birk, N., Schönberger, J., Somerlik-Fuchs, K.H., Schulze-Bonhage, A., Jacobs, J., 2021. Ictal Occurrence of High-Frequency Oscillations Correlates With Seizure Severity in a Rat Model of Temporal Lobe Epilepsy. Front. Hum. Neurosci. 15, 624620.

Bischofberger, J., Engel, D., Li, L., Geiger, J.R., Jonas, P., 2006. Patch-clamp recording from mossy fiber terminals in hippocampal slices. Nat. Protoc. 1, 2075–2081.

Blaesse, P., Airaksinen, M.S., Rivera, C., Kaila, K., 2009. Cation-Chloride Cotransporters and Neuronal Function. Neuron 61, 820–838.

Blaesse, P., Guillemin, I., Schindler, J., Schweizer, M., Delpire, E., Khiroug, L., Friauf, E., Nothwang, H.G., 2006a. Oligomerization of KCC2 Correlates with Development of Inhibitory Neurotransmission. J. Neurosci. 26, 10407–10419.

Blaesse, P., Guillemin, I., Schindler, J., Schweizer, M., Delpire, E., Khiroug, L., Friauf, E., Nothwang, H.G., 2006b. Oligomerization of KCC2 Correlates with Development of Inhibitory Neurotransmission. J. Neurosci. 26, 10407–10419.

Blauwblomme, T., Dossi, E., Pellegrino, C., Goubert, E., Iglesias, B.G., Sainte-Rose, C., Rouach, N., Nabbout, R., Huberfeld, G., 2019. Gamma-aminobutyric acidergic transmission underlies interictal epileptogenicity in pediatric focal cortical dysplasia. Ann. Neurol. 85, 204–217.

Block, M.R., Glick, B.S., Wilcox, C.A., Wieland, F.T., Rothman, J.E., 1988. Purification of an N-ethylmaleimide-sensitive protein catalyzing vesicular transport. Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 7852–7856.

Bloechliger, M., Rüegg, S., Jick, S.S., Meier, C.R., Bodmer, M., 2015. Antipsychotic drug use and the risk of seizures: follow-up study with a nested case-control analysis. CNS Drugs 29, 591–603.

Blümcke, I., Coras, R., Miyata, H., Özkara, C., 2012. Defining Clinico-Neuropathological Subtypes of Mesial Temporal Lobe Epilepsy with Hippocampal Sclerosis. Brain Pathol. 22, 402–411.

Blumcke, I., Spreafico, R., Haaker, G., Coras, R., Kobow, K., Bien, C.G., Pfäfflin, M., Elger, C., Widman, G., Schramm, J., Becker, A., Braun, K.P., Leijten, F., Baayen, J.C., Aronica, E., Chassoux, F., Hamer, H., Stefan, H., Rössler, K., Thom, M., Walker, M.C., Sisodiya, S.M., Duncan, J.S., McEvoy, A.W., Pieper, T., Holthausen, H., Kudernatsch, M., Meencke, H.J., Kahane, P., Schulze-Bonhage, A., Zentner, J., Heiland, D.H., Urbach, H., Steinhoff, B.J., Bast, T., Tassi, L., Lo Russo, G., Özkara, C., Oz, B., Krsek, P., Vogelgesang, S., Runge, U., Lerche, H., Weber, Y., Honavar, M., Pimentel, J., Arzimanoglou, A., Ulate-Campos, A., Noachtar, S., Hartl, E., Schijns, O., Guerrini, R., Barba, C., Jacques, T.S., Cross, J.H., Feucht, M., Mühlebner, A., Grunwald, T., Trinka, E., Winkler, P.A., Gil-Nagel, A., Toledano Delgado, R., Mayer, T., Lutz, M., Zountsas, B., Garganis, K., Rosenow, F., Hermsen, A., von Oertzen, T.J., Diepgen, T.L., Avanzini, G., 2017. Histopathological Findings in Brain Tissue Obtained during Epilepsy Surgery. N. Engl. J. Med. 377, 1648–1656.

Blümcke, I., Suter, B., Behle, K., Kuhn, R., Schramm, J., Elger, C.E., Wiestler, O.D., 2000. Loss of Hilar Mossy Cells in Ammon's Horn Sclerosis. Epilepsia 41, S174–S180.

Blümcke, I., Thom, M., Aronica, E., Armstrong, D.D., Bartolomei, F., Bernasconi, A., Bernasconi, N., Bien, C.G., Cendes, F., Coras, R., Cross, J.H., Jacques, T.S., Kahane, P., Mathern, G.W., Miyata, H., Moshé, S.L., Oz, B., Özkara, Ç., Perucca, E., Sisodiya, S., Wiebe, S., Spreafico, R., 2013. International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: A Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. Epilepsia 54, 1315–1329.

Blümcke, I., Thom, M., Aronica, E., Armstrong, D.D., Vinters, H.V., Palmini, A., Jacques, T.S., Avanzini, G., Barkovich, A.J., Battaglia, G., Becker, A., Cepeda, C., Cendes, F., Colombo, N., Crino, P., Cross, J.H., Delalande, O., Dubeau, F., Duncan, J., Guerrini, R., Kahane, P., Mathern, G., Najm, I., Ozkara, C., Raybaud, C., Represa, A., Roper, S.N., Salamon, N., Schulze-Bonhage, A., Tassi, L., Vezzani, A., Spreafico, R., 2011. The clinicopathologic spectrum of focal cortical dysplasias: a consensus classification proposed by an ad hoc Task Force of the ILAE Diagnostic Methods Commission. Epilepsia 52, 158–174.

Boettger, T., Hübner, C.A., Maier, H., Rust, M.B., Beck, F.X., Jentsch, T.J., 2002. Deafness and renal tubular acidosis in mice lacking the K-Cl co-transporter Kcc4. Nature 416, 874–878.

Boettger, T., Rust, M.B., Maier, H., Seidenbecher, T., Schweizer, M., Keating, D.J., Faulhaber, J., Ehmke, H., Pfeffer, C., Scheel, O., Lemcke, B., Horst, J., Leuwer, R., Pape, H.-C., Völkl, H., Hübner, C.A., Jentsch, T.J., 2003. Loss of K-Cl co-transporter KCC3 causes deafness, neurodegeneration and reduced seizure threshold. EMBO J. 22, 5422–5434.

Boison, D., 2016. The Biochemistry and Epigenetics of Epilepsy: Focus on Adenosine and Glycine. Front. Mol. Neurosci. 9.

Boison, D., 2013. Role of adenosine in status epilepticus: A potential new target? Epilepsia 54, 20–22.

Borck, C., Jefferys, J.G.R., 1999. Seizure-Like Events in Disinhibited Ventral Slices of Adult Rat Hippocampus. J. Neurophysiol. 82, 2130–2142.

Borgogno, M., Savardi, A., Manigrasso, J., Turci, A., Portioli, C., Ottonello, G., Bertozzi, S.M., Armirotti, A., Contestabile, A., Cancedda, L., De Vivo, M., 2021. Design, Synthesis, In Vitro and In Vivo Characterization of Selective NKCC1 Inhibitors for the Treatment of Core Symptoms in Down Syndrome. J. Med. Chem. 64, 10203–10229.

Bortel, A., Lévesque, M., Biagini, G., Gotman, J., Avoli, M., 2010. Convulsive status epilepticus duration as determinant for epileptogenesis and interictal discharge generation in the rat limbic system. Neurobiol. Dis. 40, 478–489.

Bos, R., Sadlaoud, K., Boulenguez, P., Buttigieg, D., Liabeuf, S., Brocard, C., Haase, G., Bras, H., Vinay, L., 2013a. Activation of 5-HT2A receptors upregulates the function of the neuronal K-Cl cotransporter KCC2. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110, 348–353.

Bos, R., Sadlaoud, K., Boulenguez, P., Buttigieg, D., Liabeuf, S., Brocard, C., Haase, G., Bras, H., Vinay, L., 2013b. Activation of 5-HT2A receptors upregulates the function of the neuronal K-Cl cotransporter KCC2. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110, 348–353.

Bos, R., Sadlaoud, K., Boulenguez, P., Buttigieg, D., Liabeuf, S., Brocard, C., Haase, G., Bras, H., Vinay, L., 2013c. Activation of 5-HT2A receptors upregulates the function of the neuronal K-Cl cotransporter KCC2. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110, 348–353.

Bösl, M.R., Stein, V., Hübner, C., Zdebik, A.A., Jordt, S.-E., Mukhopadhyay, A.K., Davidoff, M.S., Holstein, A.-F., Jentsch, T.J., 2001. Male germ cells and photoreceptors, both dependent on close cell–cell interactions, degenerate upon ClC-2 Cl– channel disruption. EMBO J. 20, 1289–1299.

Boulenguez, P., Liabeuf, S., Bos, R., Bras, H., Jean-Xavier, C., Brocard, C., Stil, A., Darbon, P., Cattaert, D., Delpire, E., Marsala, M., Vinay, L., 2010a. Down-regulation of the potassium-chloride cotransporter KCC2 contributes to spasticity after spinal cord injury. Nat. Med. 16, 302–307.

Boulenguez, P., Liabeuf, S., Bos, R., Bras, H., Jean-Xavier, C., Brocard, C., Stil, A., Darbon, P., Cattaert, D., Delpire, E., Marsala, M., Vinay, L., 2010b. Down-regulation of the potassium-chloride cotransporter KCC2 contributes to spasticity after spinal cord injury. Nat. Med. 16, 302–307.

Braestrup, C., Nielsen, E.B., Sonnewald, U., Knutsen, L.J.S., Andersen, K.E., Jansen, J.A., Frederiksen, K., Andersen, P.H., Mortensen, A., Suzdak, P.D., 1990. (R)-N-[4,4-Bis(3-Methyl-2-Thienyl)but-3-en-1-yl]Nipecotic Acid Binds with High Affinity to the Brain γ-Aminobutyric Acid Uptake Carrier. J. Neurochem. 54, 639–647.

Bragin, A., Azizyan, A., Almajano, J., Wilson, C.L., Engel, J., 2005. Analysis of chronic seizure onsets after intrahippocampal kainic acid injection in freely moving rats. Epilepsia 46, 1592–1598.

Bragin, A., Engel, J., Wilson, C.L., Fried, I., Mathern, G.W., 1999a. Hippocampal and entorhinal cortex high-frequency oscillations (100--500 Hz) in human epileptic brain and in kainic acid--treated rats with chronic seizures. Epilepsia 40, 127–137.

Bragin, A., Engel, J., Wilson, C.L., Vizentin, E., Mathern, G.W., 1999b. Electrophysiologic analysis of a chronic seizure model after unilateral hippocampal KA injection. Epilepsia 40, 1210–1221.

Bragin, Anatol, Engel Jr, J., Wilson, C.L., Fried, I., Buzsáki, G., 1999. High-frequency oscillations in human brain. Hippocampus 9, 137–142.

Bragin, A., Mody, I., Wilson, C.L., Engel, J., 2002a. Local Generation of Fast Ripples in Epileptic Brain. J. Neurosci. 22, 2012–2021.

Bragin, A., Wilson, C.L., Almajano, J., Mody, I., Engel Jr., J., 2004. High-frequency Oscillations after Status Epilepticus: Epileptogenesis and Seizure Genesis. Epilepsia 45, 1017–1023.

Bragin, A., Wilson, C.L., Staba, R.J., Reddick, M., Fried, I., Engel, J., 2002b. Interictal high-frequency oscillations (80-500 Hz) in the human epileptic brain: entorhinal cortex. Ann. Neurol. 52, 407–415.

Bragin, D.E., Sanderson, J.L., Peterson, S., Connor, J.A., Müller, W.S., 2009. Development of epileptiform excitability in the deep entorhinal cortex after status epilepticus. Eur. J. Neurosci. 30, 611–624.

Brandt, C., Nozadze, M., Heuchert, N., Rattka, M., Löscher, W., 2010a. Disease-modifying effects of phenobarbital and the NKCC1 inhibitor bumetanide in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 30, 8602–8612.

Brandt, C., Nozadze, M., Heuchert, N., Rattka, M., Löscher, W., 2010b. Disease-Modifying Effects of Phenobarbital and the NKCC1 Inhibitor Bumetanide in the Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy. J. Neurosci. 30, 8602–8612.

Brandt, C., Seja, P., Töllner, K., Römermann, K., Hampel, P., Kalesse, M., Kipper, A., Feit, P.W., Lykke, K., Toft-Bertelsen, T.L., Paavilainen, P., Spoljaric, I., Puskarjov, M., MacAulay, N., Kaila, K., Löscher, W., 2018. Bumepamine, a brain-permeant benzylamine derivative of bumetanide, does not inhibit NKCC1 but is more potent to enhance phenobarbital's anti-seizure efficacy. Neuropharmacology 143, 186–204.

Branston, N.M., Strong, A.J., Symon, L., 1982. Kinetics of resolution of transient increases in extracellular potassium activity: relationships to regional blood flow in primate cerebral cortex. Neurol. Res. 4, 1–19.

Bráz, J.M., Sharif-Naeini, R., Vogt, D., Kriegstein, A., Alvarez-Buylla, A., Rubenstein, J.L., Basbaum, A.I., 2012. Forebrain GABAergic neuron precursors integrate into adult spinal cord and reduce injury-induced neuropathic pain. Neuron 74, 663–675.

Brázdil, M., Halámek, J., Jurák, P., Daniel, P., Kuba, R., Chrastina, J., Novák, Z., Rektor, I., 2010. Interictal high-frequency oscillations indicate seizure onset zone in patients with focal cortical dysplasia. Epilepsy Res. 90, 28–32.

Brázdil, M., Pail, M., Halámek, J., Plešinger, F., Cimbálník, J., Roman, R., Klimeš, P., Daniel, P., Chrastina, J., Brichtová, E., Rektor, I., Worrell, G.A., Jurák, P., 2017. Very high-frequency oscillations: Novel biomarkers of the epileptogenic zone. Ann. Neurol. 82, 299–310.

Brazel, C.Y., Ducceschi, M.H., Pytowski, B., Levison, S.W., 2001. The FLT3 Tyrosine Kinase Receptor Inhibits Neural Stem/Progenitor Cell Proliferation and Collaborates with NGF to Promote Neuronal Survival. Mol. Cell. Neurosci. 18, 381–393.

Brenner, T., Sills, G.J., Hart, Y., Howell, S., Waters, P., Brodie, M.J., Vincent, A., Lang, B., 2013. Prevalence of neurologic autoantibodies in cohorts of patients with new and established epilepsy. Epilepsia 54, 1028–1035.

Brigo, F., Nardone, R., Bongiovanni, L.G., 2012. Value of tongue biting in the differential diagnosis between epileptic seizures and syncope. Seizure 21, 568–572.

Brodbek, L., Schmid, F., 2016. Interplay of curvature-induced micro- and nanodomain structures in multicomponent lipid bilayers. Int. J. Adv. Eng. Sci. Appl. Math. 2, 111–120.

Brown, A.S., Hooton, J., Schaefer, C.A., Zhang, H., Petkova, E., Babulas, V., Perrin, M., Gorman, J.M., Susser, E.S., 2004. Elevated Maternal Interleukin-8 Levels and Risk of Schizophrenia in Adult Offspring. Am. J. Psychiatry 161, 889–895.

Bruder, J.C., Dümpelmann, M., Piza, D.L., Mader, M., Schulze-Bonhage, A., Jacobs-Le Van, J., 2017. Physiological Ripples Associated with Sleep Spindles Differ in Waveform Morphology from Epileptic Ripples. Int. J. Neural Syst. 27, 1750011.

Brummett, R.E., Bendrick, T., Himes, D., 1981. Comparative Ototoxicity of Bumetanide and Furosemide when Used in Combination with Kanamycin. J. Clin. Pharmacol. 21, 628–636.

Buchin, A., Chizhov, A., Huberfeld, G., Miles, R., Gutkin, B.S., 2016. Reduced Efficacy of the KCC2 Cotransporter Promotes Epileptic Oscillations in a Subiculum Network Model. J. Neurosci. 36, 11619–11633.

Buckmaster, P.S., 2012. Mossy Fiber Sprouting in the Dentate Gyrus, in: Noebels, J.L., Avoli, M., Rogawski, M.A., Olsen, R.W., Delgado-Escueta, A.V. (Eds.), Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies. National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD).

Buckmaster, P.S., Dudek, F.E., 1997. Network properties of the dentate gyrus in epileptic rats with hilar neuron loss and granule cell axon reorganization. J. Neurophysiol. 77, 2685–2696.

Buckmaster, P.S., Lew, F.H., 2011. Rapamycin suppresses mossy fiber sprouting but not seizure frequency in a mouse model of temporal lobe epilepsy. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 31, 2337–2347.

Burckhardt, G., 2012. Drug transport by Organic Anion Transporters (OATs). Pharmacol. Ther. 136, 106–130.

Buzsáki, G., da Silva, F.L., 2012. High frequency oscillations in the intact brain. Prog. Neurobiol. 98, 241–249.

Cacheaux, L.P., Ivens, S., David, Y., Lakhter, A.J., Bar-Klein, G., Shapira, M., Heinemann, U., Friedman, A., Kaufer, D., 2009. Transcriptome Profiling Reveals TGF-β Signaling Involvement in Epileptogenesis. J. Neurosci. 29, 8927–8935.

Cancedda, L., Fiumelli, H., Chen, K., Poo, M., 2007. Excitatory GABA Action Is Essential for Morphological Maturation of Cortical Neurons In Vivo. J. Neurosci. 27, 5224–5235.

Cantallops, I., Routtenberg, A., 2000. Kainic acid induction of mossy fiber sprouting: dependence on mouse strain. Hippocampus 10, 269–273.

Cappaert, N.L.M., Werkman, T.R., Benito, N., Witter, M.P., Baayen, J.C., Wadman, W.J., 2016. Carbamazepine modulates the spatiotemporal activity in the dentate gyrus of rats and pharmacoresistant humans in vitro. Brain Behav. 6, e00463.

Cardarelli, R.A., Jones, K., Pisella, L.I., Wobst, H.J., McWilliams, L.J., Sharpe, P.M., Burnham, M.P., Baker, D.J., Chudotvorova, I., Guyot, J., Silayeva, L., Morrow, D.H., Dekker, N., Zicha, S., Davies, P.A., Holenz, J., Duggan, M.E., Dunlop, J., Mather, R.J., Wang, Q., Medina, I., Brandon, N.J., Deeb, T.Z., Moss, S.J., 2017. The small molecule CLP257 does not modify activity of the K+–Cl− co-transporter KCC2 but does potentiate GABAA receptor activity. Nat. Med. 23, 1394–1396.

Carmosino, M., Rizzo, F., Torretta, S., Procino, G., Svelto, M., 2013. High-throughput fluorescent-based NKCC functional assay in adherent epithelial cells. BMC Cell Biol. 14, 16.

Caron, L., Rousseau, F., Gagnon, É., Isenring, P., 2000. Cloning and Functional Characterization of a Cation-Cl− Cotransporter-interacting Protein*. J. Biol. Chem. 275, 32027–32036.

Carta, F., Supuran, C.T., 2013. Diuretics with carbonic anhydrase inhibitory action: a patent and literature review (2005 – 2013). Expert Opin. Ther. Pat. 23, 681–691.

Castro-Lopes, J.M., Malcangio, M., Pan, B.H., Bowery, N.G., 1995. Complex changes of GABAA and GABAB receptor binding in the spinal cord dorsal horn following peripheral inflammation or neurectomy. Brain Res. 679, 289–297.

Castro-Lopes, J.M., Tavares, I., Coimbra, A., 1993. GABA decreases in the spinal cord dorsal horn after peripheral neurectomy. Brain Res. 620, 287–291.

Castro-Torres, R.D., Chaparro-Huerta, V., Flores-Soto, M.E., Bañuelos-Pineda, J., Camins, A., Orozco-Suárez, S.A., Armendáriz-Borunda, J., Beas-Zárate, C., 2014. A single dose of pirfenidone attenuates neuronal loss and reduces lipid peroxidation after kainic acid-induced excitotoxicity in the pubescent rat hippocampus. J. Mol. Neurosci. MN 52, 193–201.

Casula, S., Shmukler, B.E., Wilhelm, S., Stuart-Tilley, A.K., Su, W., Chernova, M.N., Brugnara, C., Alper, S.L., 2001a. A Dominant Negative Mutant of the KCC1 K-Cl Cotransporter: BOTH N- AND C-TERMINAL CYTOPLASMIC DOMAINS ARE REQUIRED FOR K-Cl COTRANSPORT ACTIVITY*. J. Biol. Chem. 276, 41870–41878.

Casula, S., Shmukler, B.E., Wilhelm, S., Stuart-Tilley, A.K., Su, W., Chernova, M.N., Brugnara, C., Alper, S.L., 2001b. A Dominant Negative Mutant of the KCC1 K-Cl Cotransporter: BOTH N- AND C-TERMINAL CYTOPLASMIC DOMAINS ARE REQUIRED FOR K-Cl COTRANSPORT ACTIVITY *. J. Biol. Chem. 276, 41870–41878.

Casula, S., Zolotarev, A.S., Stuart-Tilley, A.K., Wilhelm, S., Shmukler, B.E., Brugnara, C., Alper, S.L., 2009. Chemical crosslinking studies with the mouse Kcc1 K–Cl cotransporter. Blood Cells. Mol. Dis. 42, 233–240.

Catterall, W.A., 2012. Sodium Channel Mutations and Epilepsy, in: Noebels, J.L., Avoli, M., Rogawski, M.A., Olsen, R.W., Delgado-Escueta, A.V. (Eds.), Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies. National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD).

Caughey, G.E., Roughead, E.E., Pratt, N., Shakib, S., Vitry, A.I., Gilbert, A.L., 2010. Increased risk of hip fracture in the elderly associated with prochlorperazine: is a prescribing cascade contributing? Pharmacoepidemiol. Drug Saf. 19, 977–982.

Cavalheiro, E.A., 1995. The pilocarpine model of epilepsy. Ital. J. Neurol. Sci. 16, 33–37.

Cavalheiro, E.A., Leite, J.P., Bortolotto, Z.A., Turski, W.A., Ikonomidou, C., Turski, L., 1991. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. Epilepsia 32, 778–782.

Cavalheiro, E.A., Santos, N.F., Priel, M.R., 1996. The pilocarpine model of epilepsy in mice. Epilepsia 37, 1015–1019.

Cepeda, C., Levinson, S., Nariai, H., Yazon, V.-W., Tran, C., Barry, J., Oikonomou, K.D., Vinters, H.V., Fallah, A., Mathern, G.W., Wu, J.Y., 2020. Pathological high frequency oscillations associate with increased GABA synaptic activity in pediatric epilepsy surgery patients. Neurobiol. Dis. 134, 104618.

Cervenka, M.C., Henry, B.J., Felton, E.A., Patton, K., Kossoff, E.H., 2016. Establishing an Adult Epilepsy Diet Center: Experience, efficacy and challenges. Epilepsy Behav. EB 58, 61–68.

Cervenka, M.C., Hocker, S., Koenig, M., Bar, B., Henry-Barron, B., Kossoff, E.H., Hartman, A.L., Probasco, J.C., Benavides, D.R., Venkatesan, A., Hagen, E.C., Dittrich, D., Stern, T., Radzik, B., Depew, M., Caserta, F.M., Nyquist, P., Kaplan, P.W., Geocadin, R.G., 2017. Phase I/II multicenter ketogenic diet study for adult superrefractory status epilepticus. Neurology 88, 938–943.

Chahrour, M., Zoghbi, H.Y., 2007. The Story of Rett Syndrome: From Clinic to Neurobiology. Neuron 56, 422–437.

Chamma, I., Chevy, Q., Poncer, J.C., Lévi, S., 2012. Role of the neuronal K-Cl co-transporter KCC2 in inhibitory and excitatory neurotransmission. Front. Cell. Neurosci. 6, 5.

Chamma, I., Heubl, M., Chevy, Q., Renner, M., Moutkine, I., Eugène, E., Poncer, J.C., Lévi, S., 2013. Activity-dependent regulation of the K/Cl transporter KCC2 membrane diffusion, clustering, and function in hippocampal neurons. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 33, 15488–15503.

Chang, M., Dian, J.A., Dufour, S., Wang, L., Moradi Chameh, H., Ramani, M., Zhang, L., Carlen, P.L., Womelsdorf, T., Valiante, T.A., 2018. Brief activation of GABAergic interneurons initiates the transition to ictal events through post-inhibitory rebound excitation. Neurobiol. Dis. 109, 102–116.

Chaudhary, K.W., O'Neal, J.M., Mo, Z.-L., Fermini, B., Gallavan, R.H., Bahinski, A., 2006. Evaluation of the Rubidium Efflux Assay for Preclinical Identification of hERG Blockade. ASSAY Drug Dev. Technol. 4, 73–82.

Chauvière, L., Doublet, T., Ghestem, A., Siyoucef, S.S., Wendling, F., Huys, R., Jirsa, V., Bartolomei, F., Bernard, C., 2012. Changes in interictal spike features precede the onset of temporal lobe epilepsy. Ann. Neurol. 71, 805–814.

Chavan, S.S., Pavlov, V.A., Tracey, K.J., 2017. Mechanisms and Therapeutic Relevance of Neuro-immune Communication. Immunity 46, 927–942.

Chen, L., Wan, L., Wu, Z., Ren, W., Huang, Y., Qian, B., Wang, Y., 2017. KCC2 downregulation facilitates epileptic seizures. Sci. Rep. 7, 156.

Chen, L., Wan, L., Wu, Z., Ren, W., Huang, Y., Qian, B., Wang, Y., 2017. KCC2 downregulation facilitates epileptic seizures. Sci. Rep. 7, 156.

Chen, M., Wang, J., Jiang, J., Zheng, X., Justice, N.J., Wang, K., Ran, X., Li, Y., Huo, Q., Zhang, J., Li, H., Lu, N., Wang, Y., Zheng, H., Long, C., Yang, L., 2017a. APP modulates KCC2 expression and function in hippocampal GABAergic inhibition. eLife 6, e20142.

Chen, M., Wang, J., Jiang, J., Zheng, X., Justice, N.J., Wang, K., Ran, X., Li, Y., Huo, Q., Zhang, J., Li, H., Lu, N., Wang, Y., Zheng, H., Long, C., Yang, L., 2017b. APP modulates KCC2 expression and function in hippocampal GABAergic inhibition. eLife 6, e20142.

Chen, T., Giri, M., Xia, Z., Subedi, Y.N., Li, Y., 2017. Genetic and epigenetic mechanisms of epilepsy: a review. Neuropsychiatr. Dis. Treat. 13, 1841–1859.

Chen, W., Yazicioglu, M., Cobb, M.H., 2004. Characterization of OSR1, a Member of the Mammalian Ste20p/Germinal Center Kinase Subfamily *. J. Biol. Chem. 279, 11129–11136.

Chen, Z., Brodie, M.J., Liew, D., Kwan, P., 2018. Treatment Outcomes in Patients With Newly Diagnosed Epilepsy Treated With Established and New Antiepileptic Drugs: A 30-Year Longitudinal Cohort Study. JAMA Neurol. 75, 279–286.

Chen, Z., Grayden, D.B., Burkitt, A.N., Seneviratne, U., D'Souza, W.J., French, C., Karoly, P.J., Dell, K., Leyde, K., Cook, M.J., Maturana, M.I., 2021. Spatiotemporal Patterns of High-Frequency Activity (80-170 Hz) in Long-Term Intracranial EEG. Neurology 96, e1070–e1081.

Cherian, A., Thomas, S.V., 2009. Status epilepticus. Ann. Indian Acad. Neurol. 12, 140–153.

Cherubini, E., De Feo, M.R., Mecarelli, O., Ricci, G.F., 1983. Behavioral and electrographic patterns induced by systemic administration of kainic acid in developing rats. Brain Res. 285, 69–77.

Chevy, Q., Heubl, M., Goutierre, M., Backer, S., Moutkine, I., Eugène, E., Bloch-Gallego, E., Lévi, S., Poncer, J.C., 2015. KCC2 Gates Activity-Driven AMPA Receptor Traffic through Cofilin Phosphorylation. J. Neurosci. 35, 15772–15786.

Chew, H.Y., De Lima, P.O., Gonzalez Cruz, J.L., Banushi, B., Echejoh, G., Hu, L., Joseph, S.R., Lum, B., Rae, J., O'Donnell, J.S., Merida de Long, L., Okano, S., King, B., Barry, R., Moi, D., Mazzieri, R., Thomas, R., Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Foote, M., McCluskey, A., Robinson, P.J., Frazer, I.H., Saunders, N.A., Parton, R.G., Dolcetti, R., Cuff, K., Martin, J.H., Panizza, B., Walpole, E., Wells, J.W., Simpson, F., 2020. Endocytosis Inhibition in Humans to Improve Responses to ADCC-Mediating Antibodies. Cell 180, 895-914.e27.

Chew, T.A., Orlando, B.J., Zhang, J., Latorraca, N.R., Wang, A., Hollingsworth, S.A., Chen, D.-H., Dror, R.O., Liao, M., Feng, L., 2019. Structure and mechanism of the cation-chloride cotransporter NKCC1. Nature 572, 488–492.

Chew, T.A., Zhang, J., Feng, L., 2021. High-Resolution Views and Transport Mechanisms of the NKCC1 and KCC Transporters. J. Mol. Biol. 433, 167056.

Chi, X., Li, X., Chen, Y., Zhang, Y., Su, Q., Zhou, Q., 2021. Cryo-EM structures of the full-length human KCC2 and KCC3 cation-chloride cotransporters. Cell Res. 31, 482–484.

Cho, K.-O., Lybrand, Z.R., Ito, N., Brulet, R., Tafacory, F., Zhang, L., Good, L., Ure, K., Kernie, S.G., Birnbaum, S.G., Scharfman, H.E., Eisch, A.J., Hsieh, J., 2015. Aberrant hippocampal neurogenesis contributes to epilepsy and associated cognitive decline. Nat. Commun. 6, 6606.

Choate, K.A., Kahle, K.T., Wilson, F.H., Nelson-Williams, C., Lifton, R.P., 2003. WNK1, a kinase mutated in inherited hypertension with hyperkalemia, localizes to diverse Cl−-transporting epithelia. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 663–668.

Choe, K.Y., Han, S.Y., Gaub, P., Shell, B., Voisin, D.L., Knapp, B.A., Barker, P.A., Brown, C.H., Cunningham, J.T., Bourque, C.W., 2015. High Salt Intake Increases Blood Pressure via BDNF-Mediated Downregulation of KCC2 and Impaired Baroreflex Inhibition of Vasopressin Neurons. Neuron 85, 549–560.

Chokhawala, K., Stevens, L., 2022. Antipsychotic Medications, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).

Choquet, D., Triller, A., 2013. The dynamic synapse. Neuron 80, 691–703.

Chorin, E., Vinograd, O., Fleidervish, I., Gilad, D., Herrmann, S., Sekler, I., Aizenman, E., Hershfinkel, M., 2011. Upregulation of KCC2 Activity by Zinc-Mediated Neurotransmission via the mZnR/GPR39 Receptor. J. Neurosci. 31, 12916–12926.

Christensen, J., Vestergaard, M., Mortensen, P.B., Sidenius, P., Agerbo, E., 2007. Epilepsy and risk of suicide: a population-based case-control study. Lancet Neurol. 6, 693–698.

Chudotvorova, I., Ivanov, A., Rama, S., Hübner, C.A., Pellegrino, C., Ben-Ari, Y., Medina, I., 2005a. Early expression of KCC2 in rat hippocampal cultures augments expression of functional GABA synapses. J. Physiol. 566, 671–679.

Chudotvorova, I., Ivanov, A., Rama, S., Hübner, C.A., Pellegrino, C., Ben-Ari, Y., Medina, I., 2005b. Early expression of KCC2 in rat hippocampal cultures augments expression of functional GABA synapses. J. Physiol. 566, 671–679.

Chukwu, J., Delanty, N., Webb, D., Cavalleri, G.L., 2014. Weight change, genetics and antiepileptic drugs. Expert Rev. Clin. Pharmacol. 7, 43–51.

Cilz, N.I., Lei, S., 2017. Histamine Facilitates GABAergic Transmission in the Rat Entorhinal Cortex: Roles of H1 and H2 Receptors, Na+-Permeable Cation Channels and Inward Rectifier K+ Channels. Hippocampus 27, 613–631.

Cleary, R.T., Sun, H., Huynh, T., Manning, S.M., Li, Y., Rotenberg, A., Talos, D.M., Kahle, K.T., Jackson, M., Rakhade, S.N., Berry, G.T., Berry, G., Jensen, F.E., 2013. Bumetanide enhances phenobarbital efficacy in a rat model of hypoxic neonatal seizures. PloS One 8, e57148.

Clifford, D.B., Olney, J.W., Maniotis, A., Collins, R.C., Zorumski, C.F., 1987. The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. Neuroscience 23, 953–968.

Cohen, I., Navarro, V., Clemenceau, S., Baulac, M., Miles, R., 2002a. On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. Science 298, 1418–1421.

Cohen, I., Navarro, V., Clemenceau, S., Baulac, M., Miles, R., 2002b. On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. Science 298, 1418–1421.

Cohen, M.R., Hinsch, E., Vergona, R., Ryan, J., Kolis, S.J., Schwartz, M.A., 1976a. A comparative diuretic and tissue distribution study of bumetanide and furosemide in the dog. J. Pharmacol. Exp. Ther. 197, 697–702.

Cohen, M.R., Hinsch, E., Vergona, R., Ryan, J., Kolis, S.J., Schwartz, M.A., 1976b. A comparative diuretic and tissue distribution study of bumetanide and furosemide in the dog. J. Pharmacol. Exp. Ther. 197, 697–702.

Colder, B.W., Frysinger, R.C., Wilson, C.L., Harper, R.M., Engel, J., 1996. Decreased Neuronal Burst Discharge Near Site of Seizure Onset in Epileptic Human Temporal Lobes. Epilepsia 37, 113–121.

Colloca, L., Ludman, T., Bouhassira, D., Baron, R., Dickenson, A.H., Yarnitsky, D., Freeman, R., Truini, A., Attal, N., Finnerup, N.B., Eccleston, C., Kalso, E., Bennett, D.L., Dworkin, R.H., Raja, S.N., 2017. Neuropathic pain. Nat. Rev. Dis. Primer 3, 17002.

Colmenero-Flores, J.M., Martínez, G., Gamba, G., Vázquez, N., Iglesias, D.J., Brumós, J., Talón, M., 2007. Identification and functional characterization of cation–chloride cotransporters in plants. Plant J. 50, 278–292.

Côme, E., Heubl, M., Schwartz, E.J., Poncer, J.C., Lévi, S., 2019. Reciprocal Regulation of KCC2 Trafficking and Synaptic Activity. Front. Cell. Neurosci. 13, 48.

Côme, E., Marques, X., Poncer, J.C., Lévi, S., 2020. KCC2 membrane diffusion tunes neuronal chloride homeostasis. Neuropharmacology 169, 107571.

Conway, L.C., Cardarelli, R.A., Moore, Y.E., Jones, K., McWilliams, L.J., Baker, D.J., Burnham, M.P., Bürli, R.W., Wang, Q., Brandon, N.J., Moss, S.J., Deeb, T.Z., 2017a. N-Ethylmaleimide increases KCC2 cotransporter activity by modulating transporter phosphorylation. J. Biol. Chem. 292, 21253–21263.

Conway, L.C., Cardarelli, R.A., Moore, Y.E., Jones, K., McWilliams, L.J., Baker, D.J., Burnham, M.P., Bürli, R.W., Wang, Q., Brandon, N.J., Moss, S.J., Deeb, T.Z., 2017b. N-Ethylmaleimide increases KCC2 cotransporter activity by modulating transporter phosphorylation. J. Biol. Chem. 292, 21253–21263.

Cordshagen, A., Busch, W., Winklhofer, M., Nothwang, H.G., Hartmann, A.-M., 2018a. Phosphoregulation of the intracellular termini of K+-Cl- cotransporter 2 (KCC2) enables flexible control of its activity. J. Biol. Chem. 293, 16984–16993.

Cordshagen, A., Busch, W., Winklhofer, M., Nothwang, H.G., Hartmann, A.-M., 2018b. Phosphoregulation of the intracellular termini of K+-Cl- cotransporter 2 (KCC2) enables flexible control of its activity. J. Biol. Chem. 293, 16984–16993.

Corkin, S., 2002. What's new with the amnesic patient H.M.? Nat. Rev. Neurosci. 3, 153–160.

Corleto, J.A., Bravo-Hernández, M., Kamizato, K., Kakinohana, O., Santucci, C., Navarro, M.R., Platoshyn, O., Cizkova, D., Lukacova, N., Taylor, J., Marsala, M., 2015. Thoracic 9 Spinal Transection-Induced Model of Muscle Spasticity in the Rat: A Systematic Electrophysiological and Histopathological Characterization. PLoS ONE 10, e0144642.

Costa, L.G., Murphy, S.D., 1984. Interaction of choline with nicotinic and muscarinic cholinergic receptors in the rat brain in vitro. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 11, 649–654.

Côté, M.-P., Gandhi, S., Zambrotta, M., Houlé, J.D., 2014. Exercise modulates chloride homeostasis after spinal cord injury. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 34, 8976–8987.

Coull, J.A.M., Beggs, S., Boudreau, D., Boivin, D., Tsuda, M., Inoue, K., Gravel, C., Salter, M.W., De Koninck, Y., 2005. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. Nature 438, 1017–1021.

Coull, J.A.M., Boudreau, D., Bachand, K., Prescott, S.A., Nault, F., Sík, A., De Koninck, P., De Koninck, Y., 2003a. Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. Nature 424, 938–942.

Coull, J.A.M., Boudreau, D., Bachand, K., Prescott, S.A., Nault, F., Sík, A., De Koninck, P., De Koninck, Y., 2003b. Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. Nature 424, 938–942.

Covolan, L., Mello, L.E., 2000. Temporal profile of neuronal injury following pilocarpine or kainic acid-induced status epilepticus. Epilepsy Res. 39, 133–152.

Crépon, B., Navarro, V., Hasboun, D., Clemenceau, S., Martinerie, J., Baulac, M., Adam, C., Le Van Quyen, M., 2010. Mapping interictal oscillations greater than 200 Hz recorded with intracranial macroelectrodes in human epilepsy. Brain J. Neurol. 133, 33–45.

Crespel, A., Baldy-Moulinier, M., Coubes, P., 1998. The Relationship Between Sleep and Epilepsy in Frontal and Temporal Lobe Epilepsies: Practical and Physiopathologic Considerations. Epilepsia 39, 150–157.

Crompton, D.E., Berkovic, S.F., 2009. The borderland of epilepsy: clinical and molecular features of phenomena that mimic epileptic seizures. Lancet Neurol. 8, 370–381.

Crowder, K.M., Gunther, J.M., Jones, T.A., Hale, B.D., Zhang, H.Z., Peterson, M.R., Scheller, R.H., Chavkin, C., Bajjalieh, S.M., 1999. Abnormal neurotransmission in mice lacking synaptic vesicle protein 2A (SV2A). Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96, 15268–15273.

Crupi, R., Impellizzeri, D., Cuzzocrea, S., 2019. Role of Metabotropic Glutamate Receptors in Neurological Disorders. Front. Mol. Neurosci. 12.

Curia, G., Longo, D., Biagini, G., Jones, R.S.G., Avoli, M., 2008. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. J. Neurosci. Methods 172, 143–157.

Daigle, N.D., Carpentier, G.A., Frenette-Cotton, R., Simard, M.G., Lefoll, M.-H., Noël, M., Caron, L., Noël, J., Isenring, P., 2009. Molecular characterization of a human cation-Cl− cotransporter (SLC12A8A, CCC9A) that promotes polyamine and amino acid transport. J. Cell. Physiol. 220, 680–689.

Daniel, J.A., Chau, N., Abdel-Hamid, M.K., Hu, L., von Kleist, L., Whiting, A., Krishnan, S., Maamary, P., Joseph, S.R., Simpson, F., Haucke, V., McCluskey, A., Robinson, P.J., 2015. Phenothiazine-derived antipsychotic drugs inhibit dynamin and clathrin-mediated endocytosis. Traffic Cph. Den. 16, 635–654.

Dargaei, Z., Bang, J.Y., Mahadevan, V., Khademullah, C.S., Bedard, S., Parfitt, G.M., Kim, J.C., Woodin, M.A., 2018a. Restoring GABAergic inhibition rescues memory deficits in a Huntington's disease mouse model. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 115, E1618–E1626.

Dargaei, Z., Bang, J.Y., Mahadevan, V., Khademullah, C.S., Bedard, S., Parfitt, G.M., Kim, J.C., Woodin, M.A., 2018b. Restoring GABAergic inhibition rescues memory deficits in a Huntington's disease mouse model. Proc. Natl. Acad. Sci. 115, E1618–E1626.

Dashtipour, K., Tran, P.H., Okazaki, M.M., Nadler, J.V., Ribak, C.E., 2001. Ultrastructural features and synaptic connections of hilar ectopic granule cells in the rat dentate gyrus are different from those of granule cells in the granule cell layer. Brain Res. 890, 261–271.

Dawidowski, B., Górniak, A., Podwalski, P., Lebiecka, Z., Misiak, B., Samochowiec, J., 2021. The Role of Cytokines in the Pathogenesis of Schizophrenia. J. Clin. Med. 10, 3849.

de Curtis, M., Avanzini, G., 2001. Interictal spikes in focal epileptogenesis. Prog. Neurobiol. 63, 541–567.

de Curtis, M., Jefferys, J.G.R., Avoli, M., 2012. Interictal Epileptiform Discharges in Partial Epilepsy: Complex Neurobiological Mechanisms Based on Experimental and Clinical Evidence, in: Noebels, J.L., Avoli, M., Rogawski, M.A., Olsen, R.W., Delgado-Escueta, A.V. (Eds.), Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies. National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD).

de Guzman, P., Inaba, Y., Biagini, G., Baldelli, E., Mollinari, C., Merlo, D., Avoli, M., 2006. Subiculum network excitability is increased in a rodent model of temporal lobe epilepsy. Hippocampus 16, 843–860.

de Lanerolle, N.C., Kim, J.H., Robbins, R.J., Spencer, D.D., 1989. Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy. Brain Res. 495, 387–395.

de Los Heros, P., Alessi, D.R., Gourlay, R., Campbell, D.G., Deak, M., Macartney, T.J., Kahle, K.T., Zhang, J., 2014. The WNK-regulated SPAK/OSR1 kinases directly phosphorylate and inhibit the K+-Cl- co-transporters. Biochem. J. 458, 559–573.

de Tisi, J., Bell, G.S., Peacock, J.L., McEvoy, A.W., Harkness, W.F.J., Sander, J.W., Duncan, J.S., 2011a. The long-term outcome of adult epilepsy surgery, patterns of seizure remission, and relapse: a cohort study. Lancet Lond. Engl. 378, 1388–1395.

de Tisi, J., Bell, G.S., Peacock, J.L., McEvoy, A.W., Harkness, W.F.J., Sander, J.W., Duncan, J.S., 2011b. The long-term outcome of adult epilepsy surgery, patterns of seizure remission, and relapse: a cohort study. Lancet Lond. Engl. 378, 1388–1395.

Dean, B., Keriakous, D., Scarr, E., Thomas, E.A., 2007. Gene expression profiling in Brodmann's area 46 from subjects with schizophrenia. Aust. N. Z. J. Psychiatry 41, 308–320.

Debski, K.J., Ceglia, N., Ghestem, A., Ivanov, A.I., Brancati, G.E., Bröer, S., Bot, A.M., Müller, J.A., Schoch, S., Becker, A., Löscher, W., Guye, M., Sassone-Corsi, P., Lukasiuk, K., Baldi, P., Bernard, C., 2020. The circadian dynamics of the hippocampal transcriptome and proteome is altered in experimental temporal lobe epilepsy. Sci. Adv. 6, eaat5979.

Deidda, G., Parrini, M., Naskar, S., Bozarth, I.F., Contestabile, A., Cancedda, L., 2015. Reversing excitatory GABAAR signaling restores synaptic plasticity and memory in a mouse model of Down syndrome. Nat. Med. 21, 318–326.

Deisz, R.A., Lehmann, T.-N., Horn, P., Dehnicke, C., Nitsch, R., 2011. Components of neuronal chloride transport in rat and human neocortex. J. Physiol. 589, 1317–1347.

Deisz, R.A., Wierschke, S., Schneider, U.C., Dehnicke, C., 2014. Effects of VU0240551, a novel KCC2 antagonist, and DIDS on chloride homeostasis of neocortical neurons from rats and humans. Neuroscience 277, 831–841.

delos Heros, P., Alessi, D.R., Gourlay, R., Campbell, D.G., Deak, M., Macartney, T.J., Kahle, K.T., Zhang, J., 2014. The WNK-regulated SPAK/OSR1 kinases directly phosphorylate and inhibit the K+–Cl− co-transporters. Biochem. J. 458, 559–573.

Delpire, E., Days, E., Lewis, L.M., Mi, D., Kim, K., Lindsley, C.W., Weaver, C.D., 2009. Small-molecule screen identifies inhibitors of the neuronal K-Cl cotransporter KCC2. Proc. Natl. Acad. Sci. 106, 5383–5388.

Delpire, E., Gagnon, K.B.E., 2007. SPAK and OSR1: STE20 kinases involved in the regulation of ion homoeostasis and volume control in mammalian cells. Biochem. J. 409, 321–331.

Delpire, E., Kaplan, M.R., Plotkin, M.D., Hebert, S.C., 1996. The Na-(K)-Cl cotransporter family in the mammalian kidney: molecular identification and function(s). Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc. 11, 1967–1973.

Desikan, R.S., Barkovich, A.J., 2016. Malformations of Cortical Development. Ann. Neurol. 80, 797–810.

Destexhe, A., Rudolph, M., Paré, D., 2003. The high-conductance state of neocortical neurons in vivo. Nat. Rev. Neurosci. 4, 739–751.

Devinsky, O., Barr, W.B., Vickrey, B.G., Berg, A.T., Bazil, C.W., Pacia, S.V., Langfitt, J.T., Walczak, T.S., Sperling, M.R., Shinnar, S., Spencer, S.S., 2005. Changes in depression and anxiety after resective surgery for epilepsy. Neurology 65, 1744–1749.

Devinsky, O., Vezzani, A., Najjar, S., De Lanerolle, N.C., Rogawski, M.A., 2013. Glia and epilepsy: excitability and inflammation. Trends Neurosci. 36, 174–184.

Devinsky, O., Vezzani, A., O'Brien, T.J., Jette, N., Scheffer, I.E., de Curtis, M., Perucca, P., 2018. Epilepsy. Nat. Rev. Dis. Primer 4, 1–24.

Dezsi, G., Ozturk, E., Stanic, D., Powell, K.L., Blumenfeld, H., O'Brien, T.J., Jones, N.C., 2013. Ethosuximide reduces epileptogenesis and behavioral comorbidity in the GAERS model of genetic generalized epilepsy. Epilepsia 54, 635–643.

Di Bonaventura, C., Labate, A., Maschio, M., Meletti, S., Russo, E., 2017. AMPA receptors and perampanel behind selected epilepsies: current evidence and future perspectives. Expert Opin. Pharmacother. 18, 1751–1764.

Di Lieto, A., Rantamäki, T., Vesa, L., Yanpallewar, S., Antila, H., Lindholm, J., Rios, M., Tessarollo, L., Castrén, E., 2012. The Responsiveness of TrkB to BDNF and Antidepressant Drugs Is Differentially Regulated during Mouse Development. PLoS ONE 7, e32869.

Din, L., Preuss, C.V., 2022. Prochlorperazine, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).

Ding, D., Liu, H., Qi, W., Jiang, H., Li, Y., Wu, X., Sun, H., Gross, K., Salvi, R., 2016. Ototoxic effects and mechanisms of loop diuretics. J. Otol. 11, 145–156.

Dingledine, R., Coulter, D.A., Fritsch, B., Gorter, J.A., Lelutiu, N., McNamara, J., Nadler, J.V., Pitkänen, A., Rogawski, M.A., Skene, P., Sloviter, R.S., Wang, Y., Wadman, W.J., Wasterlain, C., Roopra, A., 2017. Transcriptional profile of hippocampal dentate granule cells in four rat epilepsy models. Sci. Data 4, 170061.

Dion, A., Muñoz, P.T., Franklin, T.B., 2022. Epigenetic mechanisms impacted by chronic stress across the rodent lifespan. Neurobiol. Stress 17, 100434.

Dixit, A.B., Banerjee, J., Srivastava, A., Tripathi, M., Sarkar, C., Kakkar, A., Jain, M., Chandra, P.S., 2016. RNA-seq analysis of hippocampal tissues reveals novel candidate genes for drug refractory epilepsy in patients with MTLE-HS. Genomics 107, 178–188.

Doi, A., Miyazaki, T., Mihara, T., Ikeda, M., Niikura, R., Andoh, T., Goto, T., 2021. CLP290 promotes the sedative effects of midazolam in neonatal rats in a KCC2-dependent manner: A laboratory study in rats. PLOS ONE 16, e0248113.

Donkin, J.J., Vink, R., 2010. Mechanisms of cerebral edema in traumatic brain injury: therapeutic developments. Curr. Opin. Neurol. 23, 293–299.

Donovan, M.D., O'Brien, F.E., Boylan, G.B., Cryan, J.F., Griffin, B.T., 2015. The effect of organic anion transporter 3 inhibitor probenecid on bumetanide levels in the brain: an integrated in vivo microdialysis study in the rat. J. Pharm. Pharmacol. 67, 501–510.

Donovan, M.D., Schellekens, H., Boylan, G.B., Cryan, J.F., Griffin, B.T., 2016. In vitro bidirectional permeability studies identify pharmacokinetic limitations of NKCC1 inhibitor bumetanide. Eur. J. Pharmacol. 770, 117–125.

Dowd, B.F.X., Forbush, B., 2003. PASK (Proline-Alanine-rich STE20-related Kinase), a Regulatory Kinase of the Na-K-Cl Cotransporter (NKCC1) *. J. Biol. Chem. 278, 27347–27353.

Doyon, N., Prescott, S.A., Castonguay, A., Godin, A.G., Kröger, H., De Koninck, Y., 2011a. Efficacy of Synaptic Inhibition Depends on Multiple, Dynamically Interacting Mechanisms Implicated in Chloride Homeostasis. PLoS Comput. Biol. 7, e1002149.

Doyon, N., Prescott, S.A., Castonguay, A., Godin, A.G., Kröger, H., De Koninck, Y., 2011b. Efficacy of Synaptic Inhibition Depends on Multiple, Dynamically Interacting Mechanisms Implicated in Chloride Homeostasis. PLoS Comput. Biol. 7, e1002149.

Drexel, M., Preidt, A.P., Sperk, G., 2012. Sequel of spontaneous seizures after kainic acid-induced status epilepticus and associated neuropathological changes in the subiculum and entorhinal cortex. Neuropharmacology 63, 806–817.

Du, L., Shan, L., Wang, B., Li, H., Xu, Z., Staal, W.G., Jia, F., 2015. A Pilot Study on the Combination of Applied Behavior Analysis and Bumetanide Treatment for Children with Autism. J. Child Adolesc. Psychopharmacol. 25, 585–588.

Duarte, S.T., Armstrong, J., Roche, A., Ortez, C., Pérez, A., O'Callaghan, M. del M., Pereira, A., Sanmartí, F., Ormazábal, A., Artuch, R., Pineda, M., García-Cazorla, A., 2013a. Abnormal expression of cerebrospinal fluid cation chloride cotransporters in patients with Rett syndrome. PloS One 8, e68851.

Duarte, S.T., Armstrong, J., Roche, A., Ortez, C., Pérez, A., O'Callaghan, M. del M., Pereira, A., Sanmartí, F., Ormazábal, A., Artuch, R., Pineda, M., García-Cazorla, A., 2013b. Abnormal expression of cerebrospinal fluid cation chloride cotransporters in patients with Rett syndrome. PloS One 8, e68851.

Duarte, S.T., Armstrong, J., Roche, A., Ortez, C., Pérez, A., O'Callaghan, M. del M., Pereira, A., Sanmartí, F., Ormazábal, A., Artuch, R., Pineda, M., García-Cazorla, A., 2013c. Abnormal Expression of Cerebrospinal Fluid Cation Chloride Cotransporters in Patients with Rett Syndrome. PLOS ONE 8, e68851.

Dubey, D., Alqallaf, A., Hays, R., Freeman, M., Chen, K., Ding, K., Agostini, M., Vernino, S., 2017. Neurological Autoantibody Prevalence in Epilepsy of Unknown Etiology. JAMA Neurol. 74, 397–402.

Dubois, C.J., Cardoit, L., Schwarz, V., Markkanen, M., Airaksinen, M.S., Uvarov, P., Simmers, J., Thoby-Brisson, M., 2018. Role of the K+-Cl– Cotransporter KCC2a Isoform in Mammalian Respiration at Birth. eNeuro 5, ENEURO.0264-18.2018.

Duchowny, M., Bhatia, S., 2014a. Preserving memory in temporal lobectomy—are networks the key? Nat. Rev. Neurol. 10, 245–246.

Duchowny, M., Bhatia, S., 2014b. Epilepsy: Preserving memory in temporal lobectomy - Are networks the key? Nat. Clin. Pract. Neurol. 10, 245–246.

Dudek, F.E., Staley, K.J., 2011. Seizure probability in animal models of acquired epilepsy: A perspective on the concept of the preictal state. Epilepsy Res., Special Issue on Epilepsy Research UK Workshop 2010 on ``Preictal Phenomena'' 97, 324–331.

Dunham, P.B., Stewart, G.W., Ellory, J.C., 1980. Chloride-activated passive potassium transport in human erythrocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 77, 1711–1715.

Durand, D.M., Park, E.-H., Jensen, A.L., 2010. Potassium diffusive coupling in neural networks. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 365, 2347–2362.

Dyhrfjeld-Johnsen, J., Berdichevsky, Y., Swiercz, W., Sabolek, H., Staley, K.J., 2010. Interictal spikes precede ictal discharges in an organotypic hippocampal slice culture model of epileptogenesis. J. Clin. Neurophysiol. Off. Publ. Am. Electroencephalogr. Soc. 27, 418–424.

Dzhala, V., Staley, K.J., 2014. Acute and Chronic Efficacy of Bumetanide in an in vitro Model of Posttraumatic Epileptogenesis. CNS Neurosci. Ther. 21, 173–180.

Dzhala, V., Valeeva, G., Glykys, J., Khazipov, R., Staley, K., 2012. Traumatic alterations in GABA signaling disrupt hippocampal network activity in the developing brain. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 32, 4017–4031.

Dzhala, V.I., Brumback, A.C., Staley, K.J., 2008. Bumetanide enhances phenobarbital efficacy in a neonatal seizure model. Ann. Neurol. 63, 222–235.

Dzhala, V.I., Staley, K.J., 2021. KCC2 Chloride Transport Contributes to the Termination of Ictal Epileptiform Activity. eNeuro 8, ENEURO.0208-20.2020.

Dzhala, V.I., Talos, D.M., Sdrulla, D.A., Brumback, A.C., Mathews, G.C., Benke, T.A., Delpire, E., Jensen, F.E., Staley, K.J., 2005a. NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. Nat. Med. 11, 1205–1213.

Dzhala, V.I., Talos, D.M., Sdrulla, D.A., Brumback, A.C., Mathews, G.C., Benke, T.A., Delpire, E., Jensen, F.E., Staley, K.J., 2005b. NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. Nat. Med. 11, 1205–1213.

Eaton, M.J., Plunkett, J.A., Karmally, S., Martinez, M.A., Montanez, K., 1998. Changes in GAD- and GABA-immunoreactivity in the spinal dorsal horn after peripheral nerve injury and promotion of recovery by lumbar transplant of immortalized serotonergic precursors. J. Chem. Neuroanat. 16, 57–72.

Eftekhari, S., Mehvari Habibabadi, J., Najafi Ziarani, M., Hashemi Fesharaki, S.S., Gharakhani, M., Mostafavi, H., Joghataei, M.T., Beladimoghadam, N., Rahimian, E., Hadjighassem, M.R., 2013. Bumetanide reduces seizure frequency in patients with temporal lobe epilepsy. Epilepsia 54, e9–e12.

Eghbal, M.A., Tafazoli, S., Pennefather, P., O'Brien, P.J., 2004. Peroxidase catalysed formation of cytotoxic prooxidant phenothiazine free radicals at physiological pH. Chem. Biol. Interact. 151, 43–51.

El-Khoury, R., Panayotis, N., Matagne, V., Ghata, A., Villard, L., Roux, J.-C., 2014. GABA and Glutamate Pathways Are Spatially and Developmentally Affected in the Brain of Mecp2-Deficient Mice. PLOS ONE 9, e92169.

Engel, J., Bragin, A., Staba, R., Mody, I., 2009. High-frequency oscillations: what is normal and what is not? Epilepsia 50, 598–604.

Englot, D.J., Rolston, J.D., Wright, C.W., Hassnain, K.H., Chang, E.F., 2016. Rates and Predictors of Seizure Freedom With Vagus Nerve Stimulation for Intractable Epilepsy. Neurosurgery 79, 345–353.

Erbas, O., Yılmaz, M., Korkmaz, H.A., Bora, S., Evren, V., Peker, G., 2013. Oxytocin inhibits pentylentetrazol-induced seizures in the rat. Peptides 40, 141–144.

Erker, T., Brandt, C., Töllner, K., Schreppel, P., Twele, F., Schidlitzki, A., Löscher, W., 2016. The bumetanide prodrug BUM5, but not bumetanide, potentiates the antiseizure effect of phenobarbital in adult epileptic mice. Epilepsia 57, 698–705.

Errante, L.D., Williamson, A., Spencer, D.D., Petroff, O.A.C., 2002. Gabapentin and vigabatrin increase GABA in the human neocortical slice. Epilepsy Res. 49, 203–210.

Escobar-Ramirez, A., Vercoutter-Edouart, A.-S., Mortuaire, M., Huvent, I., Hardivillé, S., Hoedt, E., Lefebvre, T., Pierce, A., 2015. Modification by SUMOylation Controls Both the Transcriptional Activity and the Stability of Delta-Lactoferrin. PloS One 10, e0129965.

Essabar, L., Meskini, T., Ettair, S., Erreimi, N., Mouane, N., 2014. Harmful Use of Veterinary Drugs: Blindness Following Closantel Poisoning in a 5-Year-Old Girl. Asia Pac. J. Med. Toxicol. 3, 173–175.

Ettinger, A.B., 2006. Psychotropic effects of antiepileptic drugs. Neurology 67, 1916–1925.

Eugène, E., Cluzeaud, F., Cifuentes-Diaz, C., Fricker, D., Le Duigou, C., Clemenceau, S., Baulac, M., Poncer, J.-C., Miles, R., 2014. An organotypic brain slice preparation from adult patients with temporal lobe epilepsy. J. Neurosci. Methods 235, 234–244.

Eyo, U.B., Murugan, M., Wu, L.-J., 2017. Microglia–Neuron Communication in Epilepsy. Glia 65, 5–18.

Farrant, M., Kaila, K., 2007. The cellular, molecular and ionic basis of GABA(A) receptor signalling. Prog. Brain Res. 160, 59–87.

Fathi, A.T., Chen, Y.-B., 2017. The role of FLT3 inhibitors in the treatment of FLT3-mutated acute myeloid leukemia. Eur. J. Haematol. 98, 330–336.

Faught, E., Duh, M.S., Weiner, J.R., Guérin, A., Cunnington, M.C., 2008. Nonadherence to antiepileptic drugs and increased mortality: findings from the RANSOM Study. Neurology 71, 1572–1578.

Feit, P.W., 1971. Aminobenzoic acid diuretics. 2. 4-Substituted-3-amino-5-sulfamoylbenzoic acid derivatives. J. Med. Chem. 14, 432–439.

Feng, G., Tintrup, H., Kirsch, J., Nichol, M.C., Kuhse, J., Betz, H., Sanes, J.R., 1998. Dual Requirement for Gephyrin in Glycine Receptor Clustering and Molybdoenzyme Activity. Science 282, 1321–1324.

Fernandes, A., Mendes, N.D., Almeida, G.M., Nogueira, G.O., Machado, C. de M., Horta-Junior, J. de A. de C., Junior, J.A.A., Garcia-Cairasco, N., Neder, L., Sebollela, A., 2019. Short-Term Free-Floating Slice Cultures from the Adult Human Brain. JoVE J. Vis. Exp. e59845.

Ferrini, F., Lorenzo, L.-E., Godin, A.G., Quang, M.L., De Koninck, Y., 2017. Enhancing KCC2 function counteracts morphine-induced hyperalgesia. Sci. Rep. 7, 3870.

Firkin, A.L., Marco, D.J.T., Saya, S., Newton, M.R., O'Brien, T.J., Berkovic, S.F., McIntosh, A.M., 2015. Mind the gap: Multiple events and lengthy delays before presentation with a "first seizure." Epilepsia 56, 1534–1541.

Fisher, R., Salanova, V., Witt, T., Worth, R., Henry, T., Gross, R., Oommen, K., Osorio, I., Nazzaro, J., Labar, D., Kaplitt, M., Sperling, M., Sandok, E., Neal, J., Handforth, A., Stern, J., DeSalles, A., Chung, S., Shetter, A., Bergen, D., Bakay, R., Henderson, J., French, J., Baltuch, G., Rosenfeld, W., Youkilis, A., Marks, W., Garcia, P., Barbaro, N., Fountain, N., Bazil, C., Goodman, R., McKhann, G., Babu Krishnamurthy, K., Papavassiliou, S., Epstein, C., Pollard, J., Tonder, L., Grebin, J., Coffey, R., Graves, N., SANTE Study Group, 2010. Electrical stimulation of the anterior nucleus of thalamus for treatment of refractory epilepsy. Epilepsia 51, 899–908.

Fisher, R.S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J.H., Elger, C.E., Engel, J., Forsgren, L., French, J.A., Glynn, M., Hesdorffer, D.C., Lee, B.I., Mathern, G.W., Moshé, S.L., Perucca, E., Scheffer, I.E., Tomson, T., Watanabe, M., Wiebe, S., 2014. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. Epilepsia 55, 475–482.

Fisher, R.S., Cross, J.H., French, J.A., Higurashi, N., Hirsch, E., Jansen, F.E., Lagae, L., Moshé, S.L., Peltola, J., Roulet Perez, E., Scheffer, I.E., Zuberi, S.M., 2017. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. Epilepsia 58, 522–530.

Fiumelli, H., Briner, A., Puskarjov, M., Blaesse, P., Belem, B.J., Dayer, A.G., Kaila, K., Martin, J.-L., Vutskits, L., 2013. An Ion Transport-Independent Role for the Cation-Chloride Cotransporter KCC2 in Dendritic Spinogenesis In Vivo. Cereb. Cortex 23, 378–388.

Fiumelli, H., Cancedda, L., Poo, M., 2005. Modulation of GABAergic transmission by activity via postsynaptic Ca2+-dependent regulation of KCC2 function. Neuron 48, 773–786.

Fiumelli, H., Woodin, M.A., 2007. Role of activity-dependent regulation of neuronal chloride homeostasis in development. Curr. Opin. Neurobiol. 17, 81–86.

Flatman, P.W., Creanor, J., 1999. Regulation of Na+-K+-2Cl− cotransport by protein phosphorylation in ferret erythrocytes. J. Physiol. 517, 699–708.

Forbush, B., Palfrey, H.C., 1983. [3H]bumetanide binding to membranes isolated from dog kidney outer medulla. Relationship to the Na,K,Cl co-transport system. J. Biol. Chem. 258, 11787–11792.

Franck, J.E., Pokorny, J., Kunkel, D.D., Schwartzkroin, P.A., 1995. Physiologic and Morphologic Characteristics of Granule Cell Circuitry in Human Epileptic Hippocampus. Epilepsia 36, 543–558.

Frankenberg, N.T., Lamb, G.D., Vissing, K., Murphy, R.M., 2014. Subcellular fractionation reveals HSP72 does not associate with SERCA in human skeletal muscle following damaging eccentric and concentric exercise. J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985 116, 1503–1511.

Franz, D.N., Capal, J.K., 2017. mTOR inhibitors in the pharmacologic management of tuberous sclerosis complex and their potential role in other rare neurodevelopmental disorders. Orphanet J. Rare Dis. 12, 51.

Frazzini, V., Mathon, B., Donneger, F., Cousyn, L., Hanin, A., Nguyen-Michel, V.-H., Adam, C., Lambrecq, V., Dupont, S., Poncer, J.C., Bielle, F., Navarro, V., 2022. Epilepsy related to focal neuronal lipofuscinosis: extra-frontal localization, EEG signatures and GABA involvement. J. Neurol.

French, J.A., 1999. Vigabatrin. Epilepsia 40, s11–s16.

Frey, H.-H., Löscher, W., 1980. Cetyl GABA: Effect on convulsant thresholds in mice and acute toxicity. Neuropharmacology 19, 217–220.

Frey, H.-H., Popp, C., Löscher, W., 1979. Influence of inhibitors of the high affinity GABA uptake on seizure thresholds in mice. Neuropharmacology 18, 581–590.

Fricke, N., Raghunathan, K., Tiwari, A., Stefanski, K.M., Balakrishnan, M., Waterson, A.G., Capone, R., Huang, H., Sanders, C.R., Bauer, J.A., Kenworthy, A.K., 2022. High-Content Imaging Platform to Discover Chemical Modulators of Plasma Membrane Rafts. ACS Cent. Sci. 8, 370–378.

Friedel, P., Kahle, K.T., Zhang, J., Hertz, N., Pisella, L.I., Buhler, E., Schaller, F., Duan, J., Khanna, A.R., Bishop, P.N., Shokat, K.M., Medina, I., 2015a. WNK1-regulated inhibitory phosphorylation of the KCC2 cotransporter maintains the depolarizing action of GABA in immature neurons. Sci. Signal. 8, ra65.

Friedel, P., Kahle, K.T., Zhang, J., Hertz, N., Pisella, L.I., Buhler, E., Schaller, F., Duan, J., Khanna, A.R., Bishop, P.N., Shokat, K.M., Medina, I., 2015b. WNK1-regulated inhibitory phosphorylation of the KCC2 cotransporter maintains the depolarizing action of GABA in immature neurons. Sci. Signal. 8, ra65.

Friedel, P., Ludwig, A., Pellegrino, C., Agez, M., Jawhari, A., Rivera, C., Medina, I., 2017a. A Novel View on the Role of Intracellular Tails in Surface Delivery of the Potassium-Chloride Cotransporter KCC2. eNeuro 4, ENEURO.0055-17.2017.

Friedel, P., Ludwig, A., Pellegrino, C., Agez, M., Jawhari, A., Rivera, C., Medina, I., 2017b. A Novel View on the Role of Intracellular Tails in Surface Delivery of the Potassium-Chloride Cotransporter KCC2. eNeuro 4, ENEURO.0055-17.2017.

Frimurer, T.M., Mende, F., Graae, A.-S., Engelstoft, M.S., Egerod, K.L., Nygaard, R., Gerlach, L.-O., Hansen, J.B., Schwartz, T.W., Holst, B., 2017. Model-Based Discovery of Synthetic Agonists for the Zn2+-Sensing G-Protein-Coupled Receptor 39 (GPR39) Reveals Novel Biological Functions. J. Med. Chem. 60, 886–898.

Fritsch, B., Stott, J.J., Joelle Donofrio, J., Rogawski, M.A., 2010. Treatment of early and late kainic acid-induced status epilepticus with the noncompetitive AMPA receptor antagonist GYKI 52466. Epilepsia 51, 108–117.

Furyk, J.S., Meek, R.A., Egerton-Warburton, D., 2015. Drugs for the treatment of nausea and vomiting in adults in the emergency department setting. Cochrane Database Syst. Rev. 2015, CD010106.

Gagnon, K.B., Delpire, E., 2013. Physiology of SLC12 transporters: lessons from inherited human genetic mutations and genetically engineered mouse knockouts. Am. J. Physiol. - Cell Physiol. 304, C693–C714.

Gagnon, K.B.E., Adragna, N.C., Fyffe, R.E.W., Lauf, P.K., 2007. Characterization of Glial Cell K-Cl Cotransport. Cell. Physiol. Biochem. 20, 121–130.

Gagnon, K.B.E., England, R., Delpire, E., 2006. Volume sensitivity of cation-Cl- cotransporters is modulated by the interaction of two kinases: Ste20-related proline-alanine-rich kinase and WNK4. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 290, C134-142.

Gagnon, M., Bergeron, M.J., Lavertu, G., Castonguay, A., Tripathy, S., Bonin, R.P., Perez-Sanchez, J., Boudreau, D., Wang, B., Dumas, L., Valade, I., Bachand, K., Jacob-Wagner, M., Tardif, C., Kianicka, I., Isenring, P., Attardo, G., Coull, J.A.M., De Koninck, Y., 2013a. Chloride extrusion enhancers as novel therapeutics for neurological diseases. Nat. Med. 19, 1524–1528.

Gagnon, M., Bergeron, M.J., Lavertu, G., Castonguay, A., Tripathy, S., Bonin, R.P., Perez-Sanchez, J., Boudreau, D., Wang, B., Dumas, L., Valade, I., Bachand, K., Jacob-Wagner, M., Tardif, C., Kianicka, I., Isenring, P., Attardo, G., Coull, J.A.M., De Koninck, Y., 2013b. Chloride extrusion enhancers as novel therapeutics for neurological diseases. Nat. Med. 19, 1524–1528.

Gagnon, M., Bergeron, M.J., Perez-Sanchez, J., Plasencia-Fernández, I., Lorenzo, L.-E., Godin, A.G., Castonguay, A., Bonin, R.P., De Koninck, Y., 2017. Reply to The small molecule CLP257 does not modify activity of the K+–Cl– co-transporter KCC2 but does potentiate GABAA receptor activity. Nat. Med. 23, 1396–1398.

Galanopoulou, A.S., 2008. Sexually dimorphic expression of KCC2 and GABA function. Epilepsy Res. 80, 99–113.

Galeffi, F., Sah, R., Pond, B.B., George, A., Schwartz-Bloom, R.D., 2004. Changes in Intracellular Chloride after Oxygen–Glucose Deprivation of the Adult Hippocampal Slice: Effect of Diazepam. J. Neurosci. 24, 4478–4488.

Gamba, G., 2005. Molecular Physiology and Pathophysiology of Electroneutral Cation-Chloride Cotransporters. Physiol. Rev. 85, 423–493.

Gamba, G., Miyanoshita, A., Lombardi, M., Lytton, J., Lee, W.S., Hediger, M.A., Hebert, S.C., 1994. Molecular cloning, primary structure, and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in kidney. J. Biol. Chem. 269, 17713–17722.

Gamba, G., Saltzberg, S.N., Lombardi, M., Miyanoshita, A., Lytton, J., Hediger, M.A., Brenner, B.M., Hebert, S.C., 1993. Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the thiazide-sensitive, electroneutral sodium-chloride cotransporter. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90, 2749–2753.

Gani, O.A.B.S.M., Engh, R.A., 2010. Protein kinase inhibition of clinically important staurosporine analogues. Nat. Prod. Rep. 27, 489–498.

Gao, Y., Zhan, W., Jin, Y., Chen, X., Cai, J., Zhou, X., Huang, X., Zhao, Q., Wang, W., Sun, J., 2022. KCC2 receptor upregulation potentiates antinociceptive effect of GABAAR agonist on remifentanil-induced hyperalgesia. Mol. Pain 18, 17448069221082880.

Garand, D., Mahadevan, V., Woodin, M.A., 2019. Ionotropic and metabotropic kainate receptor signalling regulates Cl− homeostasis and GABAergic inhibition. J. Physiol. 597, 1677–1690.

Garbarini, N., Delpire, E., 2008. The RCC1 domain of protein associated with Myc (PAM) interacts with and regulates KCC2. Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol. 22, 31–44.

Gauvain, G., Chamma, I., Chevy, Q., Cabezas, C., Irinopoulou, T., Bodrug, N., Carnaud, M., Lévi, S., Poncer, J.C., 2011. The neuronal K-Cl cotransporter KCC2 influences postsynaptic AMPA receptor content and lateral diffusion in dendritic spines. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108, 15474–15479.

GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators, 2016. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. Lancet Lond. Engl. 388, 1545–1602.

Gelinas, J.N., Khodagholy, D., Thesen, T., Devinsky, O., Buzsáki, G., 2016. Interictal epileptiform discharges induce hippocampal-cortical coupling in temporal lobe epilepsy. Nat. Med. 22, 641–648.

Genton, P., 2000. When antiepileptic drugs aggravate epilepsy. Brain Dev. 22, 75–80.

Ghods, S., Khalili Pour, E., Riazi-Esfahani, H., Faghihi, H., Inanloo, B., 2021. Closantel Retinal Toxicity: Case Report and Literature Review. Case Rep. Ophthalmol. Med. 2021, 4832965.

Ghoneim, M.M., El-Ries, M., Hassanein, A.M., Abd-Elaziz, A.M., 2006. Voltammetric assay of the anthelmintic veterinary drug nitroxynil in bulk form and formulation at a mercury electrode. J. Pharm. Biomed. Anal. 41, 1268–1273.

Ghougassian, D.F., D'Souza, W., Cook, M.J., O'Brien, T.J., 2004. Evaluating the Utility of Inpatient Video-EEG Monitoring. Epilepsia 45, 928–932.

Gigliucci, V., Teutsch, J., Woodbury-Smith, M., Luoni, M., Busnelli, M., Chini, B., Banerjee, A., 2021. Region-Specific KCC2 Rescue by rhIGF-1 and Oxytocin in a Mouse Model of Rett Syndrome. Cereb. Cortex N. Y. N 1991 bhab388.

Gilad, D., Shorer, S., Ketzef, M., Friedman, A., Sekler, I., Aizenman, E., Hershfinkel, M., 2015. HOMEOSTATIC REGULATION OF KCC2 ACTIVITY BY THE ZINC RECEPTOR mZnR/GPR39 DURING SEIZURES. Neurobiol. Dis. 81, 4–13.

Gillen, C.M., Brill, S., Payne, J.A., Forbush, B., 1996. Molecular Cloning and Functional Expression of the K-Cl Cotransporter from Rabbit, Rat, and Human: A NEW MEMBER OF THE CATION-CHLORIDE COTRANSPORTER FAMILY*. J. Biol. Chem. 271, 16237–16244.

Glauser, T., Ben-Menachem, E., Bourgeois, B., Cnaan, A., Guerreiro, C., Kälviäinen, R., Mattson, R., French, J.A., Perucca, E., Tomson, T., ILAE Subcommission on AED Guidelines, 2013. Updated ILAE evidence review of antiepileptic drug efficacy and effectiveness as initial monotherapy for epileptic seizures and syndromes. Epilepsia 54, 551–563.

Glien, M., Brandt, C., Potschka, H., Voigt, H., Ebert, U., Löscher, W., 2001. Repeated low-dose treatment of rats with pilocarpine: low mortality but high proportion of rats developing epilepsy. Epilepsy Res. 46, 111–119.

Glover, M., Zuber, A.M., O'Shaughnessy, K.M., 2009. Renal and Brain Isoforms of WNK3 Have Opposite Effects on NCCT Expression. J. Am. Soc. Nephrol. JASN 20, 1314–1322.

Glykys, J., Dzhala, V., Egawa, K., Balena, T., Saponjian, Y., Kuchibhotla, K., Bacskai, B., Kahle, K., Zeuthen, T., Staley, K., 2014. Local Impermeant Anions Establish the Neuronal Chloride Concentration. Science 343, 670–675.

Glykys, J., Dzhala, V., Egawa, K., Kahle, K.T., Delpire, E., Staley, K., 2017. Chloride Dysregulation, Seizures, and Cerebral Edema: A Relationship with Therapeutic Potential. Trends Neurosci. 40, 276–294.

Gödde, K., Gschwend, O., Puchkov, D., Pfeffer, C.K., Carleton, A., Jentsch, T.J., 2016. Disruption of Kcc2-dependent inhibition of olfactory bulb output neurons suggests its importance in odour discrimination. Nat. Commun. 7, 12043.

Goffin, K., Nissinen, J., Van Laere, K., Pitkänen, A., 2007. Cyclicity of spontaneous recurrent seizures in pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in rat. Exp. Neurol. 205, 501–505.

Goldstein, J., Slomski, J., 2008. Epileptic Spasms: A Variety of Etiologies and Associated Syndromes. J. Child Neurol. 23, 407–414.

Gong, C., Wang, T.-W., Huang, H.S., Parent, J.M., 2007. Reelin Regulates Neuronal Progenitor Migration in Intact and Epileptic Hippocampus. J. Neurosci. 27, 1803–1811.

González, O.C., Shiri, Z., Krishnan, G.P., Myers, T.L., Williams, S., Avoli, M., Bazhenov, M., 2018. Role of KCC2-dependent potassium efflux in 4-Aminopyridine-induced Epileptiform synchronization. Neurobiol. Dis. 109, 137–147.

González-Maeso, J., Sealfon, S.C., 2009. Psychedelics and schizophrenia. Trends Neurosci. 32, 225–232.

Gotman, J., 1991. Relationships between interictal spiking and seizures: human and experimental evidence. Can. J. Neurol. Sci. J. Can. Sci. Neurol. 18, 573–576.

Gotman, J., Marciani, M.G., 1985. Electroencephalographic spiking activity, drug levels, and seizure occurrence in epileptic patients. Ann. Neurol. 17, 597–603.

Göttlicher, M., Minucci, S., Zhu, P., Krämer, O.H., Schimpf, A., Giavara, S., Sleeman, J.P., Lo Coco, F., Nervi, C., Pelicci, P.G., Heinzel, T., 2001. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. EMBO J. 20, 6969–6978.

Goulton, C., Watanabe, M., Cheung, D., Wang, K., Oba, T., Khoshaba, A., Lai, D., Inada, H., Eto, K., Nakamura, K., Power, J., Lewis, T., Housley, G., Wake, H., Nabekura, J., Moorhouse, A., 2018. Conditional Upregulation of KCC2 selectively enhances neuronal inhibition during seizures (preprint). Neuroscience.

Goutierre, M., Al Awabdh, S., Donneger, F., François, E., Gomez-Dominguez, D., Irinopoulou, T., Menendez de la Prida, L., Poncer, J.C., 2019a. KCC2 Regulates Neuronal Excitability and Hippocampal Activity via Interaction with Task-3 Channels. Cell Rep. 28, 91-103.e7.

Goutierre, M., Al Awabdh, S., Donneger, F., François, E., Gomez-Dominguez, D., Irinopoulou, T., Menendez de la Prida, L., Poncer, J.C., 2019b. KCC2 Regulates Neuronal Excitability and Hippocampal Activity via Interaction with Task-3 Channels. Cell Rep. 28, 91-103.e7.

Gowers, S.W.R., 1885. Epilepsy and other chronic convulsive diseases. W. Wood and Company.

Grabenstatter, H.L., Del Angel, Y.C., Carlsen, J., Wempe, M.F., White, A.M., Cogswell, M., Russek, S.J., Brooks-Kayal, A.R., 2014. The effect of STAT3 inhibition on status epilepticus and subsequent spontaneous seizures in the pilocarpine model of acquired epilepsy. Neurobiol. Dis. 62, 73–85.

Grabenstatter, H.L., Ferraro, D.J., Williams, P.A., Chapman, P.L., Dudek, F.E., 2005. Use of chronic epilepsy models in antiepileptic drug discovery: the effect of topiramate on spontaneous motor seizures in rats with kainate-induced epilepsy. Epilepsia 46, 8–14.

Gram, L., Larsson, O., Johnsen, A., Schousboe, A., 1989. Experimental studies of the influence of vigabatrin on the GABA system. Br. J. Clin. Pharmacol. 27, 13S-17S.

Greenberg, A., 2000. Diuretic complications. Am. J. Med. Sci. 319, 10–24.

Greene, D.L., Hoshi, N., 2017. Modulation of Kv7 channels and excitability in the brain. Cell. Mol. Life Sci. CMLS 74, 495–508.

Grosse, R., Spitzer, E., Kupriyanov, V.V., Saks, V.A., Repke, K.R., 1980. Coordinate interplay between (Na+ + K+)-ATPase and creatine phosphokinase optimizes (Na+/K+)-antiport across the membrane of vesicles formed from the plasma membrane of cardiac muscle cell. Biochim. Biophys. Acta 603, 142–156.

Grozio, A., Mills, K.F., Yoshino, J., Bruzzone, S., Sociali, G., Tokizane, K., Lei, H.C., Cunningham, R., Sasaki, Y., Migaud, M.E., Imai, S., 2019. Slc12a8 is a nicotinamide mononucleotide transporter. Nat. Metab. 1, 47–57.

Guberman, A., 1996. Vigabatrin. Can. J. Neurol. Sci. J. Can. Sci. Neurol. 23, S13-17.

Guida, N., Laudati, G., Anzilotti, S., Secondo, A., Montuori, P., Di Renzo, G., Canzoniero, L.M.T., Formisano, L., 2015. Resveratrol via sirtuin-1 downregulates RE1-silencing transcription factor (REST) expression preventing PCB-95-induced neuronal cell death. Toxicol. Appl. Pharmacol. 288, 387–398.

Guilhoto, L.M.F.F., Loddenkemper, T., Vendrame, M., Bergin, A., Bourgeois, B.F., Kothare, S.V., 2011. Higher evening antiepileptic drug dose for nocturnal and early-morning seizures. Epilepsy Behav. EB 20, 334–337.

Gulyás, A.I., Sík, A., Payne, J.A., Kaila, K., Freund, T.F., 2001. The KCl cotransporter, KCC2, is highly expressed in the vicinity of excitatory synapses in the rat hippocampus. Eur. J. Neurosci. 13, 2205–2217.

Gunthorpe, M.J., Large, C.H., Sankar, R., 2012. The mechanism of action of retigabine (ezogabine), a first-in-class K+ channel opener for the treatment of epilepsy. Epilepsia 53, 412–424.

Gutiérrez-Correa, J., Krauth-Siegel, R.L., Stoppani, A.O.M., 2003. Phenothiazine radicals inactivate Trypanosoma cruzi dihydrolipoamide dehydrogenase: enzyme protection by radical scavengers. Free Radic. Res. 37, 281–291.

Haas, K.Z., Sperber, E.F., Opanashuk, L.A., Stanton, P.K., Moshé, S.L., 2001. Resistance of immature hippocampus to morphologic and physiologic alterations following status epilepticus or kindling. Hippocampus 11, 615–625.

Hadjiabadi, D., Lovett-Barron, M., Raikov, I.G., Sparks, F.T., Liao, Z., Baraban, S.C., Leskovec, J., Losonczy, A., Deisseroth, K., Soltesz, I., 2021. Maximally selective single-cell target for circuit control in epilepsy models. Neuron 109, 2556-2572.e6.

Haglund, M.M., Hochman, D.W., 2005. Furosemide and Mannitol Suppression of Epileptic Activity in the Human Brain. J. Neurophysiol. 94, 907–918.

Hájos, N., Ellender, T.J., Zemankovics, R., Mann, E.O., Exley, R., Cragg, S.J., Freund, T.F., Paulsen, O., 2009. Maintaining network activity in submerged hippocampal slices: importance of oxygen supply. Eur. J. Neurosci. 29, 319–327.

Hakami, T., 2021. Efficacy and tolerability of antiseizure drugs. Ther. Adv. Neurol. Disord. 14, 17562864211037430.

Hakami, T., McIntosh, A., Todaro, M., Lui, E., Yerra, R., Tan, K.M., French, C., Li, S., Desmond, P., Matkovic, Z., O'Brien, T.J., 2013. MRI-identified pathology in adults with new-onset seizures. Neurology 81, 920–927.

Hamidi, S., Avoli, M., 2015. KCC2 function modulates in vitro ictogenesis. Neurobiol. Dis. 79, 51–58.

Hammer, M.F., Sprissler, R., Bina, R.W., Lau, B., Johnstone, L., Walter, C.M., Labiner, D.M., Weinand, M.E., 2019. Altered expression of signaling pathways regulating neuronal excitability in hippocampal tissue of temporal lobe epilepsy patients with low and high seizure frequency. Epilepsy Res. 155, 106145.

Hampel, P., Römermann, K., Gailus, B., Johne, M., Gericke, B., Kaczmarek, E., Löscher, W., 2021a. Effects of the NKCC1 inhibitors bumetanide, azosemide, and torasemide alone or in combination with phenobarbital on seizure threshold in epileptic and nonepileptic mice. Neuropharmacology 185, 108449.

Hampel, P., Römermann, K., Gramer, M., Löscher, W., 2021b. The search for brain-permeant NKCC1 inhibitors for the treatment of seizures: Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of NKCC1 inhibition by azosemide, torasemide, and bumetanide in mouse brain. Epilepsy Behav. EB 114, 107616.

Hampel, P., Römermann, K., Gramer, M., Löscher, W., 2021c. The search for brain-permeant NKCC1 inhibitors for the treatment of seizures: Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of NKCC1 inhibition by azosemide, torasemide, and bumetanide in mouse brain. Epilepsy Behav. 114, 107616.

Hampel, P., Römermann, K., MacAulay, N., Löscher, W., 2018. Azosemide is more potent than bumetanide and various other loop diuretics to inhibit the sodium-potassium-chloride-cotransporter human variants hNKCC1A and hNKCC1B. Sci. Rep. 8, 9877.

Hanada, T., 2020. Ionotropic Glutamate Receptors in Epilepsy: A Review Focusing on AMPA and NMDA Receptors. Biomolecules 10, 464.

Hanif, S., Musick, S.T., 2021. Reflex Epilepsy. Aging Dis. 12, 1010–1020.

Hartmann, A.-M., Blaesse, P., Kranz, T., Wenz, M., Schindler, J., Kaila, K., Friauf, E., Nothwang, H.G., 2009. Opposite effect of membrane raft perturbation on transport activity of KCC2 and NKCC1. J. Neurochem. 111, 321–331.

Hartmann, A.-M., Nothwang, H.G., 2015. Molecular and evolutionary insights into the structural organization of cation chloride cotransporters. Front. Cell. Neurosci. 8, 470.

Hartmann, A.-M., Tesch, D., Nothwang, H.G., Bininda-Emonds, O.R.P., 2014. Evolution of the Cation Chloride Cotransporter Family: Ancient Origins, Gene Losses, and Subfunctionalization through Duplication. Mol. Biol. Evol. 31, 434–447.

Hartmann, A.-M., Wenz, M., Mercado, A., Störger, C., Mount, D.B., Friauf, E., Nothwang, H.G., 2010a. Differences in the Large Extracellular Loop between the K+-Cl− Cotransporters KCC2 and KCC4. J. Biol. Chem. 285, 23994–24002.

Hartmann, A.-M., Wenz, M., Mercado, A., Störger, C., Mount, D.B., Friauf, E., Nothwang, H.G., 2010b. Differences in the large extracellular loop between the K(+)-Cl(-) cotransporters KCC2 and KCC4. J. Biol. Chem. 285, 23994–24002.

Harty, T.P., Rogawski, M.A., 2000. Felbamate block of recombinant N-methyl-d-aspartate receptors: selectivity for the NR2B subunit. Epilepsy Res. 39, 47–55.

Hattiangady, B., Rao, M.S., Shetty, A.K., 2004. Chronic temporal lobe epilepsy is associated with severely declined dentate neurogenesis in the adult hippocampus. Neurobiol. Dis. 17, 473–490.

Hauser, W.A., Rich, S.S., Lee, J.R.-J., Annegers, J.F., Anderson, V.E., 1998. Risk of Recurrent Seizures after Two Unprovoked Seizures. N. Engl. J. Med. 338, 429–434.

Haut, S.R., 2006. Seizure clustering. Epilepsy Behav. EB 8, 50–55.

He, C., Luo, F., Chen, X., Chen, F., Li, C., Ren, S., Qiao, Q., Zhang, J., de Lecea, L., Gao, D., Hu, Z., 2016. Superficial Layer-Specific Histaminergic Modulation of Medial Entorhinal Cortex Required for Spatial Learning. Cereb. Cortex 26, 1590–1608.

Hebert, S.C., Gullans, S.R., 1995. The electroneutral sodium-(potassium)-chloride co-transporter family: a journey from fish to the renal co-transporters. Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. 4, 389–391.

Heck, C.N., King-Stephens, D., Massey, A.D., Nair, D.R., Jobst, B.C., Barkley, G.L., Salanova, V., Cole, A.J., Smith, M.C., Gwinn, R.P., Skidmore, C., Van Ness, P.C., Bergey, G.K., Park, Y.D., Miller, I., Geller, E., Rutecki, P.A., Zimmerman, R., Spencer, D.C., Goldman, A., Edwards, J.C., Leiphart, J.W., Wharen, R.E., Fessler, J., Fountain, N.B., Worrell, G.A., Gross, R.E., Eisenschenk, S., Duckrow, R.B., Hirsch, L.J., Bazil, C., O'Donovan, C.A., Sun, F.T., Courtney, T.A., Seale, C.G., Morrell, M.J., 2014. Two-year seizure reduction in adults with medically intractable partial onset epilepsy treated with responsive neurostimulation: final results of the RNS System Pivotal trial. Epilepsia 55, 432–441.

Heck, N., Garwood, J., Loeffler, J.-P., Larmet, Y., Faissner, A., 2004. Differential upregulation of extracellular matrix molecules associated with the appearance of granule cell dispersion and mossy fiber sprouting during epileptogenesis in a murine model of temporal lobe epilepsy. Neuroscience 129, 309–324.

Heggli, D.E., Malthe-Sørenssen, D., 1982. Systemic injection of kainic acid: effect on neurotransmitter markers in piriform cortex, amygdaloid complex and hippocampus and protection by cortical lesioning and anticonvulsants. Neuroscience 7, 1257–1264.

Heigele, S., Sultan, S., Toni, N., Bischofberger, J., 2016. Bidirectional GABAergic control of action potential firing in newborn hippocampal granule cells. Nat. Neurosci. 19, 263–270.

Hekmat-Scafe, D.S., Lundy, M.Y., Ranga, R., Tanouye, M.A., 2006a. Mutations in the K+/Cl− Cotransporter Gene kazachoc (kcc) Increase Seizure Susceptibility in Drosophila. J. Neurosci. 26, 8943–8954.

Hekmat-Scafe, D.S., Lundy, M.Y., Ranga, R., Tanouye, M.A., 2006b. Mutations in the K+/Cl- cotransporter gene kazachoc (kcc) increase seizure susceptibility in Drosophila. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 26, 8943–8954.

Helbig, I., Heinzen, E.L., Mefford, H.C., Commission, the I.G., 2016. Primer Part 1—The building blocks of epilepsy genetics. Epilepsia 57, 861–868.

Hellier, J.L., Patrylo, P.R., Buckmaster, P.S., Dudek, F.E., 1998. Recurrent spontaneous motor seizures after repeated low-dose systemic treatment with kainate: assessment of a rat model of temporal lobe epilepsy. Epilepsy Res. 31, 73–84.

Helmy, M.M., Tolner, E.A., Vanhatalo, S., Voipio, J., Kaila, K., 2011. Brain alkalosis causes birth asphyxia seizures, suggesting therapeutic strategy. Ann. Neurol. 69, 493–500.

Hempel, C., Nörenberg, W., Sobottka, H., Urban, N., Nicke, A., Fischer, W., Schaefer, M., 2013. The phenothiazine-class antipsychotic drugs prochlorperazine and trifluoperazine are potent allosteric modulators of the human P2X7 receptor. Neuropharmacology 75, 365–379.

Henshall, D.C., Hamer, H.M., Pasterkamp, R.J., Goldstein, D.B., Kjems, J., Prehn, J.H.M., Schorge, S., Lamottke, K., Rosenow, F., 2016. MicroRNAs in epilepsy: pathophysiology and clinical utility. Lancet Neurol. 15, 1368–1376.

Henshall, D.C., Kobow, K., 2015. Epigenetics and Epilepsy. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 5, a022731.

Hentschke, M., Wiemann, M., Hentschke, S., Kurth, I., Hermans-Borgmeyer, I., Seidenbecher, T., Jentsch, T.J., Gal, A., Hübner, C.A., 2006. Mice with a Targeted Disruption of the Cl−/HCO3− Exchanger AE3 Display a Reduced Seizure Threshold. Mol. Cell. Biol. 26, 182–191.

Herman, S.T., Walczak, T.S., Bazil, C.W., 2001. Distribution of partial seizures during the sleep–wake cycle: Differences by seizure onset site. Neurology 56, 1453–1459.

Herrmann, T., Gerth, M., Dittmann, R., Pensold, D., Ungelenk, M., Liebmann, L., Hübner, C.A., 2022a. Disruption of KCC2 in Parvalbumin-Positive Interneurons Is Associated With a Decreased Seizure Threshold and a Progressive Loss of Parvalbumin-Positive Interneurons. Front. Mol. Neurosci. 14.

Herrmann, T., Gerth, M., Dittmann, R., Pensold, D., Ungelenk, M., Liebmann, L., Hübner, C.A., 2022b. Disruption of KCC2 in Parvalbumin-Positive Interneurons Is Associated With a Decreased Seizure Threshold and a Progressive Loss of Parvalbumin-Positive Interneurons. Front. Mol. Neurosci. 14.

Hesdorffer, D.C., Benn, E.K.T., Cascino, G.D., Hauser, W.A., 2009. Is a first acute symptomatic seizure epilepsy? Mortality and risk for recurrent seizure. Epilepsia 50, 1102–1108.

Hesdorffer, D.C., Kanner, A.M., 2009. The FDA alert on suicidality and antiepileptic drugs: Fire or false alarm? Epilepsia 50, 978–986.

Hesdorffer, D.C., Stables, J.P., Hauser, W.A., Annegers, J.F., Cascino, G., 2001. Are certain diuretics also anticonvulsants? Ann. Neurol. 50, 458–462.

Hester, M.S., Danzer, S.C., 2014. Hippocampal Granule cell Pathology in Epilepsy – a Possible Structural Basis for Epileptic Co-Morbidities? Epilepsy Behav. EB 0, 105–116.

Heubl, M., Zhang, J., Pressey, J.C., Al Awabdh, S., Renner, M., Gomez-Castro, F., Moutkine, I., Eugène, E., Russeau, M., Kahle, K.T., Poncer, J.C., Lévi, S., 2017. GABAA receptor dependent synaptic inhibition rapidly tunes KCC2 activity via the Cl−-sensitive WNK1 kinase. Nat. Commun. 8, 1776.

Hewitt, S.A., Wamsteeker, J.I., Kurz, E.U., Bains, J.S., 2009. Altered chloride homeostasis removes synaptic inhibitory constraint of the stress axis. Nat. Neurosci. 12, 438–443.

Hiki, K., D'Andrea, R.J., Furze, J., Crawford, J., Woollatt, E., Sutherland, G.R., Vadas, M.A., Gamble, J.R., 1999. Cloning, Characterization, and Chromosomal Location of a Novel Human K+-Cl− Cotransporter*. J. Biol. Chem. 274, 10661–10667.

Hinz, L., Torrella Barrufet, J., Heine, V.M., 2019. KCC2 expression levels are reduced in post mortem brain tissue of Rett syndrome patients. Acta Neuropathol. Commun. 7, 196.

Hirtz, D., Ashwal, S., Berg, A., Bettis, D., Camfield, C., Camfield, P., Crumrine, P., Elterman, R., Schneider, S., Shinnar, S., 2000. Practice parameter: evaluating a first nonfebrile seizure in children: report of the quality standards

subcommittee of the American Academy of Neurology, The Child Neurology Society, and The American Epilepsy Society. Neurology 55, 616–623.

Hodes, G.E., Kana, V., Menard, C., Merad, M., Russo, S.J., 2015. Neuroimmune mechanisms of depression. Nat. Neurosci. 18, 1386–1393.

Hoffmann, E.K., Lambert, I.H., Pedersen, S.F., 2009. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. Physiol. Rev. 89, 193–277.

Hollocks, M.J., Howlin, P., Papadopoulos, A.S., Khondoker, M., Simonoff, E., 2014. Differences in HPA-axis and heart rate responsiveness to psychosocial stress in children with autism spectrum disorders with and without co-morbid anxiety. Psychoneuroendocrinology 46, 32–45.

Holmes, G.L., Lenck-Santini, P.-P., 2006. Role of interictal epileptiform abnormalities in cognitive impairment. Epilepsy Behav. EB 8, 504–515.

Hondeghem, L.M., 1987. Antiarrhythmic agents: modulated receptor applications. Circulation 75, 514–520.

Hooper, A., Paracha, R., Maguire, J., 2018. Seizure-induced activation of the HPA axis increases seizure frequency and comorbid depression-like behaviors. Epilepsy Behav. 78, 124–133.

Hoover, R.S., Poch, E., Monroy, A., Vázquez, N., Nishio, T., Gamba, G., Hebert, S.C., 2003. N-Glycosylation at Two Sites Critically Alters Thiazide Binding and Activity of the Rat Thiazide-sensitive Na+:Cl− Cotransporter. J. Am. Soc. Nephrol. 14, 271–282.

Horn, Z., Ringstedt, T., Blaesse, P., Kaila, K., Herlenius, E., 2010. Premature expression of KCC2 in embryonic mice perturbs neural development by an ion transport-independent mechanism. Eur. J. Neurosci. 31, 2142–2155.

Houser, C.R., 1990. Granule cell dispersion in the dentate gyrus of humans with temporal lobe epilepsy. Brain Res. 535, 195–204.

Howard, H.C., Mount, D.B., Rochefort, D., Byun, N., Dupré, N., Lu, J., Fan, X., Song, L., Rivière, J.-B., Prévost, C., Horst, J., Simonati, A., Lemcke, B., Welch, R., England, R., Zhan, F.Q., Mercado, A., Siesser, W.B., George, A.L., McDonald, M.P., Bouchard, J.-P., Mathieu, J., Delpire, E., Rouleau, G.A., 2002. The K–Cl cotransporter KCC3 is mutant in a severe peripheral neuropathy associated with agenesis of the corpus callosum. Nat. Genet. 32, 384–392.

Hu, J.-J., Yang, X.-L., Luo, W.-D., Han, S., Yin, J., Liu, W.-H., He, X.-H., Peng, B.-W., 2017. Bumetanide reduce the seizure susceptibility induced by pentylenetetrazol via inhibition of aberrant hippocampal neurogenesis in neonatal rats after hypoxia-ischemia. Brain Res. Bull. 130, 188–199.

Huang, C.-L., JIAN, X., YUH, C.-H., 2020. WNK1-OSR1/SPAK KINASE CASCADE IS IMPORTANT FOR ANGIOGENESIS. Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc. 131, 140–146.

Huang, Y., Ko, H., Cheung, Z.H., Yung, K.K.L., Yao, T., Wang, J.-J., Morozov, A., Ke, Y., Ip, N.Y., Yung, W.-H., 2012. Dual actions of brain-derived neurotrophic factor on GABAergic transmission in cerebellar Purkinje neurons. Exp. Neurol., Special Issue: NIH Replication Studies 233, 791–798.

Huang, Y.-J., Grau, J.W., 2018. Ionic plasticity and pain: The loss of descending serotonergic fibers after spinal cord injury transforms how GABA affects pain. Exp. Neurol. 306, 105–116.

Huberfeld, G., Menendez de la Prida, L., Pallud, J., Cohen, I., Le Van Quyen, M., Adam, C., Clemenceau, S., Baulac, M., Miles, R., 2011. Glutamatergic pre-ictal discharges emerge at the transition to seizure in human epilepsy. Nat. Neurosci. 14, 627–634.

Huberfeld, G., Wittner, L., Clemenceau, S., Baulac, M., Kaila, K., Miles, R., Rivera, C., 2007a. Perturbed chloride homeostasis and GABAergic signaling in human temporal lobe epilepsy. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 27, 9866–9873.

Huberfeld, G., Wittner, L., Clemenceau, S., Baulac, M., Kaila, K., Miles, R., Rivera, C., 2007b. Perturbed chloride homeostasis and GABAergic signaling in human temporal lobe epilepsy. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 27, 9866–9873.

Hübner, C.A., Lorke, D.E., Hermans-Borgmeyer, I., 2001a. Expression of the Na-K-2Cl-cotransporter NKCC1 during mouse development. Mech. Dev. 102, 267–269.

Hübner, C.A., Stein, V., Hermans-Borgmeyer, I., Meyer, T., Ballanyi, K., Jentsch, T.J., 2001b. Disruption of KCC2 Reveals an Essential Role of K-Cl Cotransport Already in Early Synaptic Inhibition. Neuron 30, 515–524.

Huguenard, J.R., 2002. Block of T-Type Ca2+ Channels Is an Important Action of Succinimide Antiabsence Drugs. Epilepsy Curr. 2, 49–52.

Hung, C.-M., Peng, C.-K., Wu, C.-P., Huang, K.-L., 2018. Bumetanide attenuates acute lung injury by suppressing macrophage activation. Biochem. Pharmacol. 156, 60–67.

Hyde, T.M., Lipska, B.K., Ali, T., Mathew, S.V., Law, A.J., Metitiri, O.E., Straub, R.E., Ye, T., Colantuoni, C., Herman, M.M., Bigelow, L.B., Weinberger, D.R., Kleinman, J.E., 2011a. Expression of GABA signaling molecules KCC2, NKCC1, and GAD1 in cortical development and schizophrenia. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 31, 11088–11095.

Hyde, T.M., Lipska, B.K., Ali, T., Mathew, S.V., Law, A.J., Metitiri, O.E., Straub, R.E., Ye, T., Colantuoni, C., Herman, M.M., Bigelow, L.B., Weinberger, D.R., Kleinman, J.E., 2011b. Expression of GABA signaling molecules KCC2, NKCC1, and GAD1 in cortical development and schizophrenia. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 31, 11088–11095.

Ibuki, T., Hama, A.T., Wang, X.T., Pappas, G.D., Sagen, J., 1997. Loss of GABA-immunoreactivity in the spinal dorsal horn of rats with peripheral nerve injury and promotion of recovery by adrenal medullary grafts. Neuroscience 76, 845–858.

Iffland, P.H., Grant, G.A., Janigro, D., 2014. Mechanisms of Cerebral Edema Leading to Early Seizures After Traumatic Brain Injury, in: Lo, E.H., Lok, J., Ning, M., Whalen, M.J. (Eds.), Vascular Mechanisms in CNS Trauma, Springer Series in Translational Stroke Research. Springer, New York, NY, pp. 29–45.

Ikeda, K., Onimaru, H., Yamada, J., Inoue, K., Ueno, S., Onaka, T., Toyoda, H., Arata, A., Ishikawa, T., Taketo, M.M., Fukuda, A., Kawakami, K., 2004. Malfunction of respiratory-related neuronal activity in Na+, K+-ATPase alpha2 subunit-deficient mice is attributable to abnormal Cl- homeostasis in brainstem neurons. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 24, 10693–10701.

Inglefield, J.R., Schwartz-Bloom, R.D., 1997. Confocal imaging of intracellular chloride in living brain slices: measurement of GABAA receptor activity. J. Neurosci. Methods 75, 127–135.

Ingram, T.T., 1964. TODAY'S DRUGS. FRUSEMIDE. Br. Med. J. 2, 1640–1641.

Inoue, K., Ueno, S., Fukuda, A., 2004. Interaction of neuron-specific K+-Cl- cotransporter, KCC2, with brain-type creatine kinase. FEBS Lett. 564, 131–135.

Inoue, K., Yamada, J., Ueno, S., Fukuda, A., 2006. Brain-type creatine kinase activates neuron-specific K+-Cl- co-transporter KCC2. J. Neurochem. 96, 598–608.

Iori, V., Iyer, A.M., Ravizza, T., Beltrame, L., Paracchini, L., Marchini, S., Cerovic, M., Hill, C., Ferrari, M., Zucchetti, M., Molteni, M., Rossetti, C., Brambilla, R., Steve White, H., D'Incalci, M., Aronica, E., Vezzani, A., 2017. Blockade of the IL-1R1/TLR4 pathway mediates disease-modification therapeutic effects in a model of acquired epilepsy. Neurobiol. Dis. 99, 12–23.

Ishida, S., Picard, F., Rudolf, G., Noé, E., Achaz, G., Thomas, P., Genton, P., Mundwiller, E., Wolff, M., Marescaux, C., Miles, R., Baulac, M., Hirsch, E., Leguern, E., Baulac, S., 2013. Mutations of DEPDC5 cause autosomal dominant focal epilepsies. Nat. Genet. 45, 552–555.

Isokawa, M., Levesque, M.F., Babb, T.L., Engel, J., 1993. Single mossy fiber axonal systems of human dentate granule cells studied in hippocampal slices from patients with temporal lobe epilepsy. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 13, 1511–1522.

Ivakine, E.A., Acton, B.A., Mahadevan, V., Ormond, J., Tang, M., Pressey, J.C., Huang, M.Y., Ng, D., Delpire, E., Salter, M.W., Woodin, M.A., McInnes, R.R., 2013. Neto2 is a KCC2 interacting protein required for neuronal Cl− regulation in hippocampal neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110, 3561–3566.

Jacob, T.C., 2019. Neurobiology and Therapeutic Potential of α5-GABA Type A Receptors. Front. Mol. Neurosci. 12.

Jacob, T.C., Bogdanov, Y.D., Magnus, C., Saliba, R.S., Kittler, J.T., Haydon, P.G., Moss, S.J., 2005. Gephyrin Regulates the Cell Surface Dynamics of Synaptic GABAA Receptors. J. Neurosci. 25, 10469–10478.

Jacobs, J., LeVan, P., Chander, R., Hall, J., Dubeau, F., Gotman, J., 2008. Interictal high-frequency oscillations (80-500 Hz) are an indicator of seizure onset areas independent of spikes in the human epileptic brain. Epilepsia 49, 1893–1907.

Jacobs, J., Staba, R., Asano, E., Otsubo, H., Wu, J.Y., Zijlmans, M., Mohamed, I., Kahane, P., Dubeau, F., Navarro, V., Gotman, J., 2012. High-frequency oscillations (HFOs) in clinical epilepsy. Prog. Neurobiol. 98, 302–315.

Jallon, P., Loiseau, P., Loiseau, J., 2001. Newly diagnosed unprovoked epileptic seizures: presentation at diagnosis in CAROLE study. Coordination Active du Réseau Observatoire Longitudinal de l' Epilepsie. Epilepsia 42, 464–475.

Janssen, S.P., Gerard, S., Raijmakers, M.E., Truin, M., Van Kleef, M., Joosten, E.A., 2012. Decreased intracellular GABA levels contribute to spinal cord stimulation-induced analgesia in rats suffering from painful peripheral neuropathy: the role of KCC2 and GABA(A) receptor-mediated inhibition. Neurochem. Int. 60, 21–30.

Janz, D., 1962. The grand mal epilepsies and the sleeping-waking cycle. Epilepsia 3, 69–109.

Javaheri, S., Davis, C., Rogers, D.H., 1993. Ionic Composition of Cisternal CSF in Acute Respiratory Acidosis: Lack of Effect of Large Dose Bumetanide. J. Neurochem. 61, 1525–1529.

Jensen, T.S., Baron, R., Haanpää, M., Kalso, E., Loeser, J.D., Rice, A.S.C., Treede, R.-D., 2011. A new definition of neuropathic pain. Pain 152, 2204–2205.

Jentink, J., Loane, M.A., Dolk, H., Barisic, I., Garne, E., Morris, J.K., de Jong-van den Berg, L.T.W., EUROCAT Antiepileptic Study Working Group, 2010. Valproic acid monotherapy in pregnancy and major congenital malformations. N. Engl. J. Med. 362, 2185–2193.

Jin, X., Kim, W.B., Kim, M.-N., Jung, W.W., Kang, H.K., Hong, E.-H., Kim, Y.S., Shim, W.J., Han, H.C., Colwell, C.S., Kim, Y.-B., Kim, Y.I., 2021. Oestrogen inhibits salt-dependent hypertension by suppressing GABAergic excitation in magnocellular AVP neurons. Cardiovasc. Res. 117, 2263–2274.

Jirsa, V.K., Stacey, W.C., Quilichini, P.P., Ivanov, A.I., Bernard, C., 2014. On the nature of seizure dynamics. Brain J. Neurol. 137, 2210–2230.

Johne, M., Käufer, C., Römermann, K., Gailus, B., Gericke, B., Löscher, W., 2021a. A combination of phenobarbital and the bumetanide derivative bumepamine prevents neonatal seizures and subsequent hippocampal neurodegeneration in a rat model of birth asphyxia. Epilepsia 62, 1460–1471.

Johne, M., Römermann, K., Hampel, P., Gailus, B., Theilmann, W., Ala-Kurikka, T., Kaila, K., Löscher, W., 2021b. Phenobarbital and midazolam suppress neonatal seizures in a noninvasive rat model of birth asphyxia, whereas bumetanide is ineffective. Epilepsia 62, 920–934.

Jones, R.S.G., da Silva, A.B., Whittaker, R.G., Woodhall, G.L., Cunningham, M.O., 2016. Human brain slices for epilepsy research: Pitfalls, solutions and future challenges. J. Neurosci. Methods 260, 221–232.

Jonniya, N.A., Zhang, J., Kar, P., 2021. Molecular Mechanism of Inhibiting WNK Binding to OSR1 by Targeting the Allosteric Pocket of the OSR1-CCT Domain with Potential Antihypertensive Inhibitors: An In Silico Study. J. Phys. Chem. B 125, 9115–9129.

Josiah, S.S., Meor Azlan, N.F., Zhang, J., 2021. Targeting the WNK-SPAK/OSR1 Pathway and Cation-Chloride Cotransporters for the Therapy of Stroke. Int. J. Mol. Sci. 22, 1232.

Jourdain, P., Pavillon, N., Moratal, C., Boss, D., Rappaz, B., Depeursinge, C., Marquet, P., Magistretti, P.J., 2011a. Determination of Transmembrane Water Fluxes in Neurons Elicited by Glutamate Ionotropic Receptors and by the Cotransporters KCC2 and NKCC1: A Digital Holographic Microscopy Study. J. Neurosci. 31, 11846–11854.

Jourdain, P., Pavillon, N., Moratal, C., Boss, D., Rappaz, B., Depeursinge, C., Marquet, P., Magistretti, P.J., 2011b. Determination of Transmembrane Water Fluxes in Neurons Elicited by Glutamate Ionotropic Receptors and by the Cotransporters KCC2 and NKCC1: A Digital Holographic Microscopy Study. J. Neurosci. 31, 11846–11854.

Kabat, J., Król, P., 2012. Focal cortical dysplasia - review. Pol. J. Radiol. 77, 35–43.

Kahle, K.T., Gimenez, I., Hassan, H., Wilson, F.H., Wong, R.D., Forbush, B., Aronson, P.S., Lifton, R.P., 2004. WNK4 regulates apical and basolateral Cl– flux in extrarenal epithelia. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 2064–2069.

Kahle, K.T., Khanna, A.R., Alper, S.L., Adragna, N.C., Lauf, P.K., Sun, D., Delpire, E., 2015. K-Cl cotransporters, cell volume homeostasis, and neurological disease. Trends Mol. Med. 21, 513–523.

Kahle, K.T., Merner, N.D., Friedel, P., Silayeva, L., Liang, B., Khanna, A., Shang, Y., Lachance-Touchette, P., Bourassa, C., Levert, A., Dion, P.A., Walcott, B., Spiegelman, D., Dionne-Laporte, A., Hodgkinson, A., Awadalla, P., Nikbakht, H., Majewski, J., Cossette, P., Deeb, T.Z., Moss, S.J., Medina, I., Rouleau, G.A., 2014. Genetically encoded impairment of neuronal KCC2 cotransporter function in human idiopathic generalized epilepsy. EMBO Rep. 15, 766–774.

Kahle, K.T., Rinehart, J., Lifton, R.P., 2010. Phosphoregulation of the Na–K–2Cl and K–Cl cotransporters by the WNK kinases. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis., Arterial Hypertension 1802, 1150–1158.

Kahle, K.T., Staley, K.J., Nahed, B.V., Gamba, G., Hebert, S.C., Lifton, R.P., Mount, D.B., 2008. Roles of the cation-chloride cotransporters in neurological disease. Nat. Clin. Pract. Neurol. 4, 490–503.

Kaila, K., 1994. Ionic basis of GABAA receptor channel function in the nervous system. Prog. Neurobiol. 42, 489–537.

Kaila, K., Lamsa, K., Smirnov, S., Taira, T., Voipio, J., 1997. Long-Lasting GABA-Mediated Depolarization Evoked by High-Frequency Stimulation in Pyramidal Neurons of Rat Hippocampal Slice Is Attributable to a Network-Driven, Bicarbonate-Dependent K+ Transient. J. Neurosci. 17, 7662–7672.

Kaila, K., Löscher, W., 2022. Bumetanide for neonatal seizures: No light in the pharmacokinetic/dynamic tunnel. Epilepsia n/a.

Kaila, K., Price, T.J., Payne, J.A., Puskarjov, M., Voipio, J., 2014. Cation-chloride cotransporters in neuronal development, plasticity and disease. Nat. Rev. Neurosci. 15, 637–654.

Kaila, K., Voipio, J., 1987. Postsynaptic fall in intracellular pH induced by GABA-activated bicarbonate conductance. Nature 330, 163–165.

Kakigi, A., Nishimura, M., Takeda, T., Taguchi, D., Nishioka, R., 2009. Expression of aquaporin1, 3, and 4, NKCC1, and NKCC2 in the human endolymphatic sac. Auris. Nasus. Larynx 36, 135–139.

Kalashnikov, V.E., Tyganov, S.A., Turtikova, O.V., Kalashnikova, E.P., Glazova, M.V., Mirzoev, T.M., Shenkman, B.S., 2021. Prochlorperazine Withdraws the Delayed Onset Tonic Activity of Unloaded Rat Soleus Muscle: A Pilot Study. Life 11, 1161.

Kaldis, P., Furter, R., Wallimann, T., 1994. The N-terminal heptapeptide of mitochondrial creatine kinase is important for octamerization. Biochemistry 33, 952–959.

Kaldis, P., Hemmer, W., Zanolla, E., Holtzman, D., Wallimann, T., 1996. "Hot spots" of creatine kinase localization in brain: cerebellum, hippocampus and choroid plexus. Dev. Neurosci. 18, 542–554.

Kalkman, H.O., 2011. Alterations in the expression of neuronal chloride transporters may contribute to schizophrenia. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry 35, 410–414.

Kanaka, C., Ohno, K., Okabe, A., Kuriyama, K., Itoh, T., Fukuda, A., Sato, K., 2001. The differential expression patterns of messenger RNAs encoding K-Cl cotransporters (KCC1,2) and Na-K-2Cl cotransporter (NKCC1) in the rat nervous system. Neuroscience 104, 933–946.

Kang, H.C., Chung, D.E., Kim, D.W., Kim, H.D., 2004. Early- and Late-onset Complications of the Ketogenic Diet for Intractable Epilepsy. Epilepsia 45, 1116–1123.

Kang, S.K., Markowitz, G.J., Kim, S.T., Johnston, M.V., Kadam, S.D., 2015. Age- and sex-dependent susceptibility to phenobarbital-resistant neonatal seizures: role of chloride co-transporters. Front. Cell. Neurosci. 9, 173.

Kaplan, M.R., Mount, D.B., Delpire, E., 1996. Molecular mechanisms of NaCl cotransport. Annu. Rev. Physiol. 58, 649–668.

Karadsheh, M.F., Delpire, E., 2001. Neuronal Restrictive Silencing Element Is Found in the KCC2 Gene: Molecular Basis for KCC2-Specific Expression in Neurons. J. Neurophysiol. 85, 995–997.

Karlócai, M.R., Wittner, L., Tóth, K., Maglóczky, Z., Katarova, Z., Rásonyi, G., Erőss, L., Czirják, S., Halász, P., Szabó, G., Payne, J.A., Kaila, K., Freund, T.F., 2016. Enhanced expression of potassium-chloride cotransporter KCC2 in human temporal lobe epilepsy. Brain Struct. Funct. 221, 3601–3615.

Karoly, P.J., Freestone, D.R., Boston, R., Grayden, D.B., Himes, D., Leyde, K., Seneviratne, U., Berkovic, S., O'Brien, T., Cook, M.J., 2016. Interictal spikes and epileptic seizures: their relationship and underlying rhythmicity. Brain J. Neurol. 139, 1066–1078.

Kelley, M.R., Cardarelli, R.A., Smalley, J.L., Ollerhead, T.A., Andrew, P.M., Brandon, N.J., Deeb, T.Z., Moss, S.J., 2018. Locally Reducing KCC2 Activity in the Hippocampus is Sufficient to Induce Temporal Lobe Epilepsy. EBioMedicine 32, 62–71.

Kelley, M.R., Deeb, T.Z., Brandon, N.J., Dunlop, J., Davies, P.A., Moss, S.J., 2016. Compromising KCC2 transporter activity enhances the development of continuous seizure activity. Neuropharmacology 108, 103–110.

Kelley, N.E., Tepper, D.E., 2012. Rescue therapy for acute migraine, part 2: neuroleptics, antihistamines, and others. Headache 52, 292–306.

Kenney-Jung, D.L., Vezzani, A., Kahoud, R.J., LaFrance-Corey, R.G., Ho, M.-L., Muskardin, T.W., Wirrell, E.C., Howe, C.L., Payne, E.T., 2016. Febrile infection-related epilepsy syndrome treated with anakinra. Ann. Neurol. 80, 939–945.

Kesaf, S., Khirug, S., Dinh, E., Saez Garcia, M., Soni, S., Orav, E., Delpire, E., Taira, T., Lauri, S.E., Rivera, C., 2020. The Kainate Receptor Subunit GluK2 Interacts With KCC2 to Promote Maturation of Dendritic Spines. Front. Cell. Neurosci. 14, 252.

Kharod, S.C., Carter, B.M., Kadam, S.D., 2018. Pharmaco-resistant neonatal seizures: critical mechanistic insights from a chemoconvulsant model. Dev. Neurobiol. 78, 1117–1130.

Kharod, S.C., Kang, S.K., Kadam, S.D., 2019. Off-Label Use of Bumetanide for Brain Disorders: An Overview. Front. Neurosci. 13.

Khazipov, R., Holmes, G.L., 2003. Synchronization of Kainate-Induced Epileptic Activity via GABAergic Inhibition in the Superfused Rat Hippocampus In Vivo. J. Neurosci. 23, 5337–5341.

Khirug, S., Ahmad, F., Puskarjov, M., Afzalov, R., Kaila, K., Blaesse, P., 2010. A Single Seizure Episode Leads to Rapid Functional Activation of KCC2 in the Neonatal Rat Hippocampus. J. Neurosci. 30, 12028–12035.

Khirug, S., Huttu, K., Ludwig, A., Smirnov, S., Voipio, J., Rivera, C., Kaila, K., Khiroug, L., 2005. Distinct properties of functional KCC2 expression in immature mouse hippocampal neurons in culture and in acute slices. Eur. J. Neurosci. 21, 899–904.

Khirug, S., Yamada, J., Afzalov, R., Voipio, J., Khiroug, L., Kaila, K., 2008. GABAergic depolarization of the axon initial segment in cortical principal neurons is caused by the Na-K-2Cl cotransporter NKCC1. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 28, 4635–4639.

Kikuchi, E., Mori, T., Zeniya, M., Isobe, K., Ishigami-Yuasa, M., Fujii, S., Kagechika, H., Ishihara, T., Mizushima, T., Sasaki, S., Sohara, E., Rai, T., Uchida, S., 2015. Discovery of Novel SPAK Inhibitors That Block WNK Kinase Signaling to Cation Chloride Transporters. J. Am. Soc. Nephrol. JASN 26, 1525–1536.

Kim, S.Y., Senatorov, V.V., Morrissey, C.S., Lippmann, K., Vazquez, O., Milikovsky, D.Z., Gu, F., Parada, I., Prince, D.A., Becker, A.J., Heinemann, U., Friedman, A., Kaufer, D., 2017. TGFβ signaling is associated with changes in inflammatory gene expression and perineuronal net degradation around inhibitory neurons following various neurological insults. Sci. Rep. 7, 7711.

Kim, Y.-B., Kim, W.B., Jung, W.W., Jin, X., Kim, Y.S., Kim, B., Han, H.C., Block, G.D., Colwell, C.S., Kim, Y.I., 2018. Excitatory GABAergic Action and Increased Vasopressin Synthesis in Hypothalamic Magnocellular Neurosecretory Cells Underlie the High Plasma Level of Vasopressin in Diabetic Rats. Diabetes 67, 486–495.

King, M.A., Newton, M.R., Jackson, G.D., Fitt, G.J., Mitchell, L.A., Silvapulle, M.J., Berkovic, S.F., 1998. Epileptology of the first-seizure presentation: a clinical, electroencephalographic, and magnetic resonance imaging study of 300 consecutive patients. Lancet Lond. Engl. 352, 1007–1011.

Kirmse, K., Kummer, M., Kovalchuk, Y., Witte, O.W., Garaschuk, O., Holthoff, K., 2015. GABA depolarizes immature neurons and inhibits network activity in the neonatal neocortex in vivo. Nat. Commun. 6, 7750.

Kitamura, A., Ishibashi, H., Watanabe, M., Takatsuru, Y., Brodwick, M., Nabekura, J., 2008. Sustained depolarizing shift of the GABA reversal potential by glutamate receptor activation in hippocampal neurons. Neurosci. Res. 62, 270–277.

Kitayama, T., Morita, K., Motoyama, N., Dohi, T., 2016. Down-regulation of zinc transporter-1 in astrocytes induces neuropathic pain via the brain-derived neurotrophic factor - K+-Cl- co-transporter-2 signaling pathway in the mouse spinal cord. Neurochem. Int. 101, 120–131.

Klaft, Z.-J., Hollnagel, J.-O., Salar, S., Calişkan, G., Schulz, S.B., Schneider, U.C., Horn, P., Koch, A., Holtkamp, M., Gabriel, S., Gerevich, Z., Heinemann, U., 2016. Adenosine A1 receptor–mediated suppression of carbamazepine-resistant seizure-like events in human neocortical slices. Epilepsia 57, 746–756.

Kleen, J.K., Scott, R.C., Holmes, G.L., Lenck-Santini, P.-P., 2010. Cognitive and behavioral comorbidities of epilepsy. Epilepsia 51, 79–79.

Klein, P.M., Lu, A.C., Harper, M.E., McKown, H.M., Morgan, J.D., Beenhakker, M.P., 2018a. Tenuous Inhibitory GABAergic Signaling in the Reticular Thalamus. J. Neurosci. 38, 1232–1248.

Klein, P.M., Lu, A.C., Harper, M.E., McKown, H.M., Morgan, J.D., Beenhakker, M.P., 2018b. Tenuous Inhibitory GABAergic Signaling in the Reticular Thalamus. J. Neurosci. 38, 1232–1248.

Knabl, J., Witschi, R., Hösl, K., Reinold, H., Zeilhofer, U.B., Ahmadi, S., Brockhaus, J., Sergejeva, M., Hess, A., Brune, K., Fritschy, J.-M., Rudolph, U., Möhler, H., Zeilhofer, H.U., 2008. Reversal of pathological pain through specific spinal GABAA receptor subtypes. Nature 451, 330–334.

Kneussel, M., Brandstätter, J.H., Laube, B., Stahl, S., Müller, U., Betz, H., 1999. Loss of Postsynaptic GABAA Receptor Clustering in Gephyrin-Deficient Mice. J. Neurosci. 19, 9289–9297.

Knopp, A., Kivi, A., Wozny, C., Heinemann, U., Behr, J., 2005. Cellular and network properties of the subiculum in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. J. Comp. Neurol. 483, 476–488.

Ko, M.-C., Lee, M.-C., Tang, T.-H., Amstislavskaya, T.G., Tikhonova, M.A., Yang, Y.-L., Lu, K.-T., 2018. Bumetanide blocks the acquisition of conditioned fear in adult rats. Br. J. Pharmacol. 175, 1580–1589.

Konig, H., Levis, M., 2015. Targeting FLT3 to treat leukemia. Expert Opin. Ther. Targets 19, 37–54.

Kopito, R.R., Lee, B.S., Simmons, D.M., Lindsey, A.E., Morgans, C.W., Schneider, K., 1989. Regulation of intracellular pH by a neuronal homolog of the erythrocyte anion exchanger. Cell 59, 927–937.

Kourdougli, N., Pellegrino, C., Renko, J.-M., Khirug, S., Chazal, G., Kukko-Lukjanov, T.-K., Lauri, S.E., Gaiarsa, J.-L., Zhou, L., Peret, A., Castrén, E., Tuominen, R.K., Crépel, V., Rivera, C., 2017a. Depolarizing γ-aminobutyric acid contributes to glutamatergic network rewiring in epilepsy. Ann. Neurol. 81, 251–265.

Kourdougli, N., Pellegrino, C., Renko, J.-M., Khirug, S., Chazal, G., Kukko-Lukjanov, T.-K., Lauri, S.E., Gaiarsa, J.-L., Zhou, L., Peret, A., Castrén, E., Tuominen, R.K., Crépel, V., Rivera, C., 2017b. Depolarizing γ-aminobutyric acid contributes to glutamatergic network rewiring in epilepsy. Ann. Neurol. 81, 251–265.

Krapf, R., Berry, C.A., Verkman, A.S., 1988. Estimation of intracellular chloride activity in isolated perfused rabbit proximal convoluted tubules using a fluorescent indicator. Biophys. J. 53, 955–962.

Kraus, D., Yang, Q., Kong, D., Banks, A.S., Zhang, L., Rodgers, J.T., Pirinen, E., Pulinilkunnil, T.C., Gong, F., Wang, Y., Cen, Y., Sauve, A.A., Asara, J.M., Peroni, O.D., Monia, B.P., Bhanot, S., Alhonen, L., Puigserver, P., Kahn, B.B., 2014. Nicotinamide N-methyltransferase knockdown protects against diet-induced obesity. Nature 508, 258–262.

Kraus, L., Monni, L., Schneider, U.C., Onken, J., Spindler, P., Holtkamp, M., Fidzinski, P., 2020. Preparation of Acute Human Hippocampal Slices for Electrophysiological Recordings. JoVE J. Vis. Exp. e61085.

Krishna, V., King, N.K.K., Sammartino, F., Strauss, I., Andrade, D.M., Wennberg, R.A., Lozano, A.M., 2016. Anterior Nucleus Deep Brain Stimulation for Refractory Epilepsy: Insights Into Patterns of Seizure Control and Efficacious Target. Neurosurgery 78, 802–811.

Krumholz, A., Wiebe, S., Gronseth, G., Shinnar, S., Levisohn, P., Ting, T., Hopp, J., Shafer, P., Morris, H., Seiden, L., Barkley, G., French, J., Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology, American Epilepsy Society, 2007. Practice Parameter: evaluating an apparent unprovoked first seizure in adults (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the American Epilepsy Society. Neurology 69, 1996–2007.

Kullmann, D.M., Moreau, A.W., Bakiri, Y., Nicholson, E., 2012. Plasticity of Inhibition. Neuron 75, 951–962.

Kuner, T., Augustine, G.J., 2000. A Genetically Encoded Ratiometric Indicator for Chloride: Capturing Chloride Transients in Cultured Hippocampal Neurons. Neuron 27, 447–459.

Kursan, S., McMillen, T.S., Beesetty, P., Dias-Junior, E., Almutairi, M.M., Sajib, A.A., Kozak, J.A., Aguilar-Bryan, L., Di Fulvio, M., 2017. The neuronal K+Cl− co-transporter 2 (Slc12a5) modulates insulin secretion. Sci. Rep. 7, 1732.

Kuzniecky, R., 2015. Epilepsy and malformations of cortical development: new developments. Curr. Opin. Neurol. 28, 151–157.

Kwan, P., Arzimanoglou, A., Berg, A.T., Brodie, M.J., Allen Hauser, W., Mathern, G., Moshé, S.L., Perucca, E., Wiebe, S., French, J., 2010. Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. Epilepsia 51, 1069–1077.

Kwan, P., Brodie, M.J., 2000. Early Identification of Refractory Epilepsy. N. Engl. J. Med. 342, 314–319.

Kwan, P., Schachter, S.C., Brodie, M.J., 2011. Drug-resistant epilepsy. N. Engl. J. Med. 365, 919–926.

Kyrozis, A., Reichling, D.B., 1995. Perforated-patch recording with gramicidin avoids artifactual changes in intracellular chloride concentration. J. Neurosci. Methods 57, 27–35.

Lado, F.A., 2006. Chronic bilateral stimulation of the anterior thalamus of kainate-treated rats increases seizure frequency. Epilepsia 47, 27–32.

Laffray, S., Tan, K., Dulluc, J., Bouali-Benazzouz, R., Calver, A.R., Nagy, F., Landry, M., 2007. Dissociation and trafficking of rat GABAB receptor heterodimer upon chronic capsaicin stimulation. Eur. J. Neurosci. 25, 1402–1416.

Lagostena, L., Rosato-Siri, M., D'Onofrio, M., Brandi, R., Arisi, I., Capsoni, S., Franzot, J., Cattaneo, A., Cherubini, E., 2010. In the adult hippocampus, chronic nerve growth factor deprivation shifts GABAergic signaling from the hyperpolarizing to the depolarizing direction. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 30, 885–893.

Laitakari, A., Liu, L., Frimurer, T.M., Holst, B., 2021. The Zinc-Sensing Receptor GPR39 in Physiology and as a Pharmacological Target. Int. J. Mol. Sci. 22, 3872.

Lal, S., Bloom', D., Silver, B., Desjardins', B., Krishnan', B., Thavundayil', J., Thompson, T., 1993. Replacement of Chlorpromazine with Other Neuroleptics: Effect on Abnormal Skin Pigmentation and Ocular Changes. J. OfPsychiatry 5.

Lamer, V., Lipozenčić, J., Turčić, P., n.d. Adverse Cutaneous Reactions to Psychopharmaceuticals. Acta Dermatovenerol Croat 12.

Lang, F., Lepple-Wienhues, A., Szabó, I., Siemen, D., Gulbins, E., 1998. Cell Volume in Cell Proliferation and Apoptotic Cell Death. Cell Vol. Regul. 123, 158–168.

Lang, N., Sueske, E., Hasan, A., Paulus, W., Tergau, F., 2006. Pregabalin Exerts Oppositional Effects on Different Inhibitory Circuits in Human Motor Cortex: A Double-blind, Placebo-controlled Transcranial Magnetic Stimulation Study. Epilepsia 47, 813–819.

Langer, M., Brandt, C., Löscher, W., 2011. Marked strain and substrain differences in induction of status epilepticus and subsequent development of neurodegeneration, epilepsy, and behavioral alterations in rats. [corrected]. Epilepsy Res. 96, 207–224.

Lapierre, J., Amin, M., Hattangadi, S., 1969. Prochlorperazine — A Review of the Literature since 1956*. Can. Psychiatr. Assoc. J. 14, 267–274.

Lau Moon Lin, M., Robinson, P.D., Flank, J., Sung, L., Dupuis, L.L., 2016. The Safety of Prochlorperazine in Children: A Systematic Review and Meta-Analysis. Drug Saf. 39, 509–516.

Lauf, P.K., Adragna, N.C., 2000. K-Cl cotransport: properties and molecular mechanism. Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol. 10, 341–354.

Lauf, P.K., Theg, B.E., 1980. A chloride dependent K+ flux induced by N-ethylmaleimide in genetically low K+ sheep and goat erythrocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 92, 1422–1428.

Le Duigou, C., Savary, E., Morin-Brureau, M., Gomez-Dominguez, D., Milior, G., Chali, F., Sobczyk, A., Eugène, E., Kraus, L., Meier, J.C., Kullmann, D.M., Mathon, B., de la Prida, L.M., Dorfmuller, G., Pallud, J., Clemenceau, S., Miles, R., 2018. Imaging pathological activities of human brain tissue in organotypic culture. J. Neurosci. Methods 298, 33–44.

Le Magueresse, C., Monyer, H., 2013. GABAergic interneurons shape the functional maturation of the cortex. Neuron 77, 388–405.

Le Rouzic, P., Ivanov, T.R., Stanley, P.J., Baudoin, F.M.-H., Chan, F., Pinteaux, E., Brown, P.D., Luckman, S.M., 2006. KCC3 and KCC4 expression in rat adult forebrain. Brain Res. 1110, 39–45.

Le Van Quyen, M., Bragin, A., Staba, R., Crépon, B., Wilson, C.L., Engel, J., 2008. Cell Type-Specific Firing during Ripple Oscillations in the Hippocampal Formation of Humans. J. Neurosci. 28, 6104–6110.

Lee, C.-Y., Chen, C.-C., Liou, H.-H., 2009. Levetiracetam inhibits glutamate transmission through presynaptic P/Q-type calcium channels on the granule cells of the dentate gyrus. Br. J. Pharmacol. 158, 1753–1762.

Lee, H.H.C., Deeb, T.Z., Walker, J.A., Davies, P.A., Moss, S.J., 2011a. NMDA receptor activity downregulates KCC2 resulting in depolarizing GABAA receptor-mediated currents. Nat. Neurosci. 14, 736–743.

Lee, H.H.C., Deeb, T.Z., Walker, J.A., Davies, P.A., Moss, S.J., 2011b. NMDA receptor activity downregulates KCC2 resulting in depolarizing GABAA receptor-mediated currents. Nat. Neurosci. 14, 736–743.

Lee, Henry H.C., Jurd, R., Moss, S.J., 2010. Tyrosine phosphorylation regulates the membrane trafficking of the potassium chloride co-transporter KCC2. Mol. Cell. Neurosci. 45, 173–179.

Lee, Henry H. C., Jurd, R., Moss, S.J., 2010. Tyrosine phosphorylation regulates the membrane trafficking of the potassium chloride co-transporter KCC2. Mol. Cell. Neurosci. 45, 173–179.

Lee, H.H.C., Walker, J.A., Williams, J.R., Goodier, R.J., Payne, J.A., Moss, S.J., 2007. Direct protein kinase C-dependent phosphorylation regulates the cell surface stability and activity of the potassium chloride cotransporter KCC2. J. Biol. Chem. 282, 29777–29784.

Lee, K.L., Abiraman, K., Lucaj, C., Ollerhead, T.A., Brandon, N.J., Deeb, T.Z., Maguire, J., Moss, S.J., 2022. Inhibiting with-no-lysine kinases enhances K+/Cl− cotransporter 2 activity and limits status epilepticus. Brain 145, 950–963.

Lee, W.S., Baldassari, S., Stephenson, S.E.M., Lockhart, P.J., Baulac, S., Leventer, R.J., 2022. Cortical Dysplasia and the mTOR Pathway: How the Study of Human Brain Tissue Has Led to Insights into Epileptogenesis. Int. J. Mol. Sci. 23, 1344.

Lefevre, F., Aronson, N., 2000. Ketogenic diet for the treatment of refractory epilepsy in children: A systematic review of efficacy. Pediatrics 105, E46.

Lemonnier, E., Ben-Ari, Y., 2010. The diuretic bumetanide decreases autistic behaviour in five infants treated during 3 months with no side effects. Acta Paediatr. Oslo Nor. 1992 99, 1885–1888.

Lemonnier, E., Degrez, C., Phelep, M., Tyzio, R., Josse, F., Grandgeorge, M., Hadjikhani, N., Ben-Ari, Y., 2012. A randomised controlled trial of bumetanide in the treatment of autism in children. Transl. Psychiatry 2, e202–e202.

Lemonnier, E., Lazartigues, A., Ben-Ari, Y., 2016. Treating Schizophrenia With the Diuretic Bumetanide: A Case Report. Clin. Neuropharmacol. 39, 115–117.

Lemonnier, E., Rabiei, H., Makowski, D., Hadjikhani, N., Ben-Ari, Y., 2021. Treating Autism With Bumetanide: Are Large Multicentric and Monocentric Trials on Selected Populations Complementary? J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry 60, 937–938.

Lemonnier, E., Villeneuve, N., Sonie, S., Serret, S., Rosier, A., Roue, M., Brosset, P., Viellard, M., Bernoux, D., Rondeau, S., Thummler, S., Ravel, D., Ben-Ari, Y., 2017. Effects of bumetanide on neurobehavioral function in children and adolescents with autism spectrum disorders. Transl. Psychiatry 7, e1056–e1056.

Lemos, T., Cavalheiro, EsperA., 1995. Suppression of pilocarpine-induced status epilepticus and the late development of epilepsy in rats. Exp. Brain Res. 102.

Lenertz, L.Y., Lee, B.-H., Min, X., Xu, B., Wedin, K., Earnest, S., Goldsmith, E.J., Cobb, M.H., 2005. Properties of WNK1 and Implications for Other Family Members *. J. Biol. Chem. 280, 26653–26658.

Leonzino, M., Busnelli, M., Antonucci, F., Verderio, C., Mazzanti, M., Chini, B., 2016. The Timing of the Excitatory-to-Inhibitory GABA Switch Is Regulated by the Oxytocin Receptor via KCC2. Cell Rep. 15, 96–103.

Lévesque, M., Avoli, M., 2013. The kainic acid model of temporal lobe epilepsy. Neurosci. Biobehav. Rev. 37, 2887–2899.

Lévesque, M., Avoli, M., Bernard, C., 2016. Animal models of temporal lobe epilepsy following systemic chemoconvulsant administration. J. Neurosci. Methods 260, 45–52.

Lévesque, M., Bortel, A., Gotman, J., Avoli, M., 2011. High-frequency (80-500 Hz) oscillations and epileptogenesis in temporal lobe epilepsy. Neurobiol. Dis. 42, 231–241.

Lévesque, M., Salami, P., Gotman, J., Avoli, M., 2012. Two seizure-onset types reveal specific patterns of high-frequency oscillations in a model of temporal lobe epilepsy. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 32, 13264–13272.

Lévesque, M., Salami, P., Shiri, Z., Avoli, M., 2018. Interictal oscillations and focal epileptic disorders. Eur. J. Neurosci. 48, 2915–2927.

Lévi, S., Le Roux, N., Eugène, E., Poncer, J.C., 2015. Benzodiazepine ligands rapidly influence GABAA receptor diffusion and clustering at hippocampal inhibitory synapses. Neuropharmacology, GABAergic Signaling in Health and Disease 88, 199–208.

Lévi, S., Logan, S.M., Tovar, K.R., Craig, A.M., 2004. Gephyrin Is Critical for Glycine Receptor Clustering But Not for the Formation of Functional GABAergic Synapses in Hippocampal Neurons. J. Neurosci. 24, 207–217.

LI, B., McKERNAN, K., SHEN, W., 2008. Spatial and temporal distribution patterns of Na-K-2Cl cotransporter in adult and developing mouse retinas. Vis. Neurosci. 25, 109–123.

Li, H., Khirug, S., Cai, C., Ludwig, A., Blaesse, P., Kolikova, J., Afzalov, R., Coleman, S.K., Lauri, S., Airaksinen, M.S., Keinänen, K., Khiroug, L., Saarma, M., Kaila, K., Rivera, C., 2007. KCC2 Interacts with the Dendritic Cytoskeleton to Promote Spine Development. Neuron 56, 1019–1033.

Li, T., Lan, J.Q., Fredholm, B.B., Simon, R.P., Boison, D., 2007. Adenosine dysfunction in astrogliosis: cause for seizure generation? Neuron Glia Biol. 3, 353–366.

Li, T., Ren, G., Lusardi, T., Wilz, A., Lan, J.Q., Iwasato, T., Itohara, S., Simon, R.P., Boison, D., 2008. Adenosine kinase is a target for the prediction and prevention of epileptogenesis in mice. J. Clin. Invest. 118, 571–582.

Li, X., Huang, Q., Long, H., Zhang, P., Su, H., Liu, J., 2018. A new gold(I) complex-Au(PPh3)PT is a deubiquitinase inhibitor and inhibits tumor growth. EBioMedicine 39, 159–172.

Li, X., Zhou, J., Chen, Z., Chen, S., Zhu, F., Zhou, L., 2008. Long-term expressional changes of Na+–K+–Cl− co-transporter 1 (NKCC1) and K+–Cl− co-transporter 2 (KCC2) in CA1 region of hippocampus following lithium-pilocarpine induced status epilepticus (PISE). Brain Res. 1221, 141–146.

Li, Y., Cleary, R., Kellogg, M., Soul, J.S., Berry, G.T., Jensen, F.E., 2011. Sensitive isotope dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for quantitative analysis of bumetanide in serum and brain tissue. J. Chromatogr. B 879, 998–1002.

Li, Y., Wang, H., Muffat, J., Cheng, A.W., Orlando, D.A., Lovén, J., Kwok, S.-M., Feldman, D.A., Bateup, H.S., Gao, Q., Hockemeyer, D., Mitalipova, M., Lewis, C.A., Vander Heiden, M.G., Sur, M., Young, R.A., Jaenisch, R., 2013. Global transcriptional and translational repression in human-embryonic-stem-cell-derived Rett syndrome neurons. Cell Stem Cell 13, 446–458.

Li Zhang, C., Dreier, J.P., Heinemann, U., 1995. Paroxysmal epileptiform discharges in temporal lobe slices after prolonged exposure to low magnesium are resistant to clinically used anticonvulsants. Epilepsy Res. 20, 105–111.

Liabeuf, S., Stuhl-Gourmand, L., Gackière, F., Mancuso, R., Sanchez Brualla, I., Marino, P., Brocard, F., Vinay, L., 2017. Prochlorperazine Increases KCC2 Function and Reduces Spasticity after Spinal Cord Injury. J. Neurotrauma 34, 3397–3406.

Lin, S.-H., Yu, I.-S., Jiang, S.-T., Lin, S.-W., Chu, P., Chen, A., Sytwu, H.-K., Sohara, E., Uchida, S., Sasaki, S., Yang, S.-S., 2011. Impaired phosphorylation of Na+-K+-2Cl− cotransporter by oxidative stress-responsive kinase-1 deficiency manifests hypotension and Bartter-like syndrome. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108, 17538–17543.

Lin, Y., Wang, Y., 2017. Neurostimulation as a promising epilepsy therapy. Epilepsia Open 2, 371–387.

Lin, Y.-T., Hsu, K.-S., 2018. Oxytocin receptor signaling in the hippocampus: Role in regulating neuronal excitability, network oscillatory activity, synaptic plasticity and social memory. Prog. Neurobiol. 171, 1–14.

Lindvall, O., Ernfors, P., Bengzon, J., Kokaia, Z., Smith, M.L., Siesjö, B.K., Persson, H., 1992. Differential regulation of mRNAs for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin 3 in the adult rat brain following cerebral ischemia and hypoglycemic coma. Proc. Natl. Acad. Sci. 89, 648–652.

Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J., 2001. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. Adv. Drug Deliv. Rev. 46, 3–26.

Liu, J.Y.W., Reeves, C., Diehl, B., Coppola, A., Al-Hajri, A., Hoskote, C., Mughairy, S.A., Tachrount, M., Groves, M., Michalak, Z., Mills, K., McEvoy, A.W., Miserocchi, A., Sisodiya, S.M., Thom, M., 2016. Early lipofuscin accumulation in frontal lobe epilepsy. Ann. Neurol. 80, 882–895.

Liu, K., Samuel, M., Harrison, R.K., Paslay, J.W., 2010. Rb+ efflux assay for assessment of non-selective cation channel activities. Assay Drug Dev. Technol. 8, 380–388.

Liu, S., Chang, S., Han, B., Xu, L., Zhang, M., Zhao, C., Yang, W., Wang, F., Li, J., Delpire, E., Ye, S., Bai, X., Guo, J., 2019. Cryo-EM structures of the human cation-chloride cotransporter KCC1. Science 366, 505–508.

Liu, Z., Nagao, T., Desjardins, G.C., Gloor, P., Avoli, M., 1994. Quantitative evaluation of neuronal loss in the dorsal hippocampus in rats with long-term pilocarpine seizures. Epilepsy Res. 17, 237–247.

Liubinas, S.V., Cassidy, D., Roten, A., Kaye, A.H., O'Brien, T.J., 2009. Tailored cortical resection following image guided subdural grid implantation for medically refractory epilepsy. J. Clin. Neurosci. 16, 1398–1408.

Liyanagedera, S., Williams, R.P., 2017. The new classification of seizures: an overview for the general physician. J. R. Coll. Physicians Edinb. 47, 336–338.

Lizhnyak, P.N., Muldoon, P.P., Pilaka, P.P., Povlishock, J.T., Ottens, A.K., 2019. Traumatic Brain Injury Temporal Proteome Guides KCC2-Targeted Therapy. J. Neurotrauma 36, 3092–3102.

Llano, O., Smirnov, S., Soni, S., Golubtsov, A., Guillemin, I., Hotulainen, P., Medina, I., Nothwang, H.G., Rivera, C., Ludwig, A., 2015. KCC2 regulates actin dynamics in dendritic spines via interaction with β-PIX. J. Cell Biol. 209, 671–686.

Lorenzo, L.-E., Godin, A.G., Ferrini, F., Bachand, K., Plasencia-Fernandez, I., Labrecque, S., Girard, A.A., Boudreau, D., Kianicka, I., Gagnon, M., Doyon, N., Ribeiro-da-Silva, A., De Koninck, Y., 2020. Enhancing neuronal chloride extrusion rescues α2/α3 GABAA-mediated analgesia in neuropathic pain. Nat. Commun. 11, 869.

Lorenzo, L.-E., Magnussen, C., Bailey, A.L., St Louis, M., De Koninck, Y., Ribeiro-da-Silva, A., 2014. Spatial and temporal pattern of changes in the number of GAD65-immunoreactive inhibitory terminals in the rat superficial dorsal horn following peripheral nerve injury. Mol. Pain 10, 57.

Löscher, W., 2002. Basic pharmacology of valproate: a review after 35 years of clinical use for the treatment of epilepsy. CNS Drugs 16, 669–694.

Löscher, W., 1985. Anticonvulsant action in the epileptic gerbil of novel inhibitors of GABA uptake. Eur. J. Pharmacol. 110, 103–108.

Löscher, W., Frey, H.H., Reiche, R., Schultz, D., 1983. High anticonvulsant potency of gamma-aminobutyric acid (GABA)mimetic drugs in gerbils with genetically determined epilepsy. J. Pharmacol. Exp. Ther. 226, 839–844.

Löscher, W., Hönack, D., Taylor, C.P., 1991. Gabapentin increases aminooxyacetic acid-induced GABA accumulation in several regions of rat brain. Neurosci. Lett. 128, 150–154.

Löscher, W., Kaila, K., 2021. Reply to the commentary by Ben-Ari and Delpire: Bumetanide and neonatal seizures: Fiction versus reality. Epilepsia 62, 941–946.

Löscher, W., Puskarjov, M., Kaila, K., 2013. Cation-chloride cotransporters NKCC1 and KCC2 as potential targets for novel antiepileptic and antiepileptogenic treatments. Neuropharmacology 69, 62–74.

Löscher, W., Schmidt, D., 2011. Modern antiepileptic drug development has failed to deliver: ways out of the current dilemma. Epilepsia 52, 657–678.

Lowe, A.J., David, E., Kilpatrick, C.J., Matkovic, Z., Cook, M.J., Kaye, A., O'Brien, T.J., 2004a. Epilepsy surgery for pathologically proven hippocampal sclerosis provides long-term seizure control and improved quality of life. Epilepsia 45, 237–242.

Lowe, A.J., David, E., Kilpatrick, C.J., Matkovic, Z., Cook, M.J., Kaye, A., O'Brien, T.J., 2004b. Epilepsy surgery for pathologically proven hippocampal sclerosis provides long-term seizure control and improved quality of life. Epilepsia 45, 237–242.

Lowenstein, D.H., Bleck, T., Macdonald, R.L., 1999. It's time to revise the definition of status epilepticus. Epilepsia 40, 120–122.

Loyens, E., Vermoesen, K., Schallier, A., Michotte, Y., Smolders, I., 2012. Proconvulsive effects of oxytocin in the generalized pentylenetetrazol mouse model are mediated by vasopressin 1a receptors. Brain Res. 1436, 43–50.

Lozovaya, N., Nardou, R., Tyzio, R., Chiesa, M., Pons-Bennaceur, A., Eftekhari, S., Bui, T.-T., Billon-Grand, M., Rasero, J., Bonifazi, P., Guimond, D., Gaiarsa, J.-L., Ferrari, D.C., Ben-Ari, Y., 2019. Early alterations in a mouse model of Rett syndrome: the GABA developmental shift is abolished at birth. Sci. Rep. 9, 9276.

Lu, B., Zhang, Q., Wang, H., Wang, Y., Nakayama, M., Ren, D., 2010. Extracellular Calcium Controls Background Current and Neuronal Excitability via an UNC79-UNC80-NALCN Cation Channel Complex. Neuron 68, 488–499.

Lu, J., Karadsheh, M., Delpire, E., 1999. Developmental regulation of the neuronal-specific isoform of K-CL cotransporter KCC2 in postnatal rat brains. J. Neurobiol. 39, 558–568.

Ludwig, A., Rivera, C., Uvarov, P., 2017. A noninvasive optical approach for assessing chloride extrusion activity of the K–Cl cotransporter KCC2 in neuronal cells. BMC Neurosci. 18, 23.

Ludwig, A., Uvarov, P., Pellegrino, C., Thomas-Crusells, J., Schuchmann, S., Saarma, M., Airaksinen, M.S., Rivera, C., 2011. Neurturin Evokes MAPK-Dependent Upregulation of Egr4 and KCC2 in Developing Neurons. Neural Plast. 2011, 641248.

Lykke, K., Töllner, K., Römermann, K., Feit, P.W., Erker, T., MacAulay, N., Löscher, W., 2015. Structure-activity relationships of bumetanide derivatives: correlation between diuretic activity in dogs and inhibition of the human NKCC2A transporter. Br. J. Pharmacol. 172, 4469–4480.

Ma, J.-J., Zhang, T.-Y., Diao, X.-T., Yao, L., Li, Y.-X., Suo, Z.-W., Yang, X., Hu, X.-D., Liu, Y.-N., 2021. BDNF modulated KCC2 ubiquitylation in spinal cord dorsal horn of mice. Eur. J. Pharmacol. 906, 174205.

MacAllister, S.L., Young, C., Guzdek, A., Zhidkov, N., O'Brien, P.J., 2013. Molecular cytotoxic mechanisms of chlorpromazine in isolated rat hepatocytes. Can. J. Physiol. Pharmacol. 91, 56–63.

MacAulay, N., Zeuthen, T., 2010. Water transport between CNS compartments: contributions of aquaporins and cotransporters. Neuroscience, Aquaporins in the Brain and Spinal Cord 168, 941–956.

MacGregor, D.G., Higgins, M.J., Jones, P.A., Maxwell, W.L., Watson, M.W., Graham, D.I., Stone, T.W., 1996. Ascorbate attenuates the systemic kainate-induced neurotoxicity in the rat hippocampus. Brain Res. 727, 133–144.

Machnes, Z.M., Huang, T.C.T., Chang, P.K.Y., Gill, R., Reist, N., Dezsi, G., Ozturk, E., Charron, F., O'Brien, T.J., Jones, N.C., McKinney, R.A., Szyf, M., 2013. DNA Methylation Mediates Persistent Epileptiform Activity In Vitro and In Vivo. PLOS ONE 8, e76299.

MacKenzie, G., Maguire, J., 2015. Chronic stress shifts the GABA reversal potential in the hippocampus and increases seizure susceptibility. Epilepsy Res. 109, 13–27.

Maglóczky, Z., Wittner, L., Borhegyi, Z., Halász, P., Vajda, J., Czirják, S., Freund, T.F., 2000. Changes in the distribution and connectivity of interneurons in the epileptic human dentate gyrus. Neuroscience 96, 7–25.

Magloire, V., Cornford, J., Lieb, A., Kullmann, D.M., Pavlov, I., 2019. KCC2 overexpression prevents the paradoxical seizure-promoting action of somatic inhibition. Nat. Commun. 10, 1225.

Maguire, J., Salpekar, J.A., 2013. Stress, seizures, and hypothalamic–pituitary–adrenal axis targets for the treatment of epilepsy. Epilepsy Behav., The Future of Translational Epilepsy Research 26, 352–362.

Mahadevan, V., Khademullah, C.S., Dargaei, Z., Chevrier, J., Uvarov, P., Kwan, J., Bagshaw, R.D., Pawson, T., Emili, A., De Koninck, Y., Anggono, V., Airaksinen, M., Woodin, M.A., 2017. Native KCC2 interactome reveals PACSIN1 as a critical regulator of synaptic inhibition. eLife 6, e28270.

Mahadevan, V., Pressey, J.C., Acton, B.A., Uvarov, P., Huang, M.Y., Chevrier, J., Puchalski, A., Li, C.M., Ivakine, E.A., Airaksinen, M.S., Delpire, E., McInnes, R.R., Woodin, M.A., 2014. Kainate Receptors Coexist in a Functional Complex with KCC2 and Regulate Chloride Homeostasis in Hippocampal Neurons. Cell Rep. 7, 1762–1770.

Maier, N., Morris, G., Johenning, F.W., Schmitz, D., 2009. An Approach for Reliably Investigating Hippocampal Sharp Wave-Ripples In Vitro. PLOS ONE 4, e6925.

Majumdar, D., Bevensee, M.O., 2010. Na-coupled bicarbonate transporters of the Slc4 family in the nervous system: function, localization, and relevance to neurologic function. Neuroscience 171, 951–972.

Manor, D., Rothman, D.L., Mason, G.F., Hyder, F., Petroff, O.A.C., Behar, K.L., 1996. The rate of turnover of cortical GABA from [1-13C]glucose is reduced in rats treated with the GABA-transaminase inhibitor vigabatrin (γ-vinyl GABA). Neurochem. Res. 21, 1031–1041.

Manteuffel, J., 2009. Use of antiemetics in children with acute gastroenteritis: Are they safe and effective? J. Emerg. Trauma Shock 2, 3–5.

Marchetto, M.C.N., Carromeu, C., Acab, A., Yu, D., Yeo, G.W., Mu, Y., Chen, G., Gage, F.H., Muotri, A.R., 2010. A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. Cell 143, 527–539.

Marchi, N., Oby, E., Batra, A., Uva, L., De Curtis, M., Hernandez, N., Van Boxel-Dezaire, A., Najm, I., Janigro, D., 2007. InVivo and InVitro Effects of Pilocarpine: Relevance to Ictogenesis. Epilepsia 48, 1934–1946.

Mares, P., 2009. Age- and dose-specific anticonvulsant action of bumetanide in immature rats. Physiol. Res. 58, 927–930.

Marguet, S.L., Le-Schulte, V.T.Q., Merseburg, A., Neu, A., Eichler, R., Jakovcevski, I., Ivanov, A., Hanganu-Opatz, I.L., Bernard, C., Morellini, F., Isbrandt, D., 2015. Treatment during a vulnerable developmental period rescues a genetic epilepsy. Nat. Med. 21, 1436–1444.

Markkanen, M., Karhunen, T., Llano, O., Ludwig, A., Rivera, C., Uvarov, P., Airaksinen, M.S., 2014. Distribution of neuronal KCC2a and KCC2b isoforms in mouse CNS. J. Comp. Neurol. 522, 1897–1914.

Markkanen, M., Ludwig, A., Khirug, S., Pryazhnikov, E., Soni, S., Khiroug, L., Delpire, E., Rivera, C., Airaksinen, M.S., Uvarov, P., 2017. Implications of the N-terminal heterogeneity for the neuronal K-Cl cotransporter KCC2 function. Brain Res. 1675, 87–101.

Markkanen, M., Uvarov, P., Airaksinen, M.S., 2008. Role of upstream stimulating factors in the transcriptional regulation of the neuron-specific K–Cl cotransporter KCC2. Brain Res. 1236, 8–15.

Markova, O., Mukhtarov, M., Real, E., Jacob, Y., Bregestovski, P., 2008. Genetically encoded chloride indicator with improved sensitivity. J. Neurosci. Methods 170, 67–76.

Marsan, E., Baulac, S., 2018. Review: Mechanistic target of rapamycin (mTOR) pathway, focal cortical dysplasia and epilepsy. Neuropathol. Appl. Neurobiol. 44, 6–17.

Marson, A., Jacoby, A., Johnson, A., Kim, L., Gamble, C., Chadwick, D., 2005. Immediate versus deferred antiepileptic drug treatment for early epilepsy and single seizures: a randomised controlled trial 365, 7.

Martin, B.S., Kapur, J., 2008. A combination of ketamine and diazepam synergistically controls refractory status epilepticus induced by cholinergic stimulation. Epilepsia 49, 248–255.

Masino, S.A., Li, T., Theofilas, P., Sandau, U.S., Ruskin, D.N., Fredholm, B.B., Geiger, J.D., Aronica, E., Boison, D., 2011. A ketogenic diet suppresses seizures in mice through adenosine A_1 receptors. J. Clin. Invest. 121, 2679–2683.

Matsumoto, A., Brinkmann, B.H., Matthew Stead, S., Matsumoto, J., Kucewicz, M.T., Marsh, W.R., Meyer, F., Worrell, G., 2013. Pathological and physiological high-frequency oscillations in focal human epilepsy. J. Neurophysiol. 110, 1958–1964.

Mavrovic, M., Uvarov, P., Delpire, E., Vutskits, L., Kaila, K., Puskarjov, M., 2020. Loss of non-canonical KCC2 functions promotes developmental apoptosis of cortical projection neurons. EMBO Rep. 21, e48880.

Mazarati, A., Shin, D., Sankar, R., 2009. Bumetanide inhibits rapid kindling in neonatal rats. Epilepsia 50, 2117–2122.

Mazarati, A.M., Lewis, M.L., Pittman, Q.J., 2017. Neurobehavioral comorbidities of epilepsy: Role of inflammation. Epilepsia 58, 48–56.

McClelland, S., Brennan, G.P., Dubé, C., Rajpara, S., Iyer, S., Richichi, C., Bernard, C., Baram, T.Z., 2014. The transcription factor NRSF contributes to epileptogenesis by selective repression of a subset of target genes. eLife 3, e01267.

McKhann, G.M., Wenzel, H.J., Robbins, C.A., Sosunov, A.A., Schwartzkroin, P.A., 2003. Mouse strain differences in kainic acid sensitivity, seizure behavior, mortality, and hippocampal pathology. Neuroscience 122, 551–561.

McLachlan, R.S., Pigott, S., Tellez-Zenteno, J.F., Wiebe, S., Parrent, A., 2010. Bilateral hippocampal stimulation for intractable temporal lobe epilepsy: Impact on seizures and memory. Epilepsia 51, 304–307.

McNamara, J.O., 1994. Cellular and molecular basis of epilepsy. J. Neurosci. 14, 3413–3425.

McNamara, J.O., Scharfman, H.E., 2012. Temporal Lobe Epilepsy and the BDNF Receptor, TrkB, in: Noebels, J.L., Avoli, M., Rogawski, M.A., Olsen, R.W., Delgado-Escueta, A.V. (Eds.), Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies. National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD).

McTague, A., Howell, K.B., Cross, J.H., Kurian, M.A., Scheffer, I.E., 2016. The genetic landscape of the epileptic encephalopathies of infancy and childhood. Lancet Neurol. 15, 304–316.

Mefford, H.C., 2015. Clinical Genetic Testing in Epilepsy. Epilepsy Curr. 15, 197–201.

Mello, L.E., Cavalheiro, E.A., Tan, A.M., Kupfer, W.R., Pretorius, J.K., Babb, T.L., Finch, D.M., 1993. Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. Epilepsia 34, 985–995.

Mercado, A., Broumand, V., Zandi-Nejad, K., Enck, A.H., Mount, D.B., 2006a. A C-terminal Domain in KCC2 Confers Constitutive K+-Cl- Cotransport*. J. Biol. Chem. 281, 1016–1026.

Mercado, A., Broumand, V., Zandi-Nejad, K., Enck, A.H., Mount, D.B., 2006b. A C-terminal domain in KCC2 confers constitutive K+-Cl- cotransport. J. Biol. Chem. 281, 1016–1026.

Mercado, A., Mount, D.B., Gamba, G., 2004. Electroneutral cation-chloride cotransporters in the central nervous system. Neurochem. Res. 29, 17–25.

Merner, N.D., Chandler, M.R., Bourassa, C., Liang, B., Khanna, A.R., Dion, P., Rouleau, G.A., Kahle, K.T., 2015. Regulatory domain or CpG site variation in SLC12A5, encoding the chloride transporter KCC2, in human autism and schizophrenia. Front. Cell. Neurosci. 9, 386.

Michiels, M., Meuldermans, W., Heykants, J., 1987. The Metabolism and Fate of Closantel (Flukiver) in Sheep and Cattle. Drug Metab. Rev. 18, 235–251.

Mikawa, S., Wang, C., Shu, F., Wang, T., Fukuda, A., Sato, K., 2002. Developmental changes in KCC1, KCC2 and NKCC1 mRNAs in the rat cerebellum. Dev. Brain Res. 136, 93–100.

Milby, A.H., Halpern, C.H., Baltuch, G.H., 2009. Vagus nerve stimulation in the treatment of refractory epilepsy. Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother. 6, 228–237.

Milenković, I., Rübsamen, R., 2011. Development of the Chloride Homeostasis in the Auditory Brainstem. Physiol. Res. S15–S27.

Miletic, G., Miletic, V., 2008. Loose ligation of the sciatic nerve is associated with TrkB receptor-dependent decreases in KCC2 protein levels in the ipsilateral spinal dorsal horn. Pain 137, 532–539.

Millan, M.J., 2002. Descending control of pain. Prog. Neurobiol. 66, 355–474.

Miller, A.H., Haroon, E., Felger, J.C., 2017. The Immunology of Behavior—Exploring the Role of the Immune System in Brain Health and Illness. Neuropsychopharmacology 42, 1–4.

Miller, C.J., Turk, B.E., 2018. Homing in: Mechanisms of Substrate Targeting by Protein Kinases. Trends Biochem. Sci. 43, 380–394.

Miller, L.L., Pellock, J.M., DeLorenzo, R.J., Meyer, J.M., Corey, L.A., 1998. Univariate genetic analyses of epilepsy and seizures in a population-based twin study: The Virginia twin registry. Genet. Epidemiol. 15, 33–49.

Min, X., Lee, B.-H., Cobb, M.H., Goldsmith, E.J., 2004a. Crystal Structure of the Kinase Domain of WNK1, a Kinase that Causes a Hereditary Form of Hypertension. Structure 12, 1303–1311.

Min, X., Lee, B.-H., Cobb, M.H., Goldsmith, E.J., 2004b. Crystal structure of the kinase domain of WNK1, a kinase that causes a hereditary form of hypertension. Struct. Lond. Engl. 1993 12, 1303–1311.

Møller, R.S., Weckhuysen, S., Chipaux, M., Marsan, E., Taly, V., Bebin, E.M., Hiatt, S.M., Prokop, J.W., Bowling, K.M., Mei, D., Conti, V., de la Grange, P., Ferrand-Sorbets, S., Dorfmüller, G., Lambrecq, V., Larsen, L.H.G., Leguern, E., Guerrini, R., Rubboli, G., Cooper, G.M., Baulac, S., 2016. Germline and somatic mutations in the MTOR gene in focal cortical dysplasia and epilepsy. Neurol. Genet. 2, e118.

Mollica, J.P., Oakhill, J.S., Lamb, G.D., Murphy, R.M., 2009. Are genuine changes in protein expression being overlooked? Reassessing Western blotting. Anal. Biochem. 386, 270–275.

Moore, K.A., Kohno, T., Karchewski, L.A., Scholz, J., Baba, H., Woolf, C.J., 2002. Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 22, 6724–6731.

Moore, Y.E., Deeb, T.Z., Chadchankar, H., Brandon, N.J., Moss, S.J., 2018. Potentiating KCC2 activity is sufficient to limit the onset and severity of seizures. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 115, 10166–10171.

Moore, Y.E., Kelley, M.R., Brandon, N.J., Deeb, T.Z., Moss, S.J., 2017. Seizing Control of KCC2: A New Therapeutic Target for Epilepsy. Trends Neurosci. 40, 555–571.

Moore-Hoon, M.L., Turner, R.J., 2000. The Structural Unit of the Secretory Na+−K+−2Cl- Cotransporter (NKCC1) Is a Homodimer. Biochemistry 39, 3718–3724.

Morgan, R.J., Soltesz, I., 2008. Nonrandom connectivity of the epileptic dentate gyrus predicts a major role for neuronal hubs in seizures. Proc. Natl. Acad. Sci. 105, 6179–6184.

Mori, T., Kikuchi, E., Watanabe, Y., Fujii, S., Ishigami-Yuasa, M., Kagechika, H., Sohara, E., Rai, T., Sasaki, S., Uchida, S., 2013. Chemical library screening for WNK signalling inhibitors using fluorescence correlation spectroscopy. Biochem. J. 455, 339–345.

Moriguchi, T., Urushiyama, S., Hisamoto, N., Iemura, S., Uchida, S., Natsume, T., Matsumoto, K., Shibuya, H., 2005. WNK1 Regulates Phosphorylation of Cation-Chloride-coupled Cotransporters via the STE20-related Kinases, SPAK and OSR1 *. J. Biol. Chem. 280, 42685–42693.

Morita, K., Motoyama, N., Kitayama, T., Morioka, N., Kifune, K., Dohi, T., 2008. Spinal antiallodynia action of glycine transporter inhibitors in neuropathic pain models in mice. J. Pharmacol. Exp. Ther. 326, 633–645.

Morrell, M.J., RNS System in Epilepsy Study Group, 2011. Responsive cortical stimulation for the treatment of medically intractable partial epilepsy. Neurology 77, 1295–1304.

Mullen, S.A., Carvill, G.L., Bellows, S., Bayly, M.A., Berkovic, S.F., Dibbens, L.M., Scheffer, I.E., Mefford, H.C., 2013. Copy number variants are frequent in genetic generalized epilepsy with intellectual disability. Neurology 81, 1507–1514.

Müller, C.J., Bankstahl, M., Gröticke, I., Löscher, W., 2009. Pilocarpine vs. lithium-pilocarpine for induction of status epilepticus in mice: development of spontaneous seizures, behavioral alterations and neuronal damage. Eur. J. Pharmacol. 619, 15–24.

Mumoli, L., Palleria, C., Gasparini, S., Citraro, R., Labate, A., Ferlazzo, E., Gambardella, A., De Sarro, G., Russo, E., 2015. Brivaracetam: review of its pharmacology and potential use as adjunctive therapy in patients with partial onset seizures. Drug Des. Devel. Ther. 9, 5719–5725.

Munakata, M., Watanabe, M., Otsuki, T., Nakama, H., Arima, K., Itoh, M., Nabekura, J., Iinuma, K., Tsuchiya, S., 2007. Altered distribution of KCC2 in cortical dysplasia in patients with intractable epilepsy. Epilepsia 48, 837–844.

Muñoz, A., Méndez, P., DeFelipe, J., Alvarez-Leefmans, F.J., 2007a. Cation-chloride cotransporters and GABA-ergic innervation in the human epileptic hippocampus. Epilepsia 48, 663–673.

Muñoz, A., Méndez, P., DeFelipe, J., Alvarez-Leefmans, F.J., 2007b. Cation-Chloride Cotransporters and GABA-ergic Innervation in the Human Epileptic Hippocampus. Epilepsia 48, 663–673.

Munro, S., 2003. Lipid rafts: elusive or illusive? Cell 115, 377–388.

Murakami, Y., Kohyama, N., Kobayashi, Y., Ohbayashi, M., Ohtani, H., Sawada, Y., Yamamoto, T., 2005. Functional Characterization of Human Monocarboxylate Transporter 6 (slc16a5). Drug Metab. Dispos. 33, 1845–1851.

Murphy, R.M., Lamb, G.D., 2013. Important considerations for protein analyses using antibody based techniques: down-sizing Western blotting up-sizes outcomes. J. Physiol. 591, 5823–5831.

Murphy, R.M., Larkins, N.T., Mollica, J.P., Beard, N.A., Lamb, G.D., 2009. Calsequestrin content and SERCA determine normal and maximal Ca2+ storage levels in sarcoplasmic reticulum of fast- and slow-twitch fibres of rat. J. Physiol. 587, 443–460.

Murphy, R.M., Mollica, J.P., Beard, N.A., Knollmann, B.C., Lamb, G.D., 2011. Quantification of calsequestrin 2 (CSQ2) in sheep cardiac muscle and Ca2+-binding protein changes in CSQ2 knockout mice. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 300, H595-604.

Nagarkatti, N., Deshpande, L.S., DeLorenzo, R.J., 2008. Levetiracetam inhibits both ryanodine and IP3 receptor activated calcium induced calcium release in hippocampal neurons in culture. Neurosci. Lett. 436, 289–293.

Nagasawa, T., Juhász, C., Rothermel, R., Hoechstetter, K., Sood, S., Asano, E., 2012. Spontaneous and visually driven high-frequency oscillations in the occipital cortex: Intracranial recording in epileptic patients. Hum. Brain Mapp. 33, 569–583.

Naguro, I., Umeda, T., Kobayashi, Y., Maruyama, J., Hattori, K., Shimizu, Y., Kataoka, K., Kim-Mitsuyama, S., Uchida, S., Vandewalle, A., Noguchi, T., Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Takeda, K., Ichijo, H., 2012. ASK3 responds to osmotic stress and regulates blood pressure by suppressing WNK1-SPAK/OSR1 signaling in the kidney. Nat. Commun. 3, 1285.

Naito, S., Ohta, A., Sohara, E., Ohta, E., Rai, T., Sasaki, S., Uchida, S., 2011. Regulation of WNK1 kinase by extracellular potassium. Clin. Exp. Nephrol. 15, 195–202.

Nakamura, K., Moorhouse, A.J., Cheung, D.L., Eto, K., Takeda, I., Rozenbroek, P.W., Nabekura, J., 2019. Overexpression of neuronal K+–Cl− co-transporter enhances dendritic spine plasticity and motor learning. J. Physiol. Sci. 69, 453–463.

Ngugi, A.K., Bottomley, C., Kleinschmidt, I., Sander, J.W., Newton, C.R., 2010. Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: a meta-analytic approach. Epilepsia 51, 883–890.

Nguyen, M.V.C., Du, F., Felice, C.A., Shan, X., Nigam, A., Mandel, G., Robinson, J.K., Ballas, N., 2012. MeCP2 is critical for maintaining mature neuronal networks and global brain anatomy during late stages of postnatal brain development and in the mature adult brain. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 32, 10021–10034.

Nielsen, E.B., Suzdak, P.D., Andersen, K.E., Knutsen, L.J.S., Sonnewald, U., Braestrup, C., 1991. Characterization of tiagabine (NO-328), a new potent and selective GABA uptake inhibitor. Eur. J. Pharmacol. 196, 257–266.

Nielsen, J.B., Crone, C., Hultborn, H., 2007. The spinal pathophysiology of spasticity--from a basic science point of view. Acta Physiol. Oxf. Engl. 189, 171–180.

Nikiforov, A., Kulikova, V., Ziegler, M., 2015. The human NAD metabolome: Functions, metabolism and compartmentalization. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 50, 284–297.

Nirwan, N., Vyas, P., Vohora, D., 2018. Animal models of status epilepticus and temporal lobe epilepsy: a narrative review. Rev. Neurosci. 29, 757–770.

Nishimura, M., Kakigi, A., Takeda, T., Takeda, S., Doi, K., 2009. Expression of aquaporins, vasopressin type 2 receptor, and Na+-K+-Cl– cotransporters in the rat endolymphatic sac. Acta Otolaryngol. (Stockh.) 129, 812–818.

Norlander, A.E., Saleh, M.A., Pandey, A.K., Itani, H.A., Wu, J., Xiao, L., Kang, J., Dale, B.L., Goleva, S.B., Laroumanie, F., Du, L., Harrison, D.G., Madhur, M.S., 2017. A salt-sensing kinase in T lymphocytes, SGK1, drives hypertension and hypertensive end-organ damage. JCI Insight 2, e92801.

Novello, F.C., Sprague, J.M., 1957. BENZOTHIADIAZINE DIOXIDES AS NOVEL DIURETICS. J. Am. Chem. Soc. 79, 2028–2029.

Nowell, M., Miserocchi, A., McEvoy, A.W., Duncan, J.S., 2014. Advances in epilepsy surgery. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 85, 1273–1279.

O'Brien, T.J., Miles, K., Ware, R., Cook, M.J., Binns, D.S., Hicks, R.J., 2008. The cost-effective use of 18F-FDG PET in the presurgical evaluation of medically refractory focal epilepsy. J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med. 49, 931–937.

Ogren, J.A., Wilson, C.L., Bragin, A., Lin, J.J., Salamon, N., Dutton, R.A., Luders, E., Fields, T.A., Fried, I., Toga, A.W., Thompson, P.M., Engel, J., Staba, R.J., 2009. Three-dimensional surface maps link local atrophy and fast ripples in human epileptic hippocampus. Ann. Neurol. 66, 783–791.

Okada-Ogawa, A., Nakaya, Y., Imamura, Y., Kobayashi, M., Shinoda, M., Kita, K., Sessle, B.J., Iwata, K., 2015. Involvement of medullary GABAergic system in extraterritorial neuropathic pain mechanisms associated with inferior alveolar nerve transection. Exp. Neurol. 267, 42–52.

Okubo, Y., Matsuura, M., Asai, T., Asai, K., Kato, M., Kojima, T., Toru, M., 1993. A follow-up study of healthy children with epileptiform EEG discharges. J. Epilepsy 6, 250–256.

Okudan, Z.V., Özkara, Ç., 2018. Reflex epilepsy: triggers and management strategies. Neuropsychiatr. Dis. Treat. 14, 327–337.

Okuneva, O., Körber, I., Li, Z., Tian, L., Joensuu, T., Kopra, O., Lehesjoki, A.-E., 2015. Abnormal microglial activation in the Cstb−/− mouse, a model for progressive myoclonus epilepsy, EPM1. Glia 63, 400–411.

Olsen, U.B., 1977. The pharmacology of bumetanide. Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh.) 41, 1–29.

Olson, H., Shen, Y., Avallone, J., Sheidley, B.R., Pinsky, R., Bergin, A.M., Berry, G.T., Duffy, F.H., Eksioglu, Y., Harris, D.J., Hisama, F.M., Ho, E., Irons, M., Jacobsen, C.M., James, P., Kothare, S., Khwaja, O., Lipton, J., Loddenkemper, T., Markowitz, J., Maski, K., Megerian, J.T., Neilan, E., Raffalli, P.C., Robbins, M., Roberts, A., Roe, E., Rollins, C., Sahin, M., Sarco, D., Schonwald, A., Smith, S.E., Soul, J., Stoler, J.M., Takeoka, M., Tan, W.-H., Torres, A.R., Tsai, P., Urion, D.K., Weissman, L., Wolff, R., Wu, B.-L., Miller, D.T., Poduri, A., 2014. Copy number variation plays an important role in clinical epilepsy. Ann. Neurol. 75, 943–958.

Orcinha, C., Münzner, G., Gerlach, J., Kilias, A., Follo, M., Egert, U., Haas, C.A., 2016. Seizure-Induced Motility of Differentiated Dentate Granule Cells Is Prevented by the Central Reelin Fragment. Front. Cell. Neurosci. 10.

Orr, S.L., Friedman, B.W., Christie, S., Minen, M.T., Bamford, C., Kelley, N.E., Tepper, D., 2016. Management of Adults With Acute Migraine in the Emergency Department: The American Headache Society Evidence Assessment of Parenteral Pharmacotherapies. Headache J. Head Face Pain 56, 911–940.

Ortinski, P.I., Dong, J., Mungenast, A., Yue, C., Takano, H., Watson, D.J., Haydon, P.G., Coulter, D.A., 2010. Selective induction of astrocytic gliosis generates deficits in neuronal inhibition. Nat. Neurosci. 13, 584–591.

Ostroumov, A., Wittenberg, R.E., Kimmey, B.A., Taormina, M.B., Holden, W.M., McHugh, A.T., Dani, J.A., 2020. Acute Nicotine Exposure Alters Ventral Tegmental Area Inhibitory Transmission and Promotes Diazepam Consumption. eNeuro 7, ENEURO.0348-19.2020.

Otręba, M., Pajor, M., Warncke, J.D., 2019. Antimelanoma activity of perphenazine and prochlorperazine in human COLO829 and C32 cell lines. Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 392, 1257–1264.

Otsu, Y., Donneger, F., Schwartz, E.J., Poncer, J.C., 2020. Cation–chloride cotransporters and the polarity of GABA signalling in mouse hippocampal parvalbumin interneurons. J. Physiol. 598, 1865–1880.

Overwater, I.E., Rietman, A.B., van Eeghen, A.M., de Wit, M.C.Y., 2019. Everolimus for the treatment of refractory seizures associated with tuberous sclerosis complex (TSC): current perspectives. Ther. Clin. Risk Manag. 15, 951–955.

Owen, D.M., Magenau, A., Williamson, D., Gaus, K., 2012. The lipid raft hypothesis revisited--new insights on raft composition and function from super-resolution fluorescence microscopy. BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol. 34, 739–747.

Pacifici, G.M., 2012. Clinical Pharmacology of the Loop Diuretics Furosemide and Bumetanide in Neonates and Infants. Pediatr. Drugs 14, 233–246.

Paige, C., Plasencia-Fernandez, I., Kume, M., Papalampropoulou-Tsiridou, M., Lorenzo, L.-E., David, E.T., He, L., Mejia, G.L., Driskill, C., Ferrini, F., Feldhaus, A.L., Garcia-Martinez, L.F., Akopian, A.N., Koninck, Y.D., Dussor, G., Price, T.J., 2022. A Female-Specific Role for Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) in Rodent Pain Models. J. Neurosci. 42, 1930–1944.

Pail, M., Řehulka, P., Cimbálník, J., Doležalová, I., Chrastina, J., Brázdil, M., 2017. Frequency-independent characteristics of high-frequency oscillations in epileptic and non-epileptic regions. Clin. Neurophysiol. 128, 106–114.

Painter, M.J., Scher, M.S., Stein, A.D., Armatti, S., Wang, Z., Gardiner, J.C., Paneth, N., Minnigh, B., Alvin, J., 1999. Phenobarbital compared with phenytoin for the treatment of neonatal seizures. N. Engl. J. Med. 341, 485–489.

Pallud, J., Le Van Quyen, M., Bielle, F., Pellegrino, C., Varlet, P., Cresto, N., Baulac, M., Duyckaerts, C., Kourdougli, N., Chazal, G., Devaux, B., Rivera, C., Miles, R., Capelle, L., Huberfeld, G., 2014. Cortical GABAergic excitation contributes to epileptic activities around human glioma. Sci. Transl. Med. 6, 244ra89.

Palma, E., Amici, M., Sobrero, F., Spinelli, G., Di Angelantonio, S., Ragozzino, D., Mascia, A., Scoppetta, C., Esposito, V., Miledi, R., Eusebi, F., 2006. Anomalous levels of Cl− transporters in the hippocampal subiculum from temporal lobe epilepsy patients make GABA excitatory. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103, 8465–8468.

Pan, G., Li, Y., Geng, H.-Y., Yang, J.-M., Li, K.-X., Li, X.-M., 2015. Preserving GABAergic interneurons in acute brain slices of mice using the N-methyl-D-glucamine-based artificial cerebrospinal fluid method. Neurosci. Bull. 31, 265–270.

Panet, R., Eliash, M., Pick, M., Atlan, H., 2002. Na(+)/K(+)/Cl(-) cotransporter activates mitogen-activated protein kinase in fibroblasts and lymphocytes. J. Cell. Physiol. 190, 227–237.

Papp, E., Rivera, C., Kaila, K., Freund, T.F., 2008. Relationship between neuronal vulnerability and potassium-chloride cotransporter 2 immunoreactivity in hippocampus following transient forebrain ischemia. Neuroscience 154, 677–689.

Parent, J.M., Kron, M.M., 2012. Neurogenesis and Epilepsy, in: Noebels, J.L., Avoli, M., Rogawski, M.A., Olsen, R.W., Delgado-Escueta, A.V. (Eds.), Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies. National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD).

Parent, J.M., von dem Bussche, N., Lowenstein, D.H., 2006. Prolonged seizures recruit caudal subventricular zone glial progenitors into the injured hippocampus. Hippocampus 16, 321–328.

Parent, J.M., Yu, T.W., Leibowitz, R.T., Geschwind, D.H., Sloviter, R.S., Lowenstein, D.H., 1997. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 17, 3727–3738.

Patenaude, C., Massicotte, G., Lacaille, J.-C., 2005. Cell-type specific GABA synaptic transmission and activity-dependent plasticity in rat hippocampal stratum radiatum interneurons. Eur. J. Neurosci. 22, 179–188.

Pathak, H.R., Weissinger, F., Terunuma, M., Carlson, G.C., Hsu, F.-C., Moss, S.J., Coulter, D.A., 2007. Disrupted Dentate Granule Cell Chloride Regulation Enhances Synaptic Excitability during Development of Temporal Lobe Epilepsy. J. Neurosci. 27, 14012–14022.

Pauletti, A., Terrone, G., Shekh-Ahmad, T., Salamone, A., Ravizza, T., Rizzi, M., Pastore, A., Pascente, R., Liang, L.-P., Villa, B.R., Balosso, S., Abramov, A.Y., van Vliet, E.A., Del Giudice, E., Aronica, E., Patel, M., Walker, M.C., Vezzani, A., 2019. Targeting oxidative stress improves disease outcomes in a rat model of acquired epilepsy. Brain J. Neurol. 142, e39.

Paulus, W., Rothwell, J.C., 2016. Membrane resistance and shunting inhibition: where biophysics meets state-dependent human neurophysiology. J. Physiol. 594, 2719–2728.

Pavlov, V.A., Chavan, S.S., Tracey, K.J., 2018. Molecular and Functional Neuroscience in Immunity. Annu. Rev. Immunol. 36, 783–812.

Pavlova, M.K., Shea, S.A., Bromfield, E.B., 2004. Day/night patterns of focal seizures. Epilepsy Behav. 5, 44–49.

Payne, John A., 1997. Functional characterization of the neuronal-specific K-Cl cotransporter: implications for [K+]oregulation. Am. J. Physiol.-Cell Physiol. 273, C1516–C1525.

Payne, J. A., 1997. Functional characterization of the neuronal-specific K-Cl cotransporter: implications for [K+]o regulation. Am. J. Physiol. 273, C1516-1525.

Payne, J.A., Rivera, C., Voipio, J., Kaila, K., 2003. Cation–chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. Trends Neurosci. 26, 199–206.

Payne, J.A., Stevenson, T.J., Donaldson, L.F., 1996. Molecular Characterization of a Putative K-Cl Cotransporter in Rat Brain: A NEURONAL-SPECIFIC ISOFORM*. J. Biol. Chem. 271, 16245–16252.

Pearce, M.S., Salotti, J.A., Little, M.P., McHugh, K., Lee, C., Kim, K.P., Howe, N.L., Ronckers, C.M., Rajaraman, P., Craft, A.W., Parker, L., Berrington de González, A., 2012. Radiation exposure from CT scans in childhood and subsequent risk of leukaemia and brain tumours: a retrospective cohort study. The Lancet 380, 499–505.

Pearson, M.M., Lu, J., Mount, D.B., Delpire, E., 2001. Localization of the K+–Cl− cotransporter, KCC3, in the central and peripheral nervous systems: expression in the choroid plexus, large neurons and white matter tracts. Neuroscience 103, 481–491.

Pellegrino, C., Gubkina, O., Schaefer, M., Becq, H., Ludwig, A., Mukhtarov, M., Chudotvorova, I., Corby, S., Salyha, Y., Salozhin, S., Bregestovski, P., Medina, I., 2011a. Knocking down of the KCC2 in rat hippocampal neurons increases intracellular chloride concentration and compromises neuronal survival. J. Physiol. 589, 2475–2496.

Pellegrino, C., Gubkina, O., Schaefer, M., Becq, H., Ludwig, A., Mukhtarov, M., Chudotvorova, I., Corby, S., Salyha, Y., Salozhin, S., Bregestovski, P., Medina, I., 2011b. Knocking down of the KCC2 in rat hippocampal neurons increases intracellular chloride concentration and compromises neuronal survival. J. Physiol. 589, 2475–2496.

Pellegrino, C., Gubkina, O., Schaefer, M., Becq, H., Ludwig, A., Mukhtarov, M., Chudotvorova, I., Corby, S., Salyha, Y., Salozhin, S., Bregestovski, P., Medina, I., 2011c. Knocking down of the KCC2 in rat hippocampal neurons increases intracellular chloride concentration and compromises neuronal survival. J. Physiol. 589, 2475–2496.

Peña, E., Borrué, C., Mata, M., Martínez-Castrillo, J.C., Alonso-Canovas, A., Chico, J.L., López-Manzanares, L., Llanero, M., Herreros-Rodríguez, J., Esquivel, A., Maycas-Cepeda, T., Ruíz-Huete, C., 2021. Impact of SAfinamide on

Depressive Symptoms in Parkinson's Disease Patients (SADness-PD Study): A Multicenter Retrospective Study. Brain Sci. 11, 232.

Perry, J.S.A., Morioka, S., Medina, C.B., Iker Etchegaray, J., Barron, B., Raymond, M.H., Lucas, C.D., Onengut-Gumuscu, S., Delpire, E., Ravichandran, K.S., 2019. Interpreting an apoptotic corpse as anti-inflammatory involves a chloride sensing pathway. Nat. Cell Biol. 21, 1532–1543.

Perucca, E., Tomson, T., 2011. The pharmacological treatment of epilepsy in adults. Lancet Neurol. 10, 446–456.

Perucca, P., Scheffer, I.E., Harvey, A.S., James, P.A., Lunke, S., Thorne, N., Gaff, C., Regan, B.M., Damiano, J.A., Hildebrand, M.S., Berkovic, S.F., O'Brien, T.J., Kwan, P., 2017. Real-world utility of whole exome sequencing with targeted gene analysis for focal epilepsy. Epilepsy Res. 131, 1–8.

Petito, G., Housekeeper, J., Buroker, J., Scholle, C., Ervin, B., Arya, R., 2022. Diurnal Periodicity in Spontaneously Occurring High-Frequency Oscillations in Intracranial EEG (P12-5.004). Neurology 98.

Petkova, Z., Tchekalarova, J., Pechlivanova, D., Moyanova, S., Kortenska, L., Mitreva, R., Popov, D., Markova, P., Lozanov, V., Atanasova, D., Lazarov, N., Stoynev, A., 2014. Treatment with melatonin after status epilepticus attenuates seizure activity and neuronal damage but does not prevent the disturbance in diurnal rhythms and behavioral alterations in spontaneously hypertensive rats in kainate model of temporal lobe epilepsy. Epilepsy Behav. EB 31, 198–208.

Petrini, E.M., Barberis, A., 2014. Methods for the Study of Synaptic Receptor Functional Properties, in: Martina, M., Taverna, S. (Eds.), Patch-Clamp Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. Springer, New York, NY, pp. 117–141.

Petroff, O.A.C., Hyder, F., Rothman, D.L., Mattson, R.H., 2000. Effects of Gabapentin on Brain GABA, Homocarnosine, and Pyrrolidinone in Epilepsy Patients. Epilepsia 41, 675–680.

Peukert, S., Hughes, R., Nunez, J., He, G., Yan, Z., Jain, R., Llamas, L., Luchansky, S., Carlson, A., Liang, G., Kunjathoor, V., Pietropaolo, M., Shapiro, J., Castellana, A., Wu, X., Bose, A., 2014. Discovery of 2-Pyridylpyrimidines as the First Orally Bioavailable GPR39 Agonists. ACS Med. Chem. Lett. 5, 1114–1118.

Pfeffer, C.K., Stein, V., Keating, D.J., Maier, H., Rinke, I., Rudhard, Y., Hentschke, M., Rune, G.M., Jentsch, T.J., Hübner, C.A., 2009. NKCC1-Dependent GABAergic Excitation Drives Synaptic Network Maturation during Early Hippocampal Development. J. Neurosci. 29, 3419–3430.

Piala, A.T., Moon, T.M., Akella, R., He, H., Cobb, M.H., Goldsmith, E.J., 2014. Chloride sensing by WNK1 kinase involves inhibition of autophosphorylation. Sci. Signal. 7, ra41.

Pierce, J.P., Melton, J., Punsoni, M., McCloskey, D.P., Scharfman, H.E., 2005. Mossy fibers are the primary source of afferent input to ectopic granule cells that are born after pilocarpine-induced seizures. Exp. Neurol. 196, 316–331.

Pinkas, D.M., Bufton, J.C., Bartual, S.G., Chen, Z., Daubner, G.M., Schumacher, F.-R., Georghiou, G., Zhang, J., Sorrell, F.J., Kurz, T., Alessi, D.R., Bullock, A.N., 2017. Human With No Lysine Kinase 3 (WNK3); A Target Enabling Package.

Pitkänen, A., Lukasiuk, K., Dudek, F.E., Staley, K.J., 2015. Epileptogenesis. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 5, a022822.

Pittau, F., Bisulli, F., Mai, R., Fares, J.E., Vignatelli, L., Labate, A., Naldi, I., Avoni, P., Parmeggiani, A., Santucci, M., Capannelli, D., Di Vito, L., Gambardella, A., Baruzzi, A., Tinuper, P., 2009a. Prognostic factors in patients with mesial temporal lobe epilepsy. Epilepsia 50, 41–44.

Pittau, F., Bisulli, F., Mai, R., Fares, J.E., Vignatelli, L., Labate, A., Naldi, I., Avoni, P., Parmeggiani, A., Santucci, M., Capannelli, D., Di Vito, L., Gambardella, A., Baruzzi, A., Tinuper, P., 2009b. Prognostic factors in patients with mesial temporal lobe epilepsy. Epilepsia 50, 41–44.

Plantier, V., Sanchez-Brualla, I., Dingu, N., Brocard, C., Liabeuf, S., Gackière, F., Brocard, F., 2019. Calpain fosters the hyperexcitability of motoneurons after spinal cord injury and leads to spasticity. eLife 8, e51404.

Plotkin, M.D., Kaplan, M.R., Peterson, L.N., Gullans, S.R., Hebert, S.C., Delpire, E., 1997. Expression of the Na(+)-K(+)-2Cl- cotransporter BSC2 in the nervous system. Am. J. Physiol.-Cell Physiol. 272, C173–C183.

Poduri, A., 2017. When Should Genetic Testing Be Performed in Epilepsy Patients? Epilepsy Curr. 17, 16–22.

Poduri, A., Lowenstein, D., 2011. Epilepsy genetics--past, present, and future. Curr. Opin. Genet. Dev. 21, 325–332.

Polgár, E., Hughes, D.I., Arham, A.Z., Todd, A.J., 2005. Loss of neurons from laminas I-III of the spinal dorsal horn is not required for development of tactile allodynia in the spared nerve injury model of neuropathic pain. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 25, 6658–6666.

Polgár, E., Todd, A.J., 2008. Tactile allodynia can occur in the spared nerve injury model in the rat without selective loss of GABA or GABA(A) receptors from synapses in laminae I-II of the ipsilateral spinal dorsal horn. Neuroscience 156, 193–202.

Polli, R.S., Malheiros, J.M., Dos Santos, R., Hamani, C., Longo, B.M., Tannús, A., Mello, L.E., Covolan, L., 2014. Changes in Hippocampal Volume are Correlated with Cell Loss but Not with Seizure Frequency in Two Chronic Models of Temporal Lobe Epilepsy. Front. Neurol. 5, 111.

Ponce-Coria, J., San-Cristobal, P., Kahle, K.T., Vazquez, N., Pacheco-Alvarez, D., de los Heros, P., Juárez, P., Muñoz, E., Michel, G., Bobadilla, N.A., Gimenez, I., Lifton, R.P., Hebert, S.C., Gamba, G., 2008. Regulation of NKCC2 by a chloride-sensing mechanism involving the WNK3 and SPAK kinases. Proc. Natl. Acad. Sci. 105, 8458–8463.

Poncer, J.-C., McKinney, R.A., Gähwiler, B.H., Thompson, S.M., 1997. Either N- or P-type Calcium Channels Mediate GABA Release at Distinct Hippocampal Inhibitory Synapses. Neuron 18, 463–472.

Pospelov, A.S., Puskarjov, M., Kaila, K., Voipio, J., 2020. Endogenous brain-sparing responses in brain pH and PO2 in a rodent model of birth asphyxia. Acta Physiol. 229, e13467.

Pracucci, E., Graham, R., Alberio, L., Nardi, G., Cozzolino, O., Pillai, V., Saieva, L., Walsh, D., Landi, S., Zhang, J., Trevelyan, A.J., Ratto, G.-M., 2021. Circadian rhythm in cortical chloride homeostasis underpins variation in network excitability.

Pressey, J.C., Mahadevan, V., Khademullah, C.S., Dargaei, Z., Chevrier, J., Ye, W., Huang, M., Chauhan, A.K., Meas, S.J., Uvarov, P., Airaksinen, M.S., Woodin, M.A., 2017. A kainate receptor subunit promotes the recycling of the neuron-specific K+-Cl- co-transporter KCC2 in hippocampal neurons. J. Biol. Chem. 292, 6190–6201.

Pressler, R.M., Boylan, G.B., Marlow, N., Blennow, M., Chiron, C., Cross, J.H., de Vries, L.S., Hallberg, B., Hellström-Westas, L., Jullien, V., Livingstone, V., Mangum, B., Murphy, B., Murray, D., Pons, G., Rennie, J., Swarte, R., Toet, M.C., Vanhatalo, S., Zohar, S., NEonatal seizure treatment with Medication Off-patent (NEMO) consortium, 2015. Bumetanide for the treatment of seizures in newborn babies with hypoxic ischaemic encephalopathy (NEMO): an open-label, dose finding, and feasibility phase 1/2 trial. Lancet Neurol. 14, 469–477.

Pressler, R.M., Cilio, M.R., Mizrahi, E.M., Moshé, S.L., Nunes, M.L., Plouin, P., Vanhatalo, S., Yozawitz, E., de Vries, L.S., Puthenveettil Vinayan, K., Triki, C.C., Wilmshurst, J.M., Yamamoto, H., Zuberi, S.M., 2021. The ILAE classification of seizures and the epilepsies: Modification for seizures in the neonate. Position paper by the ILAE Task Force on Neonatal Seizures. Epilepsia 62, 615–628.

Price, G.D., Trussell, L.O., 2006. Estimate of the Chloride Concentration in a Central Glutamatergic Terminal: A Gramicidin Perforated-Patch Study on the Calyx of Held. J. Neurosci. 26, 11432–11436.

Pugh, J.R., Jahr, C.E., 2013. Activation of Axonal Receptors by GABA Spillover Increases Somatic Firing. J. Neurosci. 33, 16924–16929.

Pugh, J.R., Jahr, C.E., 2011. Axonal GABAA Receptors Increase Cerebellar Granule Cell Excitability and Synaptic Activity. J. Neurosci. 31, 565–574.

Puhahn-Schmeiser, B., Leicht, K., Gessler, F., Freiman, T.M., 2021. Aberrant hippocampal mossy fibers in temporal lobe epilepsy target excitatory and inhibitory neurons. Epilepsia 62, 2539–2550.

Puskarjov, M., Ahmad, F., Kaila, K., Blaesse, P., 2012. Activity-dependent cleavage of the K-Cl cotransporter KCC2 mediated by calcium-activated protease calpain. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 32, 11356–11364.

Puskarjov, M., Ahmad, F., Khirug, S., Sivakumaran, S., Kaila, K., Blaesse, P., 2015. BDNF is required for seizure-induced but not developmental up-regulation of KCC2 in the neonatal hippocampus. Neuropharmacology, GABAergic Signaling in Health and Disease 88, 103–109.

Puskarjov, M., Kahle, K.T., Ruusuvuori, E., Kaila, K., 2014a. Pharmacotherapeutic targeting of cation-chloride cotransporters in neonatal seizures. Epilepsia 55, 806–818.

Puskarjov, M., Seja, P., Heron, S.E., Williams, T.C., Ahmad, F., Iona, X., Oliver, K.L., Grinton, B.E., Vutskits, L., Scheffer, I.E., Petrou, S., Blaesse, P., Dibbens, L.M., Berkovic, S.F., Kaila, K., 2014b. A variant of KCC2 from patients with febrile seizures impairs neuronal Cl- extrusion and dendritic spine formation. EMBO Rep. 15, 723–729.

Qi, B.-L., Liu, P., Wang, Q.-Y., Cai, W.-J., Yuan, B.-F., Feng, Y.-Q., 2014. Derivatization for liquid chromatography-mass spectrometry. TrAC Trends Anal. Chem. 59, 121–132.

Quigg, M., 2000. Circadian rhythms: interactions with seizures and epilepsy. Epilepsy Res. 42, 43–55.

Rahmanzadeh, R., Eftekhari, S., Shahbazi, A., Khodaei Ardakani, M.-R., Rahmanzade, R., Mehrabi, S., Barati, M., Joghataei, M.T., 2017a. Effect of bumetanide, a selective NKCC1 inhibitor, on hallucinations of schizophrenic patients; a double-blind randomized clinical trial. Schizophr. Res. 184, 145–146.

Rahmanzadeh, R., Shahbazi, A., Ardakani, M.-R.K., Mehrabi, S., Rahmanzade, R., Joghataei, M.T., 2017b. Lack of the effect of bumetanide, a selective NKCC1 inhibitor, in patients with schizophrenia: A double-blind randomized trial. Psychiatry Clin. Neurosci. 71, 72–73.

Raimondo, J.V., Richards, B.A., Woodin, M.A., 2017. Neuronal chloride and excitability — the big impact of small changes. Curr. Opin. Neurobiol., Neurobiology of Learning and Plasticity 43, 35–42.

Raju Sagiraju, H.K., Wang, C.-P., Amuan, M.E., Van Cott, A.C., Altalib, H.H., Pugh, M.J.V., 2018. Antiepileptic drugs and suicide-related behavior. Neurol. Clin. Pract. 8, 331–339.

Raley-Susman, K.M., Sapolsky, R.M., Kopito, R.R., 1993. Cl−/HCO3− exchange function differs in adult and fetal rat hippocampal neurons. Brain Res. 614, 308–314.

Ramgopal, S., Thome-Souza, S., Jackson, M., Kadish, N.E., Sánchez Fernández, I., Klehm, J., Bosl, W., Reinsberger, C., Schachter, S., Loddenkemper, T., 2014. Seizure detection, seizure prediction, and closed-loop warning systems in epilepsy. Epilepsy Behav. EB 37, 291–307.

Reid, K.H., Li, G.-Y., Payne, R.S., Schurr, A., Cooper, N.G.F., 2001. The mRNA level of the potassium-chloride cotransporter KCC2 covaries with seizure susceptibility in inferior colliculus of the post-ischemic audiogenic seizure-prone rat. Neurosci. Lett. 308, 29–32.

Reid, M.S., Kern, D.M., Brohawn, S.G., 2020. Cryo-EM structure of the potassium-chloride cotransporter KCC4 in lipid nanodiscs. eLife 9, e52505.

Represa, A., Jorquera, I., le gal la Salle, G., Ben-Ari, Y., 1993. Epilepsy induced collateral sprouting of hippocampal mossy fibers: Does it induce the development of ectopic synapses with granule cell dendrites? Hippocampus 3, 257–268.

Reschke, C.R., Silva, L.F.A., Norwood, B.A., Senthilkumar, K., Morris, G., Sanz-Rodriguez, A., Conroy, R.M., Costard, L., Neubert, V., Bauer, S., Farrell, M.A., O'Brien, D.F., Delanty, N., Schorge, S., Pasterkamp, R.J., Rosenow, F., Henshall, D.C., 2017. Potent Anti-seizure Effects of Locked Nucleic Acid Antagomirs Targeting miR-134 in Multiple Mouse and Rat Models of Epilepsy. Mol. Ther. Nucleic Acids 6, 45–56.

Rho, J.M., Donevan, S.D., Rogawski, M.A., 1996. Direct activation of GABAA receptors by barbiturates in cultured rat hippocampal neurons. J. Physiol. 497 (Pt 2), 509–522.

Ribak, C.E., Shapiro, L.A., Yan, X.-X., Dashtipour, K., Nadler, J.V., Obenaus, A., Spigelman, I., Buckmaster, P.S., 2012. Seizure-induced formation of basal dendrites on granule cells of the rodent dentate gyrus, in: Noebels, J.L., Avoli, M., Rogawski, M.A., Olsen, R.W., Delgado-Escueta, A.V. (Eds.), Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies. National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD).

Richardson, C., Alessi, D.R., 2008. The regulation of salt transport and blood pressure by the WNK-SPAK/OSR1 signalling pathway. J. Cell Sci. 121, 3293–3304.

Richardson, C., Rafiqi, F.H., Karlsson, H.K.R., Moleleki, N., Vandewalle, A., Campbell, D.G., Morrice, N.A., Alessi, D.R., 2008. Activation of the thiazide-sensitive Na+-Cl– cotransporter by the WNK-regulated kinases SPAK and OSR1. J. Cell Sci. 121, 675–684.

Richens, A., 1991. Pharmacology and Clinical Pharmacology of Vigabatrin. J. Child Neurol. 6, 2S7-2S10.

Rinehart, J., Maksimova, Y.D., Tanis, J.E., Stone, K.L., Hodson, C.A., Zhang, J., Risinger, M., Pan, W., Wu, D., Colangelo, C.M., Forbush, B., Joiner, C.H., Gulcicek, E.E., Gallagher, P.G., Lifton, R.P., 2009. Sites of Regulated Phosphorylation that Control K-Cl Cotransporter Activity. Cell 138, 525–536.

Rinehart, J., Vázquez, N., Kahle, K.T., Hodson, C.A., Ring, A.M., Gulcicek, E.E., Louvi, A., Bobadilla, N.A., Gamba, G., Lifton, R.P., 2011. WNK2 Kinase Is a Novel Regulator of Essential Neuronal Cation-Chloride Cotransporters. J. Biol. Chem. 286, 30171–30180.

Ringel, F., Plesnila, N., 2008. Expression and functional role of potassium-chloride cotransporters (KCC) in astrocytes and C6 glioma cells. Neurosci. Lett. 442, 219–223.

Rinke, I., Artmann, J., Stein, V., 2010. ClC-2 Voltage-Gated Channels Constitute Part of the Background Conductance and Assist Chloride Extrusion. J. Neurosci. 30, 4776–4786.

Rivera, C., Li, H., Thomas-Crusells, J., Lahtinen, H., Viitanen, T., Nanobashvili, A., Kokaia, Z., Airaksinen, M.S., Voipio, J., Kaila, K., Saarma, M., 2002a. BDNF-induced TrkB activation down-regulates the K+–Cl− cotransporter KCC2 and impairs neuronal Cl− extrusion. J. Cell Biol. 159, 747–752.

Rivera, C., Li, H., Thomas-Crusells, J., Lahtinen, H., Viitanen, T., Nanobashvili, A., Kokaia, Z., Airaksinen, M.S., Voipio, J., Kaila, K., Saarma, M., 2002b. BDNF-induced TrkB activation down-regulates the K+–Cl− cotransporter KCC2 and impairs neuronal Cl− extrusion. J. Cell Biol. 159, 747–752.

Rivera, C., Voipio, J., Kaila, K., 2005. Two developmental switches in GABAergic signalling: the K+–Cl− cotransporter KCC2 and carbonic anhydrase CAVII. J. Physiol. 562, 27–36.

Rivera, C., Voipio, J., Payne, J.A., Ruusuvuori, E., Lahtinen, H., Lamsa, K., Pirvola, U., Saarma, M., Kaila, K., 1999. The K+/Cl− co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. Nature 397, 251–255.

Rivera, C., Voipio, J., Thomas-Crusells, J., Li, H., Emri, Z., Sipilä, S., Payne, J.A., Minichiello, L., Saarma, M., Kaila, K., 2004a. Mechanism of Activity-Dependent Downregulation of the Neuron-Specific K-Cl Cotransporter KCC2. J. Neurosci. 24, 4683–4691.

Rivera, C., Voipio, J., Thomas-Crusells, J., Li, H., Emri, Z., Sipilä, S., Payne, J.A., Minichiello, L., Saarma, M., Kaila, K., 2004b. Mechanism of Activity-Dependent Downregulation of the Neuron-Specific K-Cl Cotransporter KCC2. J. Neurosci. 24, 4683–4691.

Rivera, C., Voipio, J., Thomas-Crusells, J., Li, H., Emri, Z., Sipilä, S., Payne, J.A., Minichiello, L., Saarma, M., Kaila, K., 2004c. Mechanism of Activity-Dependent Downregulation of the Neuron-Specific K-Cl Cotransporter KCC2. J. Neurosci. 24, 4683–4691.

Rizzo, V., Quartarone, A., Bagnato, S., Battaglia, F., Majorana, G., Girlanda, P., 2001. Modification of cortical excitability induced by gabapentin: a study by transcranial magnetic stimulation. Neurol. Sci. 22, 229–232.

Robel, S., Buckingham, S.C., Boni, J.L., Campbell, S.L., Danbolt, N.C., Riedemann, T., Sutor, B., Sontheimer, H., 2015. Reactive astrogliosis causes the development of spontaneous seizures. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 35, 3330–3345.

Rodan, A.R., Jenny, A., 2017. WNK kinases in development and disease. Curr. Top. Dev. Biol. 123, 1–47.

Roehri, N., Pizzo, F., Lagarde, S., Lambert, I., Nica, A., McGonigal, A., Giusiano, B., Bartolomei, F., Bénar, C.-G., 2018. High-frequency oscillations are not better biomarkers of epileptogenic tissues than spikes. Ann. Neurol. 83, 84–97.

Rogawski, M.A., Löscher, W., 2004. The neurobiology of antiepileptic drugs. Nat. Rev. Neurosci. 5, 553–564.

Rohrbough, J., Spitzer, N.C., 1996. Regulation of intracellular Cl- levels by Na(+)-dependent Cl- cotransport distinguishes depolarizing from hyperpolarizing GABAA receptor-mediated responses in spinal neurons. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 16, 82–91.

Römermann, K., Fedrowitz, M., Hampel, P., Kaczmarek, E., Töllner, K., Erker, T., Sweet, D.H., Löscher, W., 2017a. Multiple blood-brain barrier transport mechanisms limit bumetanide accumulation, and therapeutic potential, in the mammalian brain. Neuropharmacology 117, 182–194.

Römermann, K., Fedrowitz, M., Hampel, P., Kaczmarek, E., Töllner, K., Erker, T., Sweet, D.H., Löscher, W., 2017b. Multiple blood-brain barrier transport mechanisms limit bumetanide accumulation, and therapeutic potential, in the mammalian brain. Neuropharmacology 117, 182–194.

Romero, M.F., Chen, A.-P., Parker, M.D., Boron, W.F., 2013. The SLC4 Family of Bicarbonate (HCO3−) Transporters. Mol. Aspects Med. 34, 159–182.

Rong, P., Liu, A., Zhang, J., Wang, Y., Yang, A., Li, Liang, Ben, H., Li, Liping, Liu, R., He, W., Liu, H., Huang, F., Li, X., Wu, P., Zhu, B., 2014. An alternative therapy for drug-resistant epilepsy: transcutaneous auricular vagus nerve stimulation. Chin. Med. J. (Engl.) 127, 300–304.

Roussa, E., Speer, J.M., Chudotvorova, I., Khakipoor, S., Smirnov, S., Rivera, C., Krieglstein, K., 2016a. The membrane trafficking and functionality of the K+-Cl− co-transporter KCC2 is regulated by TGF-β2. J. Cell Sci. 129, 3485–3498.

Roussa, E., Speer, J.M., Chudotvorova, I., Khakipoor, S., Smirnov, S., Rivera, C., Krieglstein, K., 2016b. The membrane trafficking and functionality of the K+-Cl− co-transporter KCC2 is regulated by TGF-β2. J. Cell Sci. 129, 3485–3498.

Rowley, S., Patel, M., 2013. Mitochondrial involvement and oxidative stress in temporal lobe epilepsy. Free Radic. Biol. Med. 62, 121–131.

Ruigómez, A., Rodríguez, L.A.G., Dev, V.J., Arellano, F., Raniwala, J., 2000. Are Schizophrenia or Antipsychotic Drugs a Risk Factor for Cataracts? Epidemiology 11, 620–623.

Ruiz, A., Campanac, E., Scott, R.S., Rusakov, D.A., Kullmann, D.M., 2010. Presynaptic GABAA receptors enhance transmission and LTP induction at hippocampal mossy fiber synapses. Nat. Neurosci. 13, 431–438.

Russell, J.M., 2000a. Sodium-Potassium-Chloride Cotransport. Physiol. Rev. 80, 211–276.

Russell, J.M., 2000b. Sodium-Potassium-Chloride Cotransport. Physiol. Rev. 80, 211–276.

Russmann, V., Goc, J., Boes, K., Ongerth, T., Salvamoser, J.D., Siegl, C., Potschka, H., 2016. Minocycline fails to exert antiepileptogenic effects in a rat status epilepticus model. Eur. J. Pharmacol. 771, 29–39.

Russo, E., Citraro, R., Scicchitano, F., De Fazio, S., Perrota, I., Di Paola, E.D., Constanti, A., De Sarro, G., 2011. Effects of early long-term treatment with antiepileptic drugs on development of seizures and depressive-like behavior in a rat genetic absence epilepsy model. Epilepsia 52, 1341–1350.

Rust, M.B., Alper, S.L., Rudhard, Y., Shmukler, B.E., Vicente, R., Brugnara, C., Trudel, M., Jentsch, T.J., Hübner, C.A., 2007. Disruption of erythroid K-Cl cotransporters alters erythrocyte volume and partially rescues erythrocyte dehydration in SAD mice. J. Clin. Invest. 117, 1708–1717.

Ryvlin, P., So, E.L., Gordon, C.M., Hesdorffer, D.C., Sperling, M.R., Devinsky, O., Bunker, M.T., Olin, B., Friedman, D., 2018. Long-term surveillance of SUDEP in drug-resistant epilepsy patients treated with VNS therapy. Epilepsia 59, 562–572.

Saadi, R.A., He, K., Hartnett, K.A., Kandler, K., Hershfinkel, M., Aizenman, E., 2012. SNARE-dependent upregulation of potassium chloride co-transporter 2 activity after metabotropic zinc receptor activation in rat cortical neurons in vitro. Neuroscience 210, 38–46.

Saito, T., Ishii, A., Sugai, K., Sasaki, M., Hirose, S., 2017. A de novo missense mutation in SLC12A5 found in a compound heterozygote patient with epilepsy of infancy with migrating focal seizures. Clin. Genet. 92, 654–658.

Saitsu, H., Watanabe, M., Akita, T., Ohba, C., Sugai, K., Ong, W.P., Shiraishi, H., Yuasa, S., Matsumoto, H., Beng, K.T., Saitoh, S., Miyatake, S., Nakashima, M., Miyake, N., Kato, M., Fukuda, A., Matsumoto, N., 2016. Impaired neuronal KCC2 function by biallelic SLC12A5 mutations in migrating focal seizures and severe developmental delay. Sci. Rep. 6, 30072.

Sala, M., Braida, D., Lentini, D., Busnelli, M., Bulgheroni, E., Capurro, V., Finardi, A., Donzelli, A., Pattini, L., Rubino, T., Parolaro, D., Nishimori, K., Parenti, M., Chini, B., 2011. Pharmacologic rescue of impaired cognitive flexibility, social deficits, increased aggression, and seizure susceptibility in oxytocin receptor null mice: a neurobehavioral model of autism. Biol. Psychiatry 69, 875–882.

Salami, P., Lévesque, M., Benini, R., Behr, C., Gotman, J., Avoli, M., 2014. Dynamics of interictal spikes and high-frequency oscillations during epileptogenesis in temporal lobe epilepsy. Neurobiol. Dis. 67, 97–106.

Sancar, F., Czajkowski, C., 2011. Allosteric modulators induce distinct movements at the GABA-binding site interface of the GABA-A receptor. Neuropharmacology 60, 520–528.

Sànchez, J., Centanaro, M., Solís, J., Delgado, F., Yépez, L., 2014a. Factors predicting the outcome following medical treatment of mesial temporal epilepsy with hippocampal sclerosis. Seizure - Eur. J. Epilepsy 23, 448–453.

Sànchez, J., Centanaro, M., Solís, J., Delgado, F., Yépez, L., 2014b. Factors predicting the outcome following medical treatment of mesial temporal epilepsy with hippocampal sclerosis. Seizure 23, 448–453.

Sandoval, K.E., Witt, K.A., 2008. Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. Neurobiol. Dis. 32, 200–219.

Sansa, G., Carlson, C., Doyle, W., Weiner, H.L., Bluvstein, J., Barr, W., Devinsky, O., 2011. Medically refractory epilepsy in autism. Epilepsia 52, 1071–1075.

Sato, S., Huang, X.-P., Kroeze, W.K., Roth, B.L., 2016. Discovery and Characterization of Novel GPR39 Agonists Allosterically Modulated by Zinc. Mol. Pharmacol. 90, 726–737.

Satoh, O., Omote, K., 1996. Roles of monoaminergic, glycinergic and GABAergic inhibitory systems in the spinal cord in rats with peripheral mononeuropathy. Brain Res. 728, 27–36.

Sauer, J.-F., Bartos, M., 2010. Recruitment of early postnatal parvalbumin-positive hippocampal interneurons by GABAergic excitation. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 30, 110–115.

Savardi, A., Borgogno, M., Narducci, R., La Sala, G., Ortega, J.A., Summa, M., Armirotti, A., Bertorelli, R., Contestabile, A., De Vivo, M., Cancedda, L., 2020. Discovery of a Small Molecule Drug Candidate for Selective NKCC1 Inhibition in Brain Disorders. Chem 6, 2073–2096.

Scaramuzza, L., 2021. The enhancement of activity rescues the establishment of Mecp2 null neuronal phenotypes. EMBO Mol. Med. 13, e12433.

Scharfman, H.E., 1995. Electrophysiological evidence that dentate hilar mossy cells are excitatory and innervate both granule cells and interneurons. J. Neurophysiol. 74, 179–194.

Scharfman, H.E., Brooks-Kayal, A.R., 2014. Is plasticity of GABAergic mechanisms relevant to epileptogenesis? Adv. Exp. Med. Biol. 813, 133–150.

Scharfman, H.E., Goodman, J.H., Sollas, A.L., 2000. Granule-Like Neurons at the Hilar/CA3 Border after Status Epilepticus and Their Synchrony with Area CA3 Pyramidal Cells: Functional Implications of Seizure-Induced Neurogenesis. J. Neurosci. 20, 6144–6158.

Schauwecker, P.E., 2012. Strain differences in seizure-induced cell death following pilocarpine-induced status epilepticus. Neurobiol. Dis. 45, 297–304.

Schauwecker, P.E., Steward, O., 1997. Genetic determinants of susceptibility to excitotoxic cell death: implications for gene targeting approaches. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94, 4103–4108.

Scheffer, I.E., Berkovic, S., Capovilla, G., Connolly, M.B., French, J., Guilhoto, L., Hirsch, E., Jain, S., Mathern, G.W., Moshé, S.L., Nordli, D.R., Perucca, E., Tomson, T., Wiebe, S., Zhang, Y.-H., Zuberi, S.M., 2017. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. Epilepsia 58, 512–521.

Schiltz, N.K., Kaiboriboon, K., Koroukian, S.M., Singer, M.E., Love, T.E., 2016. Long-term reduction of health care costs and utilization after epilepsy surgery. Epilepsia 57, 316–324.

Schmeiser, B., Li, J., Brandt, A., Zentner, J., Doostkam, S., Freiman, T.M., 2017a. Different mossy fiber sprouting patterns in ILAE hippocampal sclerosis types. Epilepsy Res. 136, 115–122.

Schmeiser, B., Zentner, J., Prinz, M., Brandt, A., Freiman, T.M., 2017b. Extent of mossy fiber sprouting in patients with mesiotemporal lobe epilepsy correlates with neuronal cell loss and granule cell dispersion. Epilepsy Res. 129, 51–58.

Schmidt, M.S., Brenner, C., 2019. Absence of evidence that Slc12a8 encodes a nicotinamide mononucleotide transporter. Nat. Metab. 1, 660–661.

Scholz, J., Broom, D.C., Youn, D.-H., Mills, C.D., Kohno, T., Suter, M.R., Moore, K.A., Decosterd, I., Coggeshall, R.E., Woolf, C.J., 2005. Blocking caspase activity prevents transsynaptic neuronal apoptosis and the loss of inhibition in lamina II of the dorsal horn after peripheral nerve injury. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 25, 7317–7323.

Schreiner, A., Pohlmann-Eden, B., 2003. Value of the Early Electroencephalogram after a First Unprovoked Seizure. Clin. Electroencephalogr. 34, 140–144.

Schwale, C., Schumacher, S., Bruehl, C., Titz, S., Schlicksupp, A., Kokocinska, M., Kirsch, J., Draguhn, A., Kuhse, J., 2016. KCC2 knockdown impairs glycinergic synapse maturation in cultured spinal cord neurons. Histochem. Cell Biol. 145, 637–646.

Schwaller, B., 2009. The continuing disappearance of "pure" Ca2+ buffers. Cell. Mol. Life Sci. CMLS 66, 275–300.

Schwarz, N., Hedrich, U.B.S., Schwarz, H., P. A., H., Dammeier, N., Auffenberg, E., Bedogni, F., Honegger, J.B., Lerche, H., Wuttke, T.V., Koch, H., 2017. Human Cerebrospinal fluid promotes long-term neuronal viability and network function in human neocortical organotypic brain slice cultures. Sci. Rep. 7, 12249.

Scott, E.R.D., Krot, A.N., 2003. Chondrites and their Components. Treatise Geochem. 1, 711.

Scott, R.C., 2014. What are the effects of prolonged seizures in the brain? Epileptic Disord. Int. Epilepsy J. Videotape 16 Spec No 1, S6-11.

Sedmak, G., Jovanov-Milošević, N., Puskarjov, M., Ulamec, M., Krušlin, B., Kaila, K., Judaš, M., 2016. Developmental Expression Patterns of KCC2 and Functionally Associated Molecules in the Human Brain. Cereb. Cortex N. Y. N 1991 26, 4574–4589.

Seja, P., Schonewille, M., Spitzmaul, G., Badura, A., Klein, I., Rudhard, Y., Wisden, W., Hübner, C.A., De Zeeuw, C.I., Jentsch, T.J., 2012. Raising cytosolic Cl− in cerebellar granule cells affects their excitability and vestibulo-ocular learning. EMBO J. 31, 1217–1230.

Sémiologie des crises épileptiques [WWW Document], 2016. . Collège Enseign. Neurol. URL https://www.cen-neurologie.fr/fr/premier-cycle/s%C3%A9miologie-analytique/syndrome-myog%C3%A8ne-myopathique/syndrome-myog%C3%A8ne-myopathique-16 (accessed 6.21.22).

Serdaroglu, A., Arhan, E., Kurt, G., Erdem, A., Hirfanoglu, T., Aydin, K., Bilir, E., 2016. Long term effect of vagus nerve stimulation in pediatric intractable epilepsy: an extended follow-up. Childs Nerv. Syst. 32, 641–646.

Serranilla, M., Woodin, M.A., 2021. Striatal Chloride Dysregulation and Impaired GABAergic Signaling Due to Cation-Chloride Cotransporter Dysfunction in Huntington's Disease. Front. Cell. Neurosci. 15, 817013.

Sessolo, M., Marcon, I., Bovetti, S., Losi, G., Cammarota, M., Ratto, G.M., Fellin, T., Carmignoto, G., 2015. Parvalbumin-Positive Inhibitory Interneurons Oppose Propagation But Favor Generation of Focal Epileptiform Activity. J. Neurosci. 35, 9544–9557.

Sharma, A.K., Reams, R.Y., Jordan, W.H., Miller, M.A., Thacker, H.L., Snyder, P.W., 2007. Mesial temporal lobe epilepsy: pathogenesis, induced rodent models and lesions. Toxicol. Pathol. 35, 984–999.

Shaw, E.B., Dermott, R.V., Lee, R., Burbridge, T.N., 1959. Phenothiazine tranquilizers as a cause of severe seizures. Pediatrics 23, 485–492.

Shekarabi, M., Moldrich, R.X., Rasheed, S., Salin-Cantegrel, A., Laganière, J., Rochefort, D., Hince, P., Huot, K., Gaudet, R., Kurniawan, N., Sotocinal, S.G., Ritchie, J., Dion, P.A., Mogil, J.S., Richards, L.J., Rouleau, G.A., 2012. Loss of Neuronal Potassium/Chloride Cotransporter 3 (KCC3) Is Responsible for the Degenerative Phenotype in a

Conditional Mouse Model of Hereditary Motor and Sensory Neuropathy Associated with Agenesis of the Corpus Callosum. J. Neurosci. 32, 3865–3876.

Shekarabi, M., Salin-Cantegrel, A., Laganière, J., Gaudet, R., Dion, P., Rouleau, G.A., 2011. Cellular expression of the K+–Cl− cotransporter KCC3 in the central nervous system of mouse. Brain Res. 1374, 15–26.

Shekarabi, M., Zhang, J., Khanna, A.R., Ellison, D.H., Delpire, E., Kahle, K.T., 2017. WNK Kinase Signaling in Ion Homeostasis and Human Disease. Cell Metab. 25, 285–299.

Shen, M.-R., Chou, C.-Y., Hsu, K.-F., Hsu, Y.-M., Chiu, W.-T., Tang, M.-J., Alper, S.L., Ellory, J.C., 2003. KCl Cotransport Is an Important Modulator of Human Cervical Cancer Growth and Invasion*. J. Biol. Chem. 278, 39941–39950.

Shen, Q., Wu, X., Zhang, Z., Zhang, D., Yang, S., Xing, D., 2022a. Gamma frequency light flicker regulates amyloid precursor protein trafficking for reducing β-amyloid load in Alzheimer's disease model. Aging Cell 21, e13573.

Shen, Q., Wu, X., Zhang, Z., Zhang, D., Yang, S., Xing, D., 2022b. Gamma frequency light flicker regulates amyloid precursor protein trafficking for reducing β-amyloid load in Alzheimer's disease model. Aging Cell 21, e13573.

Sheridan, D.C., Laurie, A., Pacheco, S., Fu, R., Hansen, M.L., Ma, O.J., Meckler, G.D., 2018. Relative Effectiveness of Dopamine Antagonists for Pediatric Migraine in the Emergency Department. Pediatr. Emerg. Care 34, 165–168.

Shi, Y., Zhang, L., Pu, H., Mao, L., Hu, X., Jiang, X., Xu, N., Stetler, R.A., Zhang, F., Liu, X., Leak, R.K., Keep, R.F., Ji, X., Chen, J., 2016. Rapid endothelial cytoskeletal reorganization enables early blood-brain barrier disruption and long-term ischaemic reperfusion brain injury. Nat. Commun. 7, 10523.

Shimizu, Y., Koyama, R., Kawamoto, T., 2017. Rho kinase-dependent desensitization of GPR39; a unique mechanism of GPCR downregulation. Biochem. Pharmacol. 140, 105–114.

Shin, D.S.-H., Yu, W., Fawcett, A., Carlen, P.L., 2010. Characterizing the persistent CA3 interneuronal spiking activity in elevated extracellular potassium in the young rat hippocampus. Brain Res. 1331, 39–50.

Shiri, Z., Manseau, F., Lévesque, M., Williams, S., Avoli, M., 2015. Interneuron activity leads to initiation of low-voltage fast-onset seizures. Ann. Neurol. 77, 541–546.

Shulga, A., Thomas-Crusells, J., Sigl, T., Blaesse, A., Mestres, P., Meyer, M., Yan, Q., Kaila, K., Saarma, M., Rivera, C., Giehl, K.M., 2008. Posttraumatic GABA(A)-mediated [Ca2+]i increase is essential for the induction of brain-derived neurotrophic factor-dependent survival of mature central neurons. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 28, 6996–7005.

Sillanpää, M., Schmidt, D., 2009. Early seizure frequency and aetiology predict long-term medical outcome in childhood-onset epilepsy. Brain J. Neurol. 132, 989–998.

Silva, G., Verhoog, M., Goriounova, N., Loebel, A., Hjorth, J., Baayen, J., De Kock, C., Mansvelder, H., 2010. Human Synapses Show a Wide Temporal Window for Spike-Timing-Dependent Plasticity. Front. Synaptic Neurosci. 2.

Silvestre, J.S., Prous, J., 2005. Research on adverse drug events. I. Muscarinic M3 receptor binding affinity could predict the risk of antipsychotics to induce type 2 diabetes. Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol. 27, 289–304.

Simard, C.F., Bergeron, M.J., Frenette-Cotton, R., Carpentier, G.A., Pelchat, M.-E., Caron, L., Isenring, P., 2007a. Homooligomeric and Heterooligomeric Associations between K+-Cl– Cotransporter Isoforms and between K+-Cl– and Na+-K+-Cl– Cotransporters*. J. Biol. Chem. 282, 18083–18093.

Simard, C.F., Bergeron, M.J., Frenette-Cotton, R., Carpentier, G.A., Pelchat, M.-E., Caron, L., Isenring, P., 2007b. Homooligomeric and Heterooligomeric Associations between K+-Cl– Cotransporter Isoforms and between K+-Cl– and Na+-K+-Cl– Cotransporters *. J. Biol. Chem. 282, 18083–18093.

Simard, C.F., Brunet, G.M., Daigle, N.D., Montminy, V., Caron, L., Isenring, P., 2004. Self-interacting domains in the C terminus of a cation-Cl- cotransporter described for the first time. J. Biol. Chem. 279, 40769–40777.

Simonnet, C., Sinha, M., Goutierre, M., Moutkine, I., Daumas, S., Poncer, J.C., 2022. Silencing KCC2 in mouse dorsal hippocampus compromises spatial and contextual memory.

Sivakumaran, S., Cardarelli, R.A., Maguire, J., Kelley, M.R., Silayeva, L., Morrow, D.H., Mukherjee, J., Moore, Y.E., Mather, R.J., Duggan, M.E., Brandon, N.J., Dunlop, J., Zicha, S., Moss, S.J., Deeb, T.Z., 2015. Selective inhibition

of KCC2 leads to hyperexcitability and epileptiform discharges in hippocampal slices and in vivo. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 35, 8291–8296.

Sivakumaran, S., Maguire, J., 2016. Bumetanide reduces seizure progression and the development of pharmacoresistant status epilepticus. Epilepsia 57, 222–232.

Sloviter, R.S., Damiano, B.P., 1981. On the relationship between kainic acid-induced epileptiform activity and hippocampal neuronal damage. Neuropharmacology 20, 1003–1011.

Sloviter, R.S., Zappone, C.A., Harvey, B.D., Frotscher, M., 2006. Kainic acid-induced recurrent mossy fiber innervation of dentate gyrus GABAergic interneurons. J. Comp. Neurol. 494, 944–960.

Smalley, J.L., Kontou, G., Choi, C., Ren, Q., Albrecht, D., Abiraman, K., Santos, M.A.R., Bope, C.E., Deeb, T.Z., Davies, P.A., Brandon, N.J., Moss, S.J., 2020. Isolation and Characterization of Multi-Protein Complexes Enriched in the K-Cl Co-transporter 2 From Brain Plasma Membranes. Front. Mol. Neurosci. 13, 563091.

Smit, E., Liu, X., Gill, H., Sabir, H., Jary, S., Thoresen, M., 2013. Factors associated with permanent hearing impairment in infants treated with therapeutic hypothermia. J. Pediatr. 163, 995–1000.

Snead, O.C., Hosey, L.C., 1985. Exacerbation of seizures in children by carbamazepine. N. Engl. J. Med. 313, 916–921.

Sóki, N., Richter, Z., Karádi, K., Lőrincz, K., Horváth, R., Gyimesi, C., Szekeres-Paraczky, C., Horváth, Z., Janszky, J., Dóczi, T., Seress, L., Ábrahám, H., 2022. Investigation of synapses in the cortical white matter in human temporal lobe epilepsy. Brain Res. 1779, 147787.

Somasekharan, S., Tanis, J., Forbush, B., 2012. Loop Diuretic and Ion-binding Residues Revealed by Scanning Mutagenesis of Transmembrane Helix 3 (TM3) of Na-K-Cl Cotransporter (NKCC1)*. J. Biol. Chem. 287, 17308–17317.

Song, B., Galande, A.K., Kodukula, K., Moos, W.H., Miller, S.M., 2011. Evaluation of the pKa values and ionization sequence of bumetanide using 1H and 13C NMR and UV spectroscopy. Drug Dev. Res. 72, 416–426.

Soukupová, M., Binaschi, A., Falcicchia, C., Zucchini, S., Roncon, P., Palma, E., Magri, E., Grandi, E., Simonato, M., 2014. Impairment of GABA release in the hippocampus at the time of the first spontaneous seizure in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. Exp. Neurol. 257, 39–49.

Soul, J.S., Bergin, A.M., Stopp, C., Hayes, B., Singh, A., Fortuno, C.R., O'Reilly, D., Krishnamoorthy, K., Jensen, F.E., Rofeberg, V., Dong, M., Vinks, A.A., Wypij, D., Staley, K.J., Group, for the B.B.T., 2021. A Pilot Randomized, Controlled, Double-Blind Trial of Bumetanide to Treat Neonatal Seizures. Ann. Neurol. 89, 327–340.

Speed, D., O'Brien, T.J., Palotie, A., Shkura, K., Marson, A.G., Balding, D.J., Johnson, M.R., 2014. Describing the genetic architecture of epilepsy through heritability analysis. Brain J. Neurol. 137, 2680–2689.

Spencer, D.C., Sun, F.T., Brown, S.N., Jobst, B.C., Fountain, N.B., Wong, V.S.S., Mirro, E.A., Quigg, M., 2016. Circadian and ultradian patterns of epileptiform discharges differ by seizure-onset location during long-term ambulatory intracranial monitoring. Epilepsia 57, 1495–1502.

Spencer, S.S., Kim, J., Spencer, D.D., 1992. Ictal spikes: a marker of specific hippocampal cell loss. Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. 83, 104–111.

Sperk, G., Lassmann, H., Baran, H., Kish, S.J., Seitelberger, F., Hornykiewicz, O., 1983. Kainic acid induced seizures: neurochemical and histopathological changes. Neuroscience 10, 1301–1315.

Spigelman, I., Yan, X.-X., Obenaus, A., Lee, E.Y.-S., Wasterlain, C.G., Ribak, C.E., 1998. Dentate granule cells form novel basal dendrites in a rat model of temporal lobe epilepsy. Neuroscience 86, 109–120.

Spratt, E.G., Nicholas, J.S., Brady, K.T., Carpenter, L.A., Hatcher, C.R., Meekins, K.A., Furlanetto, R.W., Charles, J.M., 2012. Enhanced Cortisol Response to Stress in Children in Autism. J. Autism Dev. Disord. 42, 75–81.

Sprengers, J.J., van Andel, D.M., Zuithoff, N.P.A., Keijzer-Veen, M.G., Schulp, A.J.A., Scheepers, F.E., Lilien, M.R., Oranje, B., Bruining, H., 2021. Bumetanide for Core Symptoms of Autism Spectrum Disorder (BAMBI): A Single Center, Double-Blinded, Participant-Randomized, Placebo-Controlled, Phase-2 Superiority Trial. J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry 60, 865–876.

Srivastava, A., Banerjee, J., Dubey, V., Tripathi, M., Chandra, P.S., Sharma, M.C., Lalwani, S., Siraj, F., Doddamani, R., Dixit, A.B., 2022. Role of Altered Expression, Activity and Sub-cellular Distribution of Various Histone Deacetylases (HDACs) in Mesial Temporal Lobe Epilepsy with Hippocampal Sclerosis. Cell. Mol. Neurobiol. 42, 1049–1064.

St Laurent, J., Cahn, C.H., Ban, T.A., 1962. Treatment of psychiatric patients with a phenothiazine derivative (prochlorperazine) with special reference to after care. Am. J. Psychiatry 118, 938–940.

St Louis, E.K., 2011. Sleep and Epilepsy: Strange Bedfellows No More. Minerva Pneumol. 50, 159–176.

Stafstrom, C.E., Carmant, L., 2015. Seizures and Epilepsy: An Overview for Neuroscientists. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 5, a022426.

Staley, K., Smith, R., Schaack, J., Wilcox, C., Jentsch, T.J., 1996. Alteration of GABAA Receptor Function Following Gene Transfer of the CLC-2 Chloride Channel. Neuron 17, 543–551.

Staley, K.J., 2022. Clarifications regarding bumetanide for neonatal seizures. Epilepsia n/a.

Staley, K.J., Dudek, F.E., 2006. Interictal spikes and epileptogenesis. Epilepsy Curr. 6, 199–202.

Stamboulian-Platel, S., Legendre, A., Chabrol, T., Platel, J.-C., Pernot, F., Duveau, V., Roucard, C., Baudry, M., Depaulis, A., 2016. Activation of GABAA receptors controls mesiotemporal lobe epilepsy despite changes in chloride transporters expression: In vivo and in silico approach. Exp. Neurol. 284, 11–28.

Starremans, P.G.J.F., Kersten, F.F.J., Heuvel, L.P.W.J. van den, Knoers, N.V.A.M., Bindels, R.J.M., 2003. Dimeric Architecture of the Human Bumetanide-Sensitive Na-K-Cl Co-transporter. J. Am. Soc. Nephrol. 14, 3039–3046.

Steffensen, A.B., Oernbo, E.K., Stoica, A., Gerkau, N.J., Barbuskaite, D., Tritsaris, K., Rose, C.R., MacAulay, N., 2018. Cotransporter-mediated water transport underlying cerebrospinal fluid formation. Nat. Commun. 9, 2167.

Steinhäuser, C., Grunnet, M., Carmignoto, G., 2016. Crucial role of astrocytes in temporal lobe epilepsy. Neuroscience, Dynamic and metabolic astrocyte-neuron interactions in healthy and diseased brain 323, 157–169.

Stell, B.M., 2011. Biphasic action of axonal GABA-A receptors on presynaptic calcium influx. J. Neurophysiol. 105, 2931–2936.

Stell, B.M., Rostaing, P., Triller, A., Marty, A., 2007. Activation of Presynaptic GABAA Receptors Induces Glutamate Release from Parallel Fiber Synapses. J. Neurosci. 27, 9022–9031.

Stödberg, T., McTague, A., Ruiz, A.J., Hirata, H., Zhen, J., Long, P., Farabella, I., Meyer, E., Kawahara, A., Vassallo, G., Stivaros, S.M., Bjursell, M.K., Stranneheim, H., Tigerschiöld, S., Persson, B., Bangash, I., Das, K., Hughes, D., Lesko, N., Lundeberg, J., Scott, R.C., Poduri, A., Scheffer, I.E., Smith, H., Gissen, P., Schorge, S., Reith, M.E.A., Topf, M., Kullmann, D.M., Harvey, R.J., Wedell, A., Kurian, M.A., 2015. Mutations in SLC12A5 in epilepsy of infancy with migrating focal seizures. Nat. Commun. 6, 8038.

Strain, S.M., Tasker, R.A., 1991. Hippocampal damage produced by systemic injections of domoic acid in mice. Neuroscience 44, 343–352.

Strange, K., Singer, T.D., Morrison, R., Delpire, E., 2000. Dependence of KCC2 K-Cl cotransporter activity on a conserved carboxy terminus tyrosine residue. Am. J. Physiol.-Cell Physiol. 279, C860–C867.

Stringham, J.S., 1807. On the Diuretic Effects of Mercury in a Case of Syphilis. Med. Phys. J. 18, 331–333.

Suárez, L.M., Cid, E., Gal, B., Inostroza, M., Brotons-Mas, J.R., Gómez-Domínguez, D., de la Prida, L.M., Solís, J.M., 2012. Systemic injection of kainic acid differently affects LTP magnitude depending on its epileptogenic efficiency. PloS One 7, e48128.

Sulis Sato, S., Artoni, P., Landi, S., Cozzolino, O., Parra, R., Pracucci, E., Trovato, F., Szczurkowska, J., Luin, S., Arosio, D., Beltram, F., Cancedda, L., Kaila, K., Ratto, G.M., 2017. Simultaneous two-photon imaging of intracellular chloride concentration and pH in mouse pyramidal neurons in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 114, E8770–E8779.

Sullivan, B.J., Kipnis, P.A., Carter, B.M., Shao, L.-R., Kadam, S.D., 2021. Targeting ischemia-induced KCC2 hypofunction rescues refractory neonatal seizures and mitigates epileptogenesis in a mouse model. Sci. Signal. 14, eabg2648.

Sullivan, C.R., Funk, A.J., Shan, D., Haroutunian, V., McCullumsmith, R.E., 2015. Decreased Chloride Channel Expression in the Dorsolateral Prefrontal Cortex in Schizophrenia. PLOS ONE 10, e0123158.

Sun, C., Zhang, L., Chen, G., 2013. An unexpected role of neuroligin-2 in regulating KCC2 and GABA functional switch. Mol. Brain 6, 23.

Sun, D., van Klink, N.E.C., Bongaarts, A., Zweiphenning, W.E.J.M., van 't Klooster, M.A., Gebbink, T.A., Snijders, T.J., van Eijsden, P., Robe, P.A.J.T., Aronica, E., Zijlmans, M., 2022. High frequency oscillations associate with neuroinflammation in low-grade epilepsy associated tumors. Clin. Neurophysiol. Off. J. Int. Fed. Clin. Neurophysiol. 133, 165–174.

Sun, Q., Tian, E., Turner, R.J., Ten Hagen, K.G., 2010. Developmental and functional studies of the SLC12 gene family members from Drosophila melanogaster. Am. J. Physiol. - Cell Physiol. 298, C26–C37.

Sundstrom, L.E., Mitchell, J., Wheal, H.V., 1993. Bilateral reorganisation of mossy fibres in the rat hippocampus after a unilateral intracerebroventricular kainic acid injection. Brain Res. 609, 321–326.

Sviridov, D., Mukhamedova, N., Miller, Y.I., 2020. Lipid rafts as a therapeutic target. J. Lipid Res. 61, 687–695.

Swan, G.E., 1999. The pharmacology of halogenated salicylanilides and their anthelmintic use in animals. J. S. Afr. Vet. Assoc. 70, 61–70.

Szabadics, J., Varga, C., Molnár, G., Oláh, S., Barzó, P., Tamás, G., 2006. Excitatory Effect of GABAergic Axo-Axonic Cells in Cortical Microcircuits. Science 311, 233–235.

Tabatabaei, S.A., Soleimani, M., Mansouri, M.R., Mirshahi, A., Inanlou, B., Abrishami, M., Pakrah, A.R., Masarat, H., 2016. Closantel; a veterinary drug with potential severe morbidity in humans. BMC Ophthalmol. 16, 207.

Takeda, A., Onodera, H., Sugimoto, A., Kogure, K., Obinata, M., Shibahara, S., 1993. Coordinated expression of messenger RNAs for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. Neuroscience 55, 23–31.

Tan, G., Li, X., Niu, R., Wang, H., Chen, D., Gong, Q., Liu, L., 2021. Functional connectivity of the thalamocortical circuit in patients with seizure relapse after antiseizure medication withdrawal. Epilepsia 62, 2463–2473.

Tang, D., Qian, A.-H., Song, D.-D., Ben, Q.-W., Yao, W.-Y., Sun, J., Li, W.-G., Xu, T.-L., Yuan, Y.-Z., 2015. Role of the potassium chloride cotransporter isoform 2-mediated spinal chloride homeostasis in a rat model of visceral hypersensitivity. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 308, G767-778.

Tang, W., Kang, J., Wu, X., Rampe, D., Wang, L., Shen, H., Li, Z., Dunnington, D., Garyantes, T., 2001. Development and evaluation of high throughput functional assay methods for HERG potassium channel. J. Biomol. Screen. 6, 325–331.

Tang, X., Drotar, J., Li, K., Clairmont, C.D., Brumm, A.S., Sullins, A.J., Wu, H., Liu, X.S., Wang, J., Gray, N.S., Sur, M., Jaenisch, R., 2019. Pharmacological enhancement of KCC2 gene expression exerts therapeutic effects on human Rett syndrome neurons and Mecp2 mutant mice. Sci. Transl. Med. 11, eaau0164.

Tang, X., Kim, J., Zhou, L., Wengert, E., Zhang, L., Wu, Z., Carromeu, C., Muotri, A.R., Marchetto, M.C.N., Gage, F.H., Chen, G., 2016a. KCC2 rescues functional deficits in human neurons derived from patients with Rett syndrome. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 113, 751–756.

Tang, X., Kim, J., Zhou, L., Wengert, E., Zhang, L., Wu, Z., Carromeu, C., Muotri, A.R., Marchetto, M.C.N., Gage, F.H., Chen, G., 2016b. KCC2 rescues functional deficits in human neurons derived from patients with Rett syndrome. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 113, 751–756.

Tanis, J.E., Bellemer, A., Moresco, J.J., Forbush, B., Koelle, M.R., 2009a. The Potassium Chloride Cotransporter KCC-2 Coordinates Development of Inhibitory Neurotransmission and Synapse Structure in Caenorhabditis elegans. J. Neurosci. 29, 9943–9954.

Tanis, J.E., Bellemer, A., Moresco, J.J., Forbush, B., Koelle, M.R., 2009b. The Potassium Chloride Cotransporter KCC-2 Coordinates Development of Inhibitory Neurotransmission and Synapse Structure in Caenorhabditis elegans. J. Neurosci. 29, 9943–9954.

Tapia, D., Suárez, P., Arias-García, M.A., Garcia-Vilchis, B., Serrano-Reyes, M., Bargas, J., Galarraga, E., 2019. Localization of chloride co-transporters in striatal neurons. NeuroReport 30, 457–462.

Tashiro, M., Naito, T., Kagawa, Y., Kawakami, J., 2012. Simultaneous determination of prochlorperazine and its metabolites in human plasma using isocratic liquid chromatography tandem mass spectrometry. Biomed. Chromatogr. 26, 754–760.

Taylor, C.P., Angelotti, T., Fauman, E., 2007. Pharmacology and mechanism of action of pregabalin: the calcium channel alpha2-delta (alpha2-delta) subunit as a target for antiepileptic drug discovery. Epilepsy Res. 73, 137–150.

Taylor, R.R., Nevill, G., Forge, A., 2008. Rapid hair cell loss: a mouse model for cochlear lesions. J. Assoc. Res. Otolaryngol. JARO 9, 44–64.

Téllez-Zenteno, J.F., Dhar, R., Wiebe, S., 2005a. Long-term seizure outcomes following epilepsy surgery: a systematic review and meta-analysis. Brain J. Neurol. 128, 1188–1198.

Téllez-Zenteno, J.F., Dhar, R., Wiebe, S., 2005b. Long-term seizure outcomes following epilepsy surgery: a systematic review and meta-analysis. Brain J. Neurol. 128, 1188–1198.

Tellez-Zenteno, J.F., McLachlan, R.S., Parrent, A., Kubu, C.S., Wiebe, S., 2006. Hippocampal electrical stimulation in mesial temporal lobe epilepsy. Neurology 66, 1490–1494.

Terker, A.S., Zhang, C., Erspamer, K.J., Gamba, G., Yang, C.-L., Ellison, D.H., 2016. Unique chloride-sensing properties of WNK4 permit the distal nephron to modulate potassium homeostasis. Kidney Int. 89, 127–134.

Terstappen, G.C., 1999. Functional Analysis of Native and Recombinant Ion Channels Using a High-Capacity Nonradioactive Rubidium Efflux Assay. Anal. Biochem. 272, 149–155.

Thomas, E.A., Petrou, S., 2013. Network-specific mechanisms may explain the paradoxical effects of carbamazepine and phenytoin. Epilepsia 54, 1195–1202.

Thomas, G.P., Jobst, B.C., 2015. Critical review of the responsive neurostimulator system for epilepsy. Med. Devices Auckl. NZ 8, 405–411.

Thomas, R.H., Berkovic, S.F., 2014. The hidden genetics of epilepsy-a clinically important new paradigm. Nat. Rev. Neurol. 10, 283–292.

Ting, J.T., Daigle, T.L., Chen, Q., Feng, G., 2014. Acute brain slice methods for adult and aging animals: application of targeted patch clamp analysis and optogenetics. Methods Mol. Biol. Clifton NJ 1183, 221–242.

Ting, J.T., Kalmbach, B., Chong, P., de Frates, R., Keene, C.D., Gwinn, R.P., Cobbs, C., Ko, A.L., Ojemann, J.G., Ellenbogen, R.G., Koch, C., Lein, E., 2018. A robust ex vivo experimental platform for molecular-genetic dissection of adult human neocortical cell types and circuits. Sci. Rep. 8, 8407.

Töllner, K., Brandt, C., Römermann, K., Löscher, W., 2015. The organic anion transport inhibitor probenecid increases brain concentrations of the NKCC1 inhibitor bumetanide. Eur. J. Pharmacol. 746, 167–173.

Töllner, K., Brandt, C., Töpfer, M., Brunhofer, G., Erker, T., Gabriel, M., Feit, P.W., Lindfors, J., Kaila, K., Löscher, W., 2014. A novel prodrug-based strategy to increase effects of bumetanide in epilepsy. Ann. Neurol. 75, 550–562.

Tomita, K., Yamanishi-Taira, S., Igarashi, K., Oogai, Y., Kuwahara, Y., Roudkenar, M.H., Roushandeh, A.M., Miyawaki, S., Kurimasa, A., Sato, T., 2022a. Oxytocin ameliorates KCC2 decrease induced by oral bacteria-derived LPS that affect rat primary cultured cells and PC-12 cells. Peptides 150, 170734.

Tomita, K., Yamanishi-Taira, S., Igarashi, K., Oogai, Y., Kuwahara, Y., Roudkenar, M.H., Roushandeh, A.M., Miyawaki, S., Kurimasa, A., Sato, T., 2022b. Oxytocin ameliorates KCC2 decrease induced by oral bacteria-derived LPS that affect rat primary cultured cells and PC-12 cells. Peptides 150, 170734.

Tomson, T., Battino, D., Bonizzoni, E., Craig, J., Lindhout, D., Sabers, A., Perucca, E., Vajda, F., EURAP study group, 2011. Dose-dependent risk of malformations with antiepileptic drugs: an analysis of data from the EURAP epilepsy and pregnancy registry. Lancet Neurol. 10, 609–617.

Tong, X., Patsalos, P.N., 2001. A microdialysis study of the novel antiepileptic drug levetiracetam: extracellular pharmacokinetics and effect on taurine in rat brain. Br. J. Pharmacol. 133, 867–874.

Tornberg, J., Voikar, V., Savilahti, H., Rauvala, H., Airaksinen, M.S., 2005a. Behavioural phenotypes of hypomorphic KCC2-deficient mice. Eur. J. Neurosci. 21, 1327–1337.

Tornberg, J., Voikar, V., Savilahti, H., Rauvala, H., Airaksinen, M.S., 2005b. Behavioural phenotypes of hypomorphic KCC2-deficient mice. Eur. J. Neurosci. 21, 1327–1337.

Tornberg, J., Voikar, V., Savilahti, H., Rauvala, H., Airaksinen, M.S., 2005c. Behavioural phenotypes of hypomorphic KCC2-deficient mice. Eur. J. Neurosci. 21, 1327–1337.

Toyoda, I., Bower, M.R., Leyva, F., Buckmaster, P.S., 2013. Early activation of ventral hippocampus and subiculum during spontaneous seizures in a rat model of temporal lobe epilepsy. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 33, 11100–11115.

Tracey, K.J., 2002. The inflammatory reflex. Nature 420, 853–859.

Treiman, D.M., 2001. GABAergic Mechanisms in Epilepsy. Epilepsia 42, 8–12.

Turrigiano, G.G., Nelson, S.B., 1998. Thinking Globally, Acting Locally: AMPA Receptor Turnover and Synaptic Strength. Neuron 21, 933–935.

Turski, L., Ikonomidou, C., Turski, W.A., Bortolotto, Z.A., Cavalheiro, E.A., 1989. Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. Synap. N. Y. N 3, 154–171.

Turski, W.A., Cavalheiro, E.A., Schwarz, M., Czuczwar, S.J., Kleinrok, Z., Turski, L., 1983. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. Behav. Brain Res. 9, 315–335.

Tyzio, R., Cossart, R., Khalilov, I., Minlebaev, M., Hübner, C.A., Represa, A., Ben-Ari, Y., Khazipov, R., 2006. Maternal oxytocin triggers a transient inhibitory switch in GABA signaling in the fetal brain during delivery. Science 314, 1788–1792.

Tyzio, R., Nardou, R., Ferrari, D.C., Tsintsadze, T., Shahrokhi, A., Eftekhari, S., Khalilov, I., Tsintsadze, V., Brouchoud, C., Chazal, G., Lemonnier, E., Lozovaya, N., Burnashev, N., Ben-Ari, Y., 2014a. Oxytocin-Mediated GABA Inhibition During Delivery Attenuates Autism Pathogenesis in Rodent Offspring. Science 343, 675–679.

Tyzio, R., Nardou, R., Ferrari, D.C., Tsintsadze, T., Shahrokhi, A., Eftekhari, S., Khalilov, I., Tsintsadze, V., Brouchoud, C., Chazal, G., Lemonnier, E., Lozovaya, N., Burnashev, N., Ben-Ari, Y., 2014b. Oxytocin-mediated GABA inhibition during delivery attenuates autism pathogenesis in rodent offspring. Science 343, 675–679.

Urrestarazu, E., Chander, R., Dubeau, F., Gotman, J., 2007. Interictal high-frequency oscillations (100–500 Hz) in the intracerebral EEG of epileptic patients. Brain 130, 2354–2366.

Usui, N., Terada, K., Baba, K., Matsuda, K., Usui, K., Tottori, T., Mihara, T., Inoue, Y., 2015. Significance of Very-High-Frequency Oscillations (Over 1,000Hz) in Epilepsy. Ann. Neurol. 78, 295–302.

Uvarov, P., Ludwig, A., Markkanen, M., Pruunsild, P., Kaila, K., Delpire, E., Timmusk, T., Rivera, C., Airaksinen, M.S., 2007. A Novel N-terminal Isoform of the Neuron-specific K-Cl Cotransporter KCC2*. J. Biol. Chem. 282, 30570–30576.

Uvarov, P., Ludwig, A., Markkanen, M., Rivera, C., Airaksinen, M.S., 2006. Upregulation of the Neuron-Specific K+/Cl– Cotransporter Expression by Transcription Factor Early Growth Response 4. J. Neurosci. 26, 13463–13473.

Uvarov, P., Ludwig, A., Markkanen, M., Soni, S., Hübner, C.A., Rivera, C., Airaksinen, M.S., 2009a. Coexpression and Heteromerization of Two Neuronal K-Cl Cotransporter Isoforms in Neonatal Brain. J. Biol. Chem. 284, 13696–13704.

Uvarov, P., Ludwig, A., Markkanen, M., Soni, S., Hübner, C.A., Rivera, C., Airaksinen, M.S., 2009b. Coexpression and Heteromerization of Two Neuronal K-Cl Cotransporter Isoforms in Neonatal Brain. J. Biol. Chem. 284, 13696–13704.

Uvarov, P., Pruunsild, P., Timmusk, T., Airaksinen, M.S., 2005. Neuronal K+/Cl– co-transporter (KCC2) transgenes lacking neurone restrictive silencer element recapitulate CNS neurone-specific expression and developmental up-regulation of endogenous KCC2 gene. J. Neurochem. 95, 1144–1155.

Vajda, F.J.E., O'Brien, T.J., Lander, C.M., Graham, J., Roten, A., Eadie, M.J., 2013. Teratogenesis in repeated pregnancies in antiepileptic drug-treated women. Epilepsia 54, 181–186.

van Andel, D.M., Sprengers, J.J., Oranje, B., Scheepers, F.E., Jansen, F.E., Bruining, H., 2020. Effects of bumetanide on neurodevelopmental impairments in patients with tuberous sclerosis complex: an open-label pilot study. Mol. Autism 11, 30.

van Loo, K.M.J., Schaub, C., Pitsch, J., Kulbida, R., Opitz, T., Ekstein, D., Dalal, A., Urbach, H., Beck, H., Yaari, Y., Schoch, S., Becker, A.J., 2015. Zinc regulates a key transcriptional pathway for epileptogenesis via metal-regulatory transcription factor 1. Nat. Commun. 6, 8688.

Vardi, N., Zhang, L.-L., Payne, J.A., Sterling, P., 2000. Evidence That Different Cation Chloride Cotransporters in Retinal Neurons Allow Opposite Responses to GABA. J. Neurosci. 20, 7657–7663.

Vargas, D.L., Nascimbene, C., Krishnan, C., Zimmerman, A.W., Pardo, C.A., 2005. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. Ann. Neurol. 57, 67–81.

Vargas, K.J., Terunuma, M., Tello, J.A., Pangalos, M.N., Moss, S.J., Couve, A., 2008. The availability of surface GABA B receptors is independent of gamma-aminobutyric acid but controlled by glutamate in central neurons. J. Biol. Chem. 283, 24641–24648.

Varvel, N.H., Jiang, J., Dingledine, R., 2015. Candidate drug targets for prevention or modification of epilepsy. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 55, 229–247.

Velasco, A.L., Velasco, F., Velasco, M., Trejo, D., Castro, G., Carrillo-Ruiz, J.D., 2007. Electrical Stimulation of the Hippocampal Epileptic Foci for Seizure Control: A Double-Blind, Long-Term Follow-Up Study. Epilepsia 48, 1895–1903.

Velasco, A.L., Wilson, C.L., Babb, T.L., Engel, J., 2000. Functional and anatomic correlates of two frequently observed temporal lobe seizure-onset patterns. Neural Plast. 7, 49–63.

Velišek, L., Moshe, S.L., Xu, S.-G., Cammer, W., 1993. Reduced susceptibility to seizures in carbonic anhydrase II deficient mutant mice. Epilepsy Res. 14, 115–121.

Verma, V., Kumar, M.J.V., Sharma, K., Rajaram, S., Muddashetty, R., Manjithaya, R., Behnisch, T., Clement, J.P., 2022. Pharmacological intervention in young adolescents rescues synaptic physiology and behavioural deficits in Syngap1+/- mice. Exp. Brain Res. 240, 289–309.

Vermoesen, K., Smolders, I., Massie, A., Michotte, Y., Clinckers, R., 2010. The control of kainic acid-induced status epilepticus. Epilepsy Res. 90, 164–166.

Vezzani, A., 2015. Anti-inflammatory drugs in epilepsy: does it impact epileptogenesis? Expert Opin. Drug Saf. 14, 583–592.

Vezzani, A., French, J., Bartfai, T., Baram, T.Z., 2011. The role of inflammation in epilepsy. Nat. Rev. Neurol. 7, 31–40.

Viemari, J.-C., Bos, R., Boulenguez, P., Brocard, C., Brocard, F., Bras, H., Coulon, P., Liabeuf, S., Pearlstein, E., Sadlaoud, K., Stil, A., Tazerart, S., Vinay, L., 2011. Chapter 1--importance of chloride homeostasis in the operation of rhythmic motor networks. Prog. Brain Res. 188, 3–14.

Vinay, L., Jean-Xavier, C., 2008. Plasticity of spinal cord locomotor networks and contribution of cation-chloride cotransporters. Brain Res. Rev. 57, 103–110.

Virtanen, M.A., Uvarov, P., Hübner, C.A., Kaila, K., 2020. NKCC1, an Elusive Molecular Target in Brain Development: Making Sense of the Existing Data. Cells 9, 2607.

Virtanen, M.A., Uvarov, P., Mavrovic, M., Poncer, J.C., Kaila, K., 2021. The Multifaceted Roles of KCC2 in Cortical Development. Trends Neurosci. 44, 378–392.

Vitari, A.C., Thastrup, J., Rafiqi, F.H., Deak, M., Morrice, N.A., Karlsson, H.K.R., Alessi, D.R., 2006. Functional interactions of the SPAK/OSR1 kinases with their upstream activator WNK1 and downstream substrate NKCC1. Biochem. J. 397, 223–231.

Vogl, C., Mochida, S., Wolff, C., Whalley, B.J., Stephens, G.J., 2012. The Synaptic Vesicle Glycoprotein 2A Ligand Levetiracetam Inhibits Presynaptic Ca^{2+} Channels through an Intracellular Pathway. Mol. Pharmacol. 82, 199–208.

von Ellenrieder, N., Dubeau, F., Gotman, J., Frauscher, B., 2017. Physiological and pathological high-frequency oscillations have distinct sleep-homeostatic properties. NeuroImage Clin. 14, 566–573.

Vonck, K.E.J., Larsen, L.E., 2018. Chapter 18 - Vagus Nerve Stimulation: Mechanism of Action, in: Krames, E.S., Peckham, P.H., Rezai, A.R. (Eds.), Neuromodulation (Second Edition). Academic Press, pp. 211–220.

Wake, H., Watanabe, M., Moorhouse, A.J., Kanematsu, T., Horibe, S., Matsukawa, N., Asai, K., Ojika, K., Hirata, M., Nabekura, J., 2007a. Early Changes in KCC2 Phosphorylation in Response to Neuronal Stress Result in Functional Downregulation. J. Neurosci. 27, 1642–1650.

Wake, H., Watanabe, M., Moorhouse, A.J., Kanematsu, T., Horibe, S., Matsukawa, N., Asai, K., Ojika, K., Hirata, M., Nabekura, J., 2007b. Early changes in KCC2 phosphorylation in response to neuronal stress result in functional downregulation. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 27, 1642–1650.

Wakita, M., Kotani, N., Kogure, K., Akaike, N., 2014. Inhibition of excitatory synaptic transmission in hippocampal neurons by levetiracetam involves Zn^{2+}-dependent GABA type A receptor-mediated presynaptic modulation. J. Pharmacol. Exp. Ther. 348, 246–259.

Wan, L., Chen, L., Yu, J., Wang, G., Wu, Z., Qian, B., Liu, X., Wang, Y., 2020. Coordinated downregulation of KCC2 and GABAA receptor contributes to inhibitory dysfunction during seizure induction. Biochem. Biophys. Res. Commun. 532, 489–495.

Wang, C., Shimizu-Okabe, C., Watanabe, K., Okabe, A., Matsuzaki, H., Ogawa, T., Mori, N., Fukuda, A., Sato, K., 2002. Developmental changes in KCC1, KCC2, and NKCC1 mRNA expressions in the rat brain. Dev. Brain Res. 139, 59–66.

Wang, D.D., Kriegstein, A.R., 2011. Blocking Early GABA Depolarization with Bumetanide Results in Permanent Alterations in Cortical Circuits and Sensorimotor Gating Deficits. Cereb. Cortex N. Y. NY 21, 574–587.

Wang, L., Dufour, S., Valiante, T.A., Carlen, P.L., 2016. Extracellular Potassium and Seizures: Excitation, Inhibition and the Role of Ih. Int. J. Neural Syst. 26, 1650044.

Wang, N., Mi, X., Gao, B., Gu, J., Wang, W., Zhang, Y., Wang, X., 2015. Minocycline inhibits brain inflammation and attenuates spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus. Neuroscience 287, 144–156.

Wang, S., Zhang, X.Q., Song, C.G., Xiao, T., Zhao, M., Zhu, G., Zhao, C.S., 2015. In vivo effects of bumetanide at brain concentrations incompatible with NKCC1 inhibition on newborn DGC structure and spontaneous EEG seizures following hypoxia-induced neonatal seizures. Neuroscience 286, 203–215.

Wang, W., Wang, H., Gong, N., Xu, T.-L., 2006. Changes of K+ -Cl- cotransporter 2 (KCC2) and circuit activity in propofol-induced impairment of long-term potentiation in rat hippocampal slices. Brain Res. Bull. 70, 444–449.

Warmuth, S., Zimmermann, I., Dutzler, R., 2009. X-ray Structure of the C-Terminal Domain of a Prokaryotic Cation-Chloride Cotransporter. Structure 17, 538–546.

Watanabe, M., Wake, H., Moorhouse, A.J., Nabekura, J., 2009. Clustering of neuronal K+-Cl- cotransporters in lipid rafts by tyrosine phosphorylation. J. Biol. Chem. 284, 27980–27988.

Way, S.W., Rozas, N.S., Wu, H.C., McKenna, J., III, Reith, R.M., Hashmi, S.S., Dash, P.K., Gambello, M.J., 2012. The differential effects of prenatal and/or postnatal rapamycin on neurodevelopmental defects and cognition in a neuroglial mouse model of tuberous sclerosis complex. Hum. Mol. Genet. 21, 3226–3236.

Weaver, C.D., Harden, D., Dworetzky, S.I., Robertson, B., Knox, R.J., 2004. A Thallium-Sensitive, Fluorescence-Based Assay for Detecting and Characterizing Potassium Channel Modulators in Mammalian Cells. SLAS Discov. 9, 671–677.

Weber, M., Hartmann, A.-M., Beyer, T., Ripperger, A., Nothwang, H.G., 2014. A novel regulatory locus of phosphorylation in the C terminus of the potassium chloride cotransporter KCC2 that interferes with N-ethylmaleimide or staurosporine-mediated activation. J. Biol. Chem. 289, 18668–18679.

Weilinger, N.L., LeDue, J.M., Kahle, K.T., MacVicar, B.A., 2020. Quantitative fluorescence lifetime imaging uncovers a novel role for KCC2 chloride transport in dendritic microdomains.

Weissberg, I., Wood, L., Kamintsky, L., Vazquez, O., Milikovsky, D.Z., Alexander, A., Oppenheim, H., Ardizzone, C., Becker, A., Frigerio, F., Vezzani, A., Buckwalter, M.S., Huguenard, J.R., Friedman, A., Kaufer, D., 2015. Albumin induces excitatory synaptogenesis through astrocytic TGF-β/ALK5 signaling in a model of acquired epilepsy following blood-brain barrier dysfunction. Neurobiol. Dis. 78, 115–125.

Weng, T.-Y., Chiu, W.-T., Liu, H.-S., Cheng, H.-C., Shen, M.-R., Mount, D.B., Chou, C.-Y., 2013. Glycosylation regulates the function and membrane localization of KCC4. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res. 1833, 1133–1146.

Wenz, M., Hartmann, A.-M., Friauf, E., Nothwang, H.G., 2009. CIP1 is an activator of the K+-Cl- cotransporter KCC2. Biochem. Biophys. Res. Commun. 381, 388–392.

Werhahn, K.J., Trinka, E., Dobesberger, J., Unterberger, I., Baum, P., Deckert-Schmitz, M., Kniess, T., Schmitz, B., Bernedo, V., Ruckes, C., Ehrlich, A., Krämer, G., 2015. A randomized, double-blind comparison of antiepileptic drug treatment in the elderly with new-onset focal epilepsy. Epilepsia 56, 450–459.

White, A., Williams, P.A., Hellier, J.L., Clark, S., Dudek, F.E., Staley, K.J., 2010. EEG spike activity precedes epilepsy after kainate-induced status epilepticus. Epilepsia 51, 371–383.

Wickham, J., Brödjegård, N.G., Vighagen, R., Pinborg, L.H., Bengzon, J., Woldbye, D.P.D., Kokaia, M., Andersson, M., 2018. Prolonged life of human acute hippocampal slices from temporal lobe epilepsy surgery. Sci. Rep. 8, 4158.

Wickham, J., Ledri, M., Bengzon, J., Jespersen, B., Pinborg, L.H., Englund, E., Woldbye, D.P.D., Andersson, M., Kokaia, M., 2019. Inhibition of epileptiform activity by neuropeptide Y in brain tissue from drug-resistant temporal lobe epilepsy patients. Sci. Rep. 9, 19393.

Wiebe, S., Blume, W.T., Girvin, J.P., Eliasziw, M., Effectiveness and Efficiency of Surgery for Temporal Lobe Epilepsy Study Group, 2001. A randomized, controlled trial of surgery for temporal-lobe epilepsy. N. Engl. J. Med. 345, 311–318.

Wilfong, A.A., Willmore, L.J., 2006. Zonisamide - a review of experience and use in partial seizures. Neuropsychiatr. Dis. Treat. 2, 269–280.

Wilkinson, D.J., Post, M.A., Venglarik, C., Chang, D., Dawson, D.C., 1993. Mercury blockade of thiazide-sensitive NaCl cotransport in flounder urinary bladder. Toxicol. Appl. Pharmacol. 123, 170–176.

Williams, J.R., Payne, J.A., 2004. Cation transport by the neuronal K(+)-Cl(-) cotransporter KCC2: thermodynamics and kinetics of alternate transport modes. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 287, C919-931.

Williams, J.R., Sharp, J.W., Kumari, V.G., Wilson, M., Payne, J.A., 1999. The Neuron-specific K-Cl Cotransporter, KCC2: ANTIBODY DEVELOPMENT AND INITIAL CHARACTERIZATION OF THE PROTEIN*. J. Biol. Chem. 274, 12656–12664.

Williams, P., White, A., Ferraro, D., Clark, S., Staley, K., Dudek, F.E., 2006. The use of radiotelemetry to evaluate electrographic seizures in rats with kainate-induced epilepsy. J. Neurosci. Methods 155, 39–48.

Williams, P.A., White, A.M., Clark, S., Ferraro, D.J., Swiercz, W., Staley, K.J., Dudek, F.E., 2009. Development of spontaneous recurrent seizures after kainate-induced status epilepticus. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 29, 2103–2112.

Williams-Karnesky, R.L., Sandau, U.S., Lusardi, T.A., Lytle, N.K., Farrell, J.M., Pritchard, E.M., Kaplan, D.L., Boison, D., 2013. Epigenetic changes induced by adenosine augmentation therapy prevent epileptogenesis. J. Clin. Invest. 123, 3552–3563.

Wirrell, E., Tinuper, P., Perucca, E., Moshé, S.L., 2022. Introduction to the epilepsy syndrome papers. Epilepsia 63, 1330–1332.

Witkin, J.M., Ping, X., Cerne, R., Mouser, C., Jin, X., Hobbs, J., Tiruveedhula, V.V.N.P.B., Li, G., Jahan, R., Rashid, F., Kumar Golani, L., Cook, J.M., Smith, J.L., 2019. The value of human epileptic tissue in the characterization and development of novel antiepileptic drugs: The example of CERC-611 and KRM-II-81. Brain Res. 1722, 146356.

Witte, M., Reinert, T., Dietz, B., Nerlich, J., Rübsamen, R., Milenkovic, I., 2014. Depolarizing chloride gradient in developing cochlear nucleus neurons: Underlying mechanism and implication for calcium signaling. Neuroscience 261, 207–222.

Wittner, L., Huberfeld, G., Clémenceau, S., Erőss, L., Dezamis, E., Entz, L., Ulbert, I., Baulac, M., Freund, T.F., Maglóczky, Z., Miles, R., 2009. The epileptic human hippocampal cornu ammonis 2 region generates spontaneous interictal-like activity in vitro. Brain 132, 3032–3046.

Wittner, L., Maglóczky, Z., Borhegyi, Z., Halász, P., Tóth, S., Erőss, L., Szabó, Z., Freund, T.F., 2001. Preservation of perisomatic inhibitory input of granule cells in the epileptic human dentate gyrus. Neuroscience 108, 587–600.

Won, S.M., Lee, J.H., Park, U.J., Gwag, J., Gwag, B.J., Lee, Y.B., 2011. Iron mediates endothelial cell damage and blood-brain barrier opening in the hippocampus after transient forebrain ischemia in rats. Exp. Mol. Med. 43, 121–128.

Wong, A.B., Jing, Z., Rutherford, M.A., Frank, T., Strenzke, N., Moser, T., 2013. Concurrent Maturation of Inner Hair Cell Synaptic Ca2+ Influx and Auditory Nerve Spontaneous Activity around Hearing Onset in Mice. J. Neurosci. 33, 10661–10666.

Wong, J.C., Shapiro, L., Thelin, J.T., Heaton, E.C., Zaman, R.U., D'Souza, M.J., Murnane, K.S., Escayg, A., 2021. Nanoparticle encapsulated oxytocin increases resistance to induced seizures and restores social behavior in Scn1a-derived epilepsy. Neurobiol. Dis. 147, 105147.

Woo, N.-S., Lu, J., England, R., McClellan, R., Dufour, S., Mount, D.B., Deutch, A.Y., Lovinger, D.M., Delpire, E., 2002a. Hyperexcitability and epilepsy associated with disruption of the mouse neuronal-specific K–Cl cotransporter gene. Hippocampus 12, 258–268.

Woo, N.-S., Lu, J., England, R., McClellan, R., Dufour, S., Mount, D.B., Deutch, A.Y., Lovinger, D.M., Delpire, E., 2002b. Hyperexcitability and epilepsy associated with disruption of the mouse neuronal-specific K-Cl cotransporter gene. Hippocampus 12, 258–268.

Woodbury, D.M., Karler, R., 1960. The role of carbon dioxide in the nervous system. Anesthesiology 21, 686–703.

Woodbury, D.M., Koch, A., Vernadakis, A., 1958a. Relation between excitability and metabolism in brain as elucidated by anticonvulsant drugs. Neurology 8, 112–116.

Woodbury, D.M., Rollins, L.T., Gardner, M.D., Hirschi, W.L., Hogan, J.R., Rallison, M.L., Tanner, G.S., Brodie, D.A., 1958b. Effects of carbon dioxide on brain excitability and electrolytes. Am. J. Physiol. 192, 79–90.

Woodin, M.A., Ganguly, K., Poo, M., 2003. Coincident Pre- and Postsynaptic Activity Modifies GABAergic Synapses by Postsynaptic Changes in Cl− Transporter Activity. Neuron 39, 807–820.

Worrell, G., Gotman, J., 2011. High-frequency oscillations and other electrophysiological biomarkers of epilepsy: clinical studies. Biomark. Med. 5, 557–566.

Worrell, G.A., Parish, L., Cranstoun, S.D., Jonas, R., Baltuch, G., Litt, B., 2004. High-frequency oscillations and seizure generation in neocortical epilepsy. Brain 127, 1496–1506.

Wozny, C., Knopp, A., Lehmann, T.-N., Heinemann, U., Behr, J., 2005. The Subiculum: A Potential Site of Ictogenesis in Human Temporal Lobe Epilepsy. Epilepsia 46, 17–21.

Wright, R., Newey, S.E., Ilie, A., Wefelmeyer, W., Raimondo, J.V., Ginham, R., Mcllhinney, R.A.J., Akerman, C.J., 2017a. Neuronal Chloride Regulation via KCC2 Is Modulated through a GABAB Receptor Protein Complex. J. Neurosci. 37, 5447–5462.

Wright, R., Newey, S.E., Ilie, A., Wefelmeyer, W., Raimondo, J.V., Ginham, R., Mcllhinney, R.A.J., Akerman, C.J., 2017b. Neuronal Chloride Regulation via KCC2 Is Modulated through a GABAB Receptor Protein Complex. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 37, 5447–5462.

Wright, S.K., Wilson, M.A., Walsh, R., Lo, W.B., Mundil, N., Agrawal, S., Philip, S., Seri, S., Greenhill, S.D., Woodhall, G.L., 2020. Abolishing spontaneous epileptiform activity in human brain tissue through AMPA receptor inhibition. Ann. Clin. Transl. Neurol. 7, 883–890.

Xanthos, D.N., Sandkühler, J., 2014. Neurogenic neuroinflammation: inflammatory CNS reactions in response to neuronal activity. Nat. Rev. Neurosci. 15, 43–53.

Xie, Y., Chang, S., Zhao, C., Wang, F., Liu, S., Wang, J., Delpire, E., Ye, S., Guo, J., 2020. Structures and an activation mechanism of human potassium-chloride cotransporters. Sci. Adv. 6, eabc5883.

Xu, B., Min, X., Stippec, S., Lee, B.-H., Goldsmith, E.J., Cobb, M.H., 2002. Regulation of WNK1 by an Autoinhibitory Domain and Autophosphorylation*. J. Biol. Chem. 277, 48456–48462.

Xu, J.C., Lytle, C., Zhu, T.T., Payne, J.A., Benz, E., Forbush, B., 1994. Molecular cloning and functional expression of the bumetanide-sensitive Na-K-Cl cotransporter. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91, 2201–2205.

Xu, Y., Barnes, A.P., Alkayed, N.J., 2021. Role of GPR39 in Neurovascular Homeostasis and Disease. Int. J. Mol. Sci. 22, 8200.

Yamada, J., Okabe, A., Toyoda, H., Kilb, W., Luhmann, H.J., Fukuda, A., 2004. Cl− uptake promoting depolarizing GABA actions in immature rat neocortical neurones is mediated by NKCC1. J. Physiol. 557, 829–841.

Yamada, K., Levell, J., Yoon, T., Kohls, D., Yowe, D., Rigel, D.F., Imase, H., Yuan, J., Yasoshima, K., DiPetrillo, K., Monovich, L., Xu, L., Zhu, M., Kato, M., Jain, M., Idamakanti, N., Taslimi, P., Kawanami, T., Argikar, U.A., Kunjathoor, V., Xie, X., Yagi, Y.I., Iwaki, Y., Robinson, Z., Park, H.-M., 2017. Optimization of Allosteric With-No-Lysine (WNK) Kinase Inhibitors and Efficacy in Rodent Hypertension Models. J. Med. Chem. 60, 7099–7107.

Yamada, K., Park, H.-M., Rigel, D.F., DiPetrillo, K., Whalen, E.J., Anisowicz, A., Beil, M., Berstler, J., Brocklehurst, C.E., Burdick, D.A., Caplan, S.L., Capparelli, M.P., Chen, G., Chen, W., Dale, B., Deng, L., Fu, F., Hamamatsu, N., Harasaki, K., Herr, T., Hoffmann, P., Hu, Q.-Y., Huang, W.-J., Idamakanti, N., Imase, H., Iwaki, Y., Jain, M., Jeyaseelan, J., Kato, M., Kaushik, V.K., Kohls, D., Kunjathoor, V., LaSala, D., Lee, J., Liu, J., Luo, Y., Ma, F., Mo, R., Mowbray, S., Mogi, M., Ossola, F., Pandey, P., Patel, S.J., Raghavan, S., Salem, B., Shanado, Y.H., Trakshel, G.M., Turner, G., Wakai, H., Wang, C., Weldon, S., Wielicki, J.B., Xie, X., Xu, L., Yagi, Y.I., Yasoshima, K., Yin, J., Yowe, D., Zhang, J.-H., Zheng, G., Monovich, L., 2016. Small-molecule WNK inhibition regulates cardiovascular and renal function. Nat. Chem. Biol. 12, 896–898.

Yamamoto, H., Schoonjans, K., Auwerx, J., 2007. Sirtuin functions in health and disease. Mol. Endocrinol. Baltim. Md 21, 1745–1755.

Yan, Q., Lu, Y., Zhou, L., Chen, J., Xu, H., Cai, M., Shi, Y., Jiang, J., Xiong, W., Gao, J., Wang, H., 2018. Mechanistic insights into GLUT1 activation and clustering revealed by super-resolution imaging. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 115, 7033–7038.

Yan, Y., Dempsey, R.J., Sun, D., 2001. Expression of Na+-K+-Cl− cotransporter in rat brain during development and its localization in mature astrocytes. Brain Res. 911, 43–55.

Yang, X., Wang, Q., Cao, E., 2020. Structure of the human cation–chloride cotransporter NKCC1 determined by single-particle electron cryo-microscopy. Nat. Commun. 11, 1016.

Yegnanarayan, R., Mahesh, S.D., Sangle, S., 2006. Chronotherapeutic dose schedule of phenytoin and carbamazepine in epileptic patients. Chronobiol. Int. 23, 1035–1046.

Yekhlef, L., Breschi, G.L., Lagostena, L., Russo, G., Taverna, S., 2015. Selective activation of parvalbumin- or somatostatin-expressing interneurons triggers epileptic seizurelike activity in mouse medial entorhinal cortex. J. Neurophysiol. 113, 1616–1630.

Yeo, M., Berglund, K., Augustine, G., Liedtke, W., 2009. Novel Repression of Kcc2 Transcription by REST–RE-1 Controls Developmental Switch in Neuronal Chloride. J. Neurosci. 29, 14652–14662.

Yeo, M., Chen, Y., Jiang, C., Chen, G., Wang, K., Chandra, S., Bortsov, A., Lioudyno, M., Zeng, Q., Wang, P., Wang, Z., Busciglio, J., Ji, R.-R., Liedtke, W., 2021a. Repurposing cancer drugs identifies kenpaullone which ameliorates pathologic pain in preclinical models via normalization of inhibitory neurotransmission. Nat. Commun. 12, 6208.

Yeo, M., Chen, Y., Jiang, C., Chen, G., Wang, K., Chandra, S., Bortsov, A., Lioudyno, M., Zeng, Q., Wang, P., Wang, Z., Busciglio, J., Ji, R.-R., Liedtke, W., 2021b. Repurposing cancer drugs identifies kenpaullone which ameliorates pathologic pain in preclinical models via normalization of inhibitory neurotransmission. Nat. Commun. 12, 6208.

Yin, C., Ishii, T., Kaneda, M., 2020. Two Types of Cl Transporters Contribute to the Regulation of Intracellular Cl Concentrations in ON- and OFF-type Bipolar Cells in the Mouse Retina. Neuroscience 440, 267–276.

Yoshioka, H., Nioka, S., Miyake, H., Zaman, A., Sawada, T., Chance, B., 1996. Seizure susceptibility during recovery from hypercapnia in neonatal dogs. Pediatr. Neurol. 15, 36–40.

Yu, H., Li, M., Wang, W., Wang, X., 2016. High throughput screening technologies for ion channels. Acta Pharmacol. Sin. 37, 34–43.

Yu, W., Jiang, M., Miralles, C.P., Li, R., Chen, G., De Blas, A.L., 2007. Gephyrin clustering is required for the stability of GABAergic synapses. Mol. Cell. Neurosci. 36, 484–500.

Yuan, X.-C., Wang, Y.-Y., Tian, L.-X., Yan, X.-J., Guo, Y.-X., Zhao, Y.-L., Baba, S.S., Jia, H., Wang, H.-S., Li, M., Huo, F.-Q., 2022a. Spinal 5-HT2A receptor is involved in electroacupuncture inhibition of chronic pain. Mol. Pain 18, 17448069221087584.

Yuan, X.-C., Wang, Y.-Y., Tian, L.-X., Yan, X.-J., Guo, Y.-X., Zhao, Y.-L., Baba, S.S., Jia, H., Wang, H.-S., Li, M., Huo, F.-Q., 2022b. Spinal 5-HT2A receptor is involved in electroacupuncture inhibition of chronic pain. Mol. Pain 18, 17448069221087584.

Yurdakök, M., 1985. [Rafanoxide therapy in a child with fascioliasis]. Mikrobiyol. Bul. 19, 38–40.

Zagórska, A., Pozo-Guisado, E., Boudeau, J., Vitari, A.C., Rafiqi, F.H., Thastrup, J., Deak, M., Campbell, D.G., Morrice, N.A., Prescott, A.R., Alessi, D.R., 2007. Regulation of activity and localization of the WNK1 protein kinase by hyperosmotic stress. J. Cell Biol. 176, 89–100.

Zechel, S., Nakagawa, Y., Ibáñez, C.F., 2016. Thalamo-cortical axons regulate the radial dispersion of neocortical GABAergic interneurons. eLife 5, e20770.

Zeng, L.-H., Rensing, N.R., Wong, M., 2009. The mammalian target of rapamycin signaling pathway mediates epileptogenesis in a model of temporal lobe epilepsy. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 29, 6964–6972.

Zeuthen, T., MacAulay, N., 2002. Cotransporters as molecular water pumps. Int. Rev. Cytol. 215, 259–284.

Zhang, D., Gopalakrishnan, S.M., Freiberg, G., Surowy, C.S., 2010. A thallium transport FLIPR-based assay for the identification of KCC2-positive modulators. J. Biomol. Screen. 15, 177–184.

Zhang, J., Bhuiyan, M.I.H., Zhang, T., Karimy, J.K., Wu, Z., Fiesler, V.M., Zhang, Jingfang, Huang, H., Hasan, M.N., Skrzypiec, A.E., Mucha, M., Duran, D., Huang, W., Pawlak, R., Foley, L.M., Hitchens, T.K., Minnigh, M.B., Poloyac, S.M., Alper, S.L., Molyneaux, B.J., Trevelyan, A.J., Kahle, K.T., Sun, D., Deng, X., 2020. Modulation of brain cation-Cl− cotransport via the SPAK kinase inhibitor ZT-1a. Nat. Commun. 11, 78.

Zhang, Jinwei, Gao, G., Begum, G., Wang, J., Khanna, A.R., Shmukler, B.E., Daubner, G.M., de los Heros, P., Davies, P., Varghese, J., Bhuiyan, M.I.H., Duan, J., Zhang, Jin, Duran, D., Alper, S.L., Sun, D., Elledge, S.J., Alessi, D.R., Kahle, K.T., 2016. Functional kinomics establishes a critical node of volume-sensitive cation-Cl− cotransporter regulation in the mammalian brain. Sci. Rep. 6, 35986.

Zhang, K., Tolstykh, G.P., Sanchez, R.M., Cavazos, J.E., 2011. Chronic Cellular Hyperexcitability in Elderly Epileptic Rats with Spontaneous Seizures Induced by Kainic Acid Status Epilepticus while Young Adults. Aging Dis. 2, 332–338.

Zhang, L., Huang, C.-C., Dai, Y., Luo, Q., Ji, Y., Wang, K., Deng, S., Yu, J., Xu, M., Du, X., Tang, Y., Shen, C., Feng, J., Sahakian, B.J., Lin, C.-P., Li, F., 2020. Symptom improvement in children with autism spectrum disorder

following bumetanide administration is associated with decreased GABA/glutamate ratios. Transl. Psychiatry 10, 1–12.

Zhang, L.-L., Delpire, E., Vardi, N., 2007a. NKCC1 does not accumulate chloride in developing retinal neurons. J. Neurophysiol. 98, 266–277.

Zhang, L.-L., Delpire, E., Vardi, N., 2007b. NKCC1 Does Not Accumulate Chloride in Developing Retinal Neurons. J. Neurophysiol. 98, 266–277.

Zhang, L.-L., Fina, M.E., Vardi, N., 2006. Regulation of KCC2 and NKCC during development: Membrane insertion and differences between cell types. J. Comp. Neurol. 499, 132–143.

Zhang, S., Gao, H., Bao, G., 2015. Physical Principles of Nanoparticle Cellular Endocytosis. ACS Nano 9, 8655–8671.

Zhang, S., Zhou, J., Zhang, Y., Liu, T., Friedel, P., Zhuo, W., Somasekharan, S., Roy, K., Zhang, L., Liu, Y., Meng, X., Deng, H., Zeng, W., Li, G., Forbush, B., Yang, M., 2021a. The structural basis of function and regulation of neuronal cotransporters NKCC1 and KCC2. Commun. Biol. 4, 1–15.

Zhang, S., Zhou, J., Zhang, Y., Liu, T., Friedel, P., Zhuo, W., Somasekharan, S., Roy, K., Zhang, L., Liu, Y., Meng, X., Deng, H., Zeng, W., Li, G., Forbush, B., Yang, M., 2021b. The structural basis of function and regulation of neuronal cotransporters NKCC1 and KCC2. Commun. Biol. 4, 1–15.

Zhang, X., Cui, S.-S., Wallace, A.E., Hannesson, D.K., Schmued, L.C., Saucier, D.M., Honer, W.G., Corcoran, M.E., 2002. Relations between brain pathology and temporal lobe epilepsy. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 22, 6052–6061.

Zhao, B., Wong, A.Y.C., Murshid, A., Bowie, D., Presley, J.F., Bedford, F.K., 2008a. Identification of a novel di-leucine motif mediating K(+)/Cl(-) cotransporter KCC2 constitutive endocytosis. Cell. Signal. 20, 1769–1779.

Zhao, B., Wong, A.Y.C., Murshid, A., Bowie, D., Presley, J.F., Bedford, F.K., 2008b. Identification of a novel di-leucine motif mediating K(+)/Cl(-) cotransporter KCC2 constitutive endocytosis. Cell. Signal. 20, 1769–1779.

Zhao, Y., Shen, J., Wang, Q., Zhou, M., Cao, E., 2020. Inhibitory and Transport Mechanisms of the Human Cation-Chloride Cotransport KCC1.

Zhou, H.-Y., Chen, S.-R., Byun, H.-S., Chen, H., Li, L., Han, H.-D., Lopez-Berestein, G., Sood, A.K., Pan, H.-L., 2012. N-methyl-D-aspartate receptor- and calpain-mediated proteolytic cleavage of K+-Cl- cotransporter-2 impairs spinal chloride homeostasis in neuropathic pain. J. Biol. Chem. 287, 33853–33864.

Zhou, Y., Cheng, Y., Li, Y., Ma, J., Wu, Z., Chen, Y., Mei, J., Chen, M., 2021. Soluble β-amyloid impaired the GABA inhibition by mediating KCC2 in early APP/PS1 mice. Biosci. Trends 15, 330–340.

Zhu, J.-X., Xue, H., Ji, T., Xing, Y., 2011a. Cellular localization of NKCC2 and its possible role in the Cl− absorption in the rat and human distal colonic epithelia. Transl. Res. 158, 146–154.

Zhu, J.-X., Xue, H., Ji, T., Xing, Y., 2011b. Cellular localization of NKCC2 and its possible role in the Cl− absorption in the rat and human distal colonic epithelia. Transl. Res. 158, 146–154.

Zhu, L., Lovinger, D., Delpire, E., 2005. Cortical neurons lacking KCC2 expression show impaired regulation of intracellular chloride. J. Neurophysiol. 93, 1557–1568.

Ziemann, U., Reis, J., Schwenkreis, P., Rosanova, M., Strafella, A., Badawy, R., Müller-Dahlhaus, F., 2015. TMS and drugs revisited 2014. Clin. Neurophysiol. 126, 1847–1868.

Ziemann, U., Rothwell, J.C., Ridding, M.C., 1996. Interaction between intracortical inhibition and facilitation in human motor cortex. J. Physiol. 496 (Pt 3), 873–881.

Zijlmans, M., Jacobs, J., Zelmann, R., Dubeau, F., Gotman, J., 2009. High-frequency oscillations mirror disease activity in patients with epilepsy. Neurology 72, 979–986.

Zijlmans, M., Worrell, G.A., Dümpelmann, M., Stieglitz, T., Barborica, A., Heers, M., Ikeda, A., Usui, N., Le Van Quyen, M., 2017. How to record high-frequency oscillations in epilepsy: A practical guideline. Epilepsia 58, 1305–1315.