Sorbonne Université

École doctorale n°158

Cerveau, Cognition, Comportement

Institut du Cerveau

Équipe « Épilepsie clinique et expérimentale »

Régulation de l'expression et de la fonction du cotransporteur KCC2 au cours du développement cortical : spécificités des isoformes et d'un type neuronal

Par **Carla Pagan**

Thèse de doctorat de Neurosciences

Dirigée par Dr. Jean-Christophe Poncer

Présentée et soutenue publiquement le 11 septembre 2026

Devant un jury composé de :

Dr. Fiona Francis	Présidente du jury
Dr. Igor Medyna	Rapporteur
Dr. Muriel Thoby-Brisson	Rapportrice
Dr. Coralie Di Scala	Examinatrice
Dr. Mathieu Letellier	Examinateur
Dr. Jean-Christophe Poncer	Directeur de thèse

Résumé

Dans le cerveau mature, l'inhibition synaptique rapide repose sur des flux de chlorure au travers des récepteurs GABA-A neuronaux. Le co-transporteur potassium-chlorure KCC2, codé par le gène *SLC12A5*, exporte spécifiquement le chlorure des neurones et détermine ainsi la polarité de la transmission GABAergique. De par ce rôle central dans l'homéostasie du chlorure, l'altération de la fonction de KCC2 est associée à diverses maladies neurologiques, dont l'épilepsie. L'expression de KCC2 n'est toutefois pas constante mais augmente progressivement lors de la maturation neuronale, entraînant la transition d'une réponse dépolarisante à une réponse hyperpolarisante au GABA. Le moment de ce changement est déterminant, car l'effet dépolarisant du GABA régule de nombreux processus neurodéveloppementaux. Cette augmentation développementale constitue un paradigme qui connaît toutefois des exceptions. Ma thèse en explore deux : une isoforme et un type neuronal.

Le gène *SLC12A5* code deux isoformes neuronales, KCC2a et KCC2b, issues de deux promoteurs et premiers exons alternatifs, qui ne diffèrent que par leur domaine N-terminal. Tandis que l'expression de KCC2b augmente fortement au cours du développement, celle de KCC2a échappe à cette régulation et reste minoritaire dans la majorité du télencéphale, où sa fonction demeurait inconnue. Au cours de ma thèse, j'ai montré que KCC2a est en réalité un régulateur bidirectionnel de la stabilité de KCC2b, dont l'effet s'inverse au cours de la maturation neuronale. En utilisant la lignée murine délétée pour KCC2a (KCC2a KO), j'ai établi que cette isoforme est nécessaire à la phosphorylation de la thréonine 1007 (1006 chez la souris) de KCC2 par la voie WNK-SPAK dans les neurones immatures, une modification qui limite l'expression membranaire du transporteur. Dans les neurones matures, à l'inverse, KCC2a inhibe la poly-ubiquitination, l'endocytose médiée par la clathrine et la dégradation protéasomale de KCC2b, régulant ainsi sa stabilité protéique, son expression membranaire et sa fonction. Cette régulation est rendue possible par la localisation préférentielle de KCC2a dans les dendrites et au sein des agrégats de KCC2, des structures riches en KCC2b. Cette isoforme reste par ailleurs requise pour la régulation de KCC2b par la voie WNK-SPAK lorsque celle-ci est réactivée dans les neurones matures. Ainsi, bien que très minoritaire, KCC2a agit comme un interrupteur développemental : elle diminue initialement la stabilité de KCC2b lors du développement, puis assure sa stabilité protéique et membranaire pour soutenir l'inhibition synaptique dans le cerveau mature.

Enfin, j'ai étudié un type neuronal qui constitue une seconde exception à l'augmentation de l'expression de KCC2 : les cellules Cajal-Retzius. Ces neurones pionniers de la zone

marginale ne présentent pas d'augmentation développementale de l'expression de KCC2, conservent une réponse dépolarisante au GABA et disparaissent massivement par un phénomène d'apoptose après la naissance. Afin de tester si l'absence du transporteur contribue à leur mort cellulaire, j'ai mis au point des stratégies permettant l'expression de transgènes dans les neurones Cajal-Retzius hippocampiques, une population dont le ciblage restait un obstacle technique majeur. Ces outils ouvrent la voie à l'analyse causale du lien entre homéostasie du chlorure et survie neuronale au cours du développement.

Dans leur ensemble, mes travaux soulignent que la fonction de KCC2 au cours du développement cortical est multiple et contrôlée à la fois par son niveau d'expression protéique et par sa stabilité et son agrégation membranaires. Élucider ces mécanismes de régulation endogène ouvre des perspectives pour restaurer l'homéostasie du chlorure dans un contexte pathologique.

Abstract

Within the mature brain, fast synaptic inhibition is predominantly dependent on neuronal chloride influxes through GABA-A receptors. The neuron-specific potassium-chloride cotransporter KCC2, encoded by the *SLC12A5* gene, extrudes chloride from neurons and thus plays a pivotal role in the polarity of GABA transmission. Due to this central role in chloride homeostasis, alterations of KCC2 expression and function are associated with various neurological disorders including epilepsy. KCC2 expression, however, is not constant but progressively increases during neuronal maturation, thereby mediating a developmental shift in GABAergic signaling from depolarizing to hyperpolarizing. The temporal precision of this shift is essential and tightly regulated, as depolarizing GABA regulates a considerable number of processes during neuronal maturation. This developmental upregulation, however, is not universal: my thesis explores two exceptions to this paradigm, one isoform and one neuronal type.

In the brain, *SLC12A5* encodes two distinct neuronal isoforms, KCC2a and KCC2b. These proteins are formed using alternative promoters and first exons and differ only in their N-terminal domain. While KCC2b is developmentally upregulated and ensures the hyperpolarizing response to GABA in mature neurons, KCC2a escapes this regulation and its expression remains extremely low in most structures of the telencephalon, where its role remained unclear. During my PhD, I showed that KCC2a is in fact a bidirectional regulator of KCC2b stability, whose effect reverses along neuronal maturation. I demonstrated, using protein extracts from young KCC2a KO mouse brains, that this isoform is required for KCC2 threonine 1007 (1006 in mouse) phosphorylation by the WNK-SPAK pathway in immature neurons, a post-translational modification previously associated with reduced membrane expression and function. In mature neurons, conversely, KCC2a prevents KCC2b polyubiquitination as well as its subsequent clathrin-mediated endocytosis and proteasomal degradation, thereby ensuring its protein stability, membrane expression, and function. This tight regulation is made possible by the isoform preferential enrichment in neuronal structures associated with high KCC2b expression, namely dendrites and KCC2 clusters. KCC2a is also required for the decrease in KCC2b membrane expression triggered by re-activation of the WNK-SPAK pathway in mature neurons. Thus, despite its low abundance, KCC2a acts as a developmental switch: it first decreases KCC2b stability during development, and then ensures its protein and membrane expression to support synaptic inhibition in the mature brain.

Finally, I studied a neuronal type that represents a second exception to KCC2 upregulation: Cajal-Retzius cells. These pioneer neurons of the marginal zone lack the developmental upregulation of KCC2 and the ensuing GABA shift, therefore retaining a depolarizing response to GABA. Additionally, this neuronal type is subjected to a massive apoptosis wave after birth. To test whether the absence of the transporter contributes to their elimination, I developed strategies enabling transgene expression in hippocampal Cajal-Retzius cells, a population whose targeting remained a major technical obstacle. These tools pave the way for a causal analysis of the link between chloride homeostasis and neuronal survival during development.

Overall, my work highlights that KCC2 function during cortical development is multifaceted and is controlled both by its protein expression and by its membrane stability and clustering. Deciphering these endogenous regulatory mechanisms opens new avenues for restoring chloride homeostasis in various diseases.

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres du jury : Igor Medyna, Muriel Thoby-Brisson, Coralie Di Scala, Mathieu Letellier et Fiona Francis, pour avoir accepté d'évaluer mon travail. J'ai sincèrement hâte de pouvoir en discuter avec vous lors de ma soutenance.

Je remercie également Fiona Francis, Rebecca Piskorowski et Julien Bouvier pour avoir fait partie de mon comité de suivi de thèse et m'avoir aiguillée pendant plusieurs années. Vous m'avez conseillée de façon extrêmement bienveillante et vos nombreux conseils ainsi que les discussions que nous avons eues m'ont beaucoup aidée pour ma thèse et pour la préparation de la suite de ma carrière.

Une énorme partie de mes remerciements vont à toi, Jean-Christophe. Merci pour avoir accepté que je fasse ma thèse dans ton équipe et pour m'avoir encadrée pendant ces quatre ans et demi. J'ai sincèrement l'impression d'avoir traversé plusieurs décennies et plusieurs guerres à tes côtés et que tu as toujours fait partie de ma vie. Tu m'as énormément appris pendant ma thèse, sur des choses purement scientifiques mais aussi de façon plus générale sur la rigueur, l'encadrement, la façon de communiquer mes idées et mes projets. Je suis maintenant presque aussi maniaque que toi sur Adobe Illustrator … Tu m'as aussi beaucoup soutenue, conseillée et aidée dans la mise en place de projets qui me tenaient à cœur, même si tous n'ont pas été de grands succès. J'ai beaucoup aimé travailler avec toi car je pense qu'on partage beaucoup de particularités communes telles que le stress, l'incapacité à décrocher du labo (mais j'ai vu que tu y travaillais donc j'évite les messages le week-end !) et probablement un sens de l'humour assez similaire. L'ensemble de nos discussions scientifiques (ou pas) ont été extrêmement enrichissantes et j'admire énormément ta façon de réfléchir, d'exposer tes idées et tes connaissances dans des domaines très variés. Je suis très heureuse pour toi que tu aies pu construire l'équipe que tu voulais à l'ICM et que cette équipe roule parfaitement !

Avant de remercier toute l'équipe, je souhaite remercier quelques personnes qui ont été particulièrement importantes lors de ma thèse et qui m'ont énormément soutenue. Merci Mélina pour tous les super moments qu'on a passés au labo mais surtout en dehors du travail ! On a très clairement passé plus de temps à faire des restos, des expos et à papoter qu'à

travailler ensemble... Merci de m'avoir fait rencontrer tout un tas de personnes très sympas (coucou Virginie !) et de m'avoir soutenue tout au long de ce périple. Je suis sûre que tu vas parfaitement gérer la fin de ta thèse et l'analyse de toutes tes données de transcriptomique. Je suis extrêmement heureuse que cette thèse m'ait permis de te connaitre et il ne te reste plus qu'à venir me voir à Barcelone pendant ton voyage post-thèse (peu importe le thème du voyage !).

Je suis aussi très heureuse d'avoir passé deux ans (ou plus) avec vous, Esther et Capucine. Vous avez mis énormément de joie, de dynamisme et de bonne humeur en arrivant toutes les deux dans l'équipe. Vous avez grandement contribué à ce qu'on construise, pendant un an, une mini-équipe que j'ai trouvée absolument exceptionnelle. Merci Esther pour ton soutien, pour les concerts et les sorties qu'on a faits ensemble et pour la fameuse danse du poisson Steeve ! Merci Capucine pour m'avoir aussi beaucoup soutenue, pour les fous rires et les (nombreuses) sorties à Italie 2 ! Bon courage pour la fin de vos thèses, je sais que vous allez gérer !

Merci à l'ensemble de l'équipe actuelle, avec qui ça a été un réel plaisir de travailler depuis maintenant 1 an et dans laquelle il y a une ambiance exceptionnelle : Marianne, Séverine, Vincent, Aurélie, Aymard, Ludovic, Camila, Zineb, Brieg, Anthony, Maya, François, Quentin, Nuria, Martin, Louis, Valerio, Julie, Victor, Samara. Merci Aymard pour toujours faire goûter tes plats à tout le monde, Maya and Nuria for your kindness, Brieg et Anthony pour votre humour. La fusion de nos équipes n'aurait probablement pas pu mieux se passer et c'est vraiment dû à la gentillesse de chacun d'entre vous !

A huge thank you to the interns I had the chance to supervise: Océane, Rose and Beatrice. Thank you for your investment and your help with the projects, you really contributed to make them move forward. Special thanks to Beatrice, I really had a great time working with you, not only scientifically but also on a personal level (as we used to have very random, but great, conversations). You are both an amazing person and a great scientist! I have no doubt you will nail your PhD!

Thank you to the different people with whom we collaborated: Candela, Liset, Yoann, Alessandra, Fred, Matti and Marika, for your help, your feedback and the different conversations and meetings we had together. Merci beaucoup à toi Yoann, pour ta bonne humeur et pour m'avoir régulièrement accueillie dans ton équipe et avoir pris énormément de

temps pour m'apprendre les chirurgies in utero, les coupes au cryostat, comment écrire une DAP et tout un tas d'autres choses. Je n'aurais pas pu demander un meilleur prof de chirurgie !

Merci aux « anciens » des différentes équipes dont j'ai fait partie : Florian, Jeremy, Solen, Zaha, Anne-Lise. Merci beaucoup Florian pour ta gentillesse et pour m'avoir aidée et conseillée tout au long de ma thèse alors que tu ne travaillais plus au labo. A défaut d'avoir passé beaucoup de temps à travailler ensemble, j'ai passé de supers moments à découvrir San Francisco et Vienne avec toi !

Merci Jeremy pour ton humour, ta passion pour le patch et les cent mille photos que tu as pris de toi avec mon téléphone (et que j'ai toujours). Solen, pour ton soutien et pour les différentes sorties que l'on a faites ensemble. Zaha, pour ta bonne humeur, pour toutes les conversations qu'on a pu avoir et pour m'avoir formée à la stéréotaxie. Anne-Lise, pour ta gentillesse et ta bonne humeur.

Merci à l'ensemble des personnes de l'IFM pour leur gentillesse, pour m'avoir aidée, conseillée et pour m'avoir accueillie pendant l'écriture de ma thèse. Thank you very much Fiona for supporting me and advising me during all my PhD. It has always been a pleasure to exchange with you about my projects.

Merci à toutes les personnes qui font fonctionner cet institut, qui sont d'une grande gentillesse et qui ont tout mis en place pour pouvoir m'aider pendant ma thèse : Mythili, Alix, Patricia, Laure et toute l'équipe de l'animalerie : Baptiste, Gaël, Lola, Noémie, Eloise et Anna-Sophia.

Je souhaite aussi tout particulièrement remercier la Ferent's team et notamment à Tanya, Sara et Julien. Merci de m'avoir accueillie dans votre équipe quand ça allait et quand ça n'allait pas, de m'avoir prêté vos paillasses, dépannée pour tout un tas de produits, de m'avoir formée et aidée… Vous avez été d'une gentillesse incroyable. Merci Tanya pour ton soutien tout au long de nos thèses et pour toutes les discussions que l'on a pu avoir. J'ai passé de trop bons moments pendant nos colocs à Vienne et à Roscoff (il faudra qu'on refasse ça puisqu'on n'a pas pu faire celle pendant l'écriture à cause de moi). Je suis très heureuse d'avoir fait toute cette aventure à tes côtés et ma thèse n'aurai pas été la même si tu n'avais pas été là ! Merci Sara pour ta gentillesse et les très nombreux conseils que tu m'as donnés, tu as clairement sauvé plusieurs de mes manips ! Merci Julien pour m'avoir appris tout un tas de techniques,

m’avoir laissée squatter ton labo et pour avoir fait des points Adum avec moi ces dernières semaines.

Thank you to the Girardeau’s team: Izabela, Facundo, Eleonore, Azul, Tulio, Gabrielle, for all the good moments we had when we shared the first floor of the IFM (including the phenomenal Christmas dance) and for welcoming me during the writing of my thesis. Particular thanks to Izabela for your constant good mood and enthusiasm, you are the sunshine of the IFM and I am so happy I met you during this PhD! Thank you Facundo for supporting and advising me during all of my PhD, you are an amazing researcher, and I am sure you will be able to start your team soon!

Merci à mes amis de presque toujours, Camille et Baptiste, d’avoir été présents depuis bien avant cette thèse et de m’avoir écoutée me plaindre à l’infini. Même si ça fait plusieurs années que je vis loin de vous, tous les moments qu’on a passé ensemble m’ont fait extrêmement plaisir et m’ont aidée à décompresser.

Enfin, merci à ma famille : ma mère, mes frères et sœur, mes grands-parents, pour leurs encouragements et leur présence tout au long de mes études. Merci maman pour avoir toujours été d’un soutien indéfectible et pour m’avoir encouragée quoique je fasse dans la vie : pour partir seule en Inde, pour la prépa, pour partir vivre à Paris, pour la thèse et maintenant pour partir à Barcelone… Tu as toujours cru en moi, tu as tout fait pour moi et tu as soutenu tous mes projets ! Et merci d’avoir commencé à organiser mon pot de thèse littéralement 4 mois avant ma soutenance ! Merci à Enzo, Luna et Matéo, vous êtes tous les trois des frères et sœur incroyables et je suis très heureuse de vous avoir dans ma vie. Enfin, merci à mon grand-père, papi Angelo, pour toujours avoir tout fait pour moi : pour les vacances tous les étés dans le sud, pour avoir soutenu ma passion pour les chevaux et pour toutes les fois où on t’a embarqué dans nos aventures. Je sais que si tu avais encore été là, tu aurais gardé ma thèse chez toi et que tu l’aurais lue du début à la fin (surtout les petits schémas) même sans la comprendre.

Sommaire

Résumé ... 1
Abstract ... 3
Remerciements ... 5
Sommaire ... 9
Table des figures ... 12
Table des tableaux ... 13
Liste des abréviations ... 14
Introduction ... 21
Introduction générale ... 21
I. Expression, fonction et régulation de KCC2 ... 24
1. La famille des CCC ... 24
1.1. Phylogénie et diversité des CCC ... 24
1.2. Structure protéique et oligomérisation des CCC ... 26
a. Domaines de modifications post-traductionnelles ... 26
b. Domaines de transport des ions ... 28
c. Oligomérisation des CCCs ... 29
1.3. Profils d'expression des CCCs ... 30
1.4. Fonction des CCCs ... 34
a. Régulation de la concentration intracellulaire en chlorure ... 34
b. Régulation du volume cellulaire ... 35
c. Autres fonctions des CCCs ... 37
2. Expression de KCC2 ... 38
2.1. Structure du gène *Slc12a5* ... 38
2.2. Évolution développementale de l'expression de KCC2 ... 40
2.3. Expression de KCC2 dans le SNC adulte et en développement ... 43
2.4. Expression différentielle de KCC2 dans différents types de neurones matures ... 45
2.5. Expression subcellulaire de KCC2 dans les neurones immatures et matures du SNC ... 46
3. Fonctions de KCC2 dans les neurones matures ... 48
3.1. Rôle de KCC2 dans l'inhibition synaptique rapide ... 48
a. Généralités sur l'inhibition synaptique rapide ... 48
b. Méthodes d'étude de la fonction de transporteur de chlorure de KCC2 ... 49
c. Maintien de l'inhibition synaptique dans les neurones matures par KCC2 ... 54
d. Mise en place de l'inhibition synaptique au cours du développement ... 55
3.2. Fonctions de KCC2 qui découlent de son rôle de transporteur ... 58
a. Régulation du volume des neurones ... 59
b. Régulation de la survie des neurones matures ... 59
c. Régulation locale de $[K^+]_e$ au niveau des synapses excitatrices ... 61
3.3. Fonctions de KCC2 indépendantes de son rôle de transporteur ... 62
4. Régulation de KCC2 dans les neurones matures ... 64
4.1. Régulation transcriptionnelle ... 65
a. Régulation par le système RE-1/REST ... 65

b. Régulation par Egr4 ... 66
c. Régulation par le BDNF ... 67
d. Régulation par TGF-β2 ... 71
4.2. Régulation de l'expression membranaire ... 72
a. Exocytose ... 72
b. Oligomérisation, agrégation et diffusion membranaire ... 73
c. Endocytose ... 75
4.3. Dégradation de KCC2 ... 76
a. Dégradation par la voie lysosomale ... 77
b. Clivage par les calpaïnes ... 78
c. Dégradation par la voie ubiquitine/protéasome ... 79
4.4. Régulation post-traductionnelle ... 80
a. Phosphorylation par la voie WNK-SPAK/OSR1 ... 81
b. Phosphorylation par les protéine-kinases C (PKC) ... 85
c. Phosphorylation par les kinases de la famille des Src (SFK) ... 88

II. Fonctions spécifiques associées à KCC2 lors du développement ... 89

1. Rôles du *GABA shift* et de la réponse dépolarisante au GABA ... 89
1.1. La séquence GABA-Glutamate ... 90
a. Chronologie de l'expression des sous-unités des différents récepteurs synaptiques ... 90
b. Mise en place de synapses fonctionnelles ... 91
c. Activation précoce des récepteurs GABA-A extra-synaptiques ... 93
d. Le GABA dépolarisant entraine l'activation des canaux calciques voltage-dépendants 94
1.2. Rôle du GABA dépolarisant dans la prolifération, la migration et la maturation neuronale ... 95
a. Effet du GABA sur la prolifération des progéniteurs neuronaux ... 96
b. Effet du GABA sur la migration radiale et tangentielle ... 97
c. Effet du GABA sur la morphogénèse des neurones ... 99
1.3. Rôle du GABA dépolarisant dans la mise en place des réseaux neuronaux ... 103
a. Activation précoce des récepteurs NMDA et mise en place des synapses excitatrices 103
b. Formation et plasticité des synapses GABAergiques ... 104
c. Potentiels géants dépolarisants ... 106
2. Rôles de l'interaction entre KCC2 et le cytosquelette dans le développement ... 108
2.1. KCC2 est essentiel à la formation des épines dendritiques ... 108
2.2. KCC2 régule l'apoptose développementale des neurones de projection du néocortex ... 110
a. Vagues d'apoptose neurodéveloppementales ... 110
b. KCC2 inhibe l'apoptose des neurones corticaux de projection ... 112
3. Une exception notoire à l'augmentation développementale de l'expression de KCC2 : le cas des neurones Cajal-Retzius ... 113
3.1. Fonction des neurones Cajal-Retzius lors du développement ... 113
3.2. Origine et lignage des neurones Cajal-Retzius ... 115
3.3. Mécanismes régulant l'apoptose des neurones Cajal-Retzius ... 117
a. Les cellules Cajal-Retzius sont des neurones transitoires ... 117
b. L'apoptose des neurones Cajal-Retzius dépend de Bax et de l'activité neuronale ... 119
c. Les cellules Cajal-Retzius ne présentent pas de *GABA shift* ... 120

III. Rationnel et objectifs ... 124

Matériel et méthodes ... 127

MM.1 - Méthodes relatives à l'étude de la fonction de KCC2a ... 127

MM.2 - Méthodes relatives à l'analyse des déterminants de l'apoptose des neurones Cajal-Retzius 135

Résultats 143

Article principal : Contrôle différentiel de la fonction de KCC2 par KCC2a au cours de la maturation des neurones corticaux 143

Article 2 : Potentialiser la fonction de KCC2 réduit l'activité interictale et présente un effet antiépileptique dans le cadre d'épilepsies du lobe temporal 173

Résultats additionnels 215

Discussion 230

I. Mécanismes par lesquels KCC2a régule KCC2b 232

1. Régulation dans les neurones matures 232
   1.1. Mécanisme d'interaction entre les isoformes de KCC2 232
   1.2. Mécanisme de régulation de la stabilité de KCC2b 233
   1.3. Discordance entre les résultats *in vitro* et *ex vivo* 234
2. Régulation dans les neurones immatures 235
3. Mécanisme à l'origine du changement de régulation de KCC2b par KCC2a lors de la maturation neuronale 237

II. Implication de la régulation de KCC2b par KCC2a dans l'épilepsie et dans le développement de composés antiépileptiques 239

III. Implication de l'absence de KCC2 dans l'apoptose des neurones Cajal-Retzius 242

1. Surexprimer KCC2 dans les cellules Cajal-Retzius *in vivo* est un défi 242
   1.1. Problèmes liés à la lignée murine ΔNp73-Cre 242
   1.2. Problèmes liés aux virus 243
2. Méthodes alternatives pour étudier l'implication de l'absence de KCC2 dans l'apoptose des neurones Cajal-Retzius 245

Conclusion générale 248

Bibliographie 250

Table des figures

Introduction

Figure 1. Modèle simplifié de la régulation de la concentration en chlorure dans les neurones matures. 22
Figure 2. Structure des différentes sous-familles de co-transporteurs cation-chlorure. 28
Figure 3. Implication des co-transporteurs cation-chlorure dans la régulation du volume cellulaire et de la concentration en chlorure intracellulaire. 37
Figure 4. Structure du gène *Slc12a5* chez la souris. 40
Figure 5. Expression de KCC2a et KCC2b dans le cerveau adulte. 44
Figure 6. Comparaison de deux méthodes électrophysiologiques pour estimer la fonction de KCC2. 51
Figure 7. Modifications moléculaires à l'origine du *GABA shift*. 58
Figure 8. Modèle proposé pour expliquer la régulation de l'expression membranaire des récepteurs AMPA par KCC2. 64
Figure 9. Modèle de régulation transcriptionnelle de *Slc12a5* par le BDNF. 70
Figure 10. Régulation de la stabilité de KCC2 en fonction de l'activité neuronale. 77
Figure 11. La séquence GABA-Glutamate. 92
Figure 12. Effet différentiel du GABA pendant le neurodéveloppement. 102
Figure 13. Localisation des neurones Cajal-Retzius dans la formation hippocampique de souris adulte. 114
Figure 14. Apoptose développementale des neurones Cajal-Retzius corticaux et hippocampiques. 118
Figure 15. Voies potentielles mises en jeu dans l'apoptose physiologique des neurones Cajal-Retzius. 122

Résultats

Figure 1. L'infection virale *in utero* permet l'expression stable des transgènes dans les neurones Cajal-Retzius. 223
Figure 2. Comparaison de l'injection intraventriculaire de lentivirus *in utero* versus chez le nouveau-né pour infecter les cellules Cajal-Retzius. 225
Figure 3. Comparaison de l'efficacité de l'infection virale *in utero* avec deux lentivirus. 227

Table des tableaux

Introduction

Tableau 1. Profil d’expression des co-transporteurs cation-chlorure. 31
Tableau 2. Voies de kinases responsables de la phosphorylation de KCC2. 81
Tableau 3. Différents lignages de neurones Cajal-Retzius. 116

Matériel et méthodes

Tableau 4 : Virus utilisés pour les chirurgies. 137
Tableau 5 : Anticorps utilisés lors des expériences d’immunohistochimie. 139

Liste des abréviations

4.1N	Protéine 4.1 neuronale
86Rb	Isotope 86 du rubidium
AAV	Virus adéno-associé (adeno-associated virus)
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPA	Acide α-amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionique
AP-1	Activating enhancer-binding protein 1
AP-2	(1) Activating enhancer-binding protein 2; (2) Clathrin-binding adaptor protein-2
AP-5	Acide 2-amino-5-phosphonopentanoïque
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
APC	Superfamille protéique des transporteurs d'acides aminés, de polyamine et de choline (amino acid-polyamine-organocation)
ApoER2	Apolipoprotein-E receptor type 2
ARN(m)	Acide ribonucléique (messager)
ATPase	Adénosine triphosphatase
Bak	Bcl-2-antagonist/killer 1
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BDNF	Facteur neurotrophique dérivé du cerveau (brain-derived neurotrophic factor)
BO	Bulbe olfactif
BrdU	Bromodésoxyuridine
C1q	Complement component 1q
CA	Corne d'Ammon
CaMKII	Protéine kinase Ca^{2+}/calmoduline-dépendante de type II (Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II)
CCC	Co-transporteur cation-chlorure
CCVD	Canaux calciques voltage-dépendant
CDS	Séquence codante (coding DNA sequence)
CFP	Protéine fluorescente cyan (cyan fluorescent protein)
CGRa / CGRb	Cellule gliale radiale apicale / basale
CI	Colliculus inférieur
CIP1	Protéine interagissant avec les CCCs (CCC-interacting protein 1)
C_m	Capacité membranaire

CNQX	6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
coREST	Corépresseur de REST
COS	Complexe olivaire supérieur
CPSE / CPSI	Courant post-synaptique excitateur / inhibiteur
CR	Neurone Cajal-Retzius
Cre	Cre-recombinase
CREB	cAMP response element binding protein
CS	Colliculus supérieur
CTD	Domaine C-terminal (C-terminal domain)
CTX	Néocortex
Dab1	Disabled-1
DLT	Dépression à long terme
DNQX	6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione
DsRed	Protéine fluorescente rouge
E10.5, E15…	Jour embryonnaire
E1 / E2 / E3	Enzyme d'activation / de conjugaison / ligase de l'ubiquitine
E_{Cl^-}	Potentiel d'équilibre du chlorure
E_{GABA}	Potentiel d'inversion des courants au travers des récepteurs GABA-A
EGC / EGM	Eminence ganglionnaire caudale / médiale
EGFP	Protéine fluorescente verte amplifiée (enhanced green fluorescent protein)
Egr4	Early growth response 4 (NGFI-C)
ELTm	Epilepsie du lobe temporal mésial
EPPSI	Potentiel d'inversion des potentiels post-synaptiques inhibiteurs
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ERT2	Domaine de liaison modifié du récepteur aux œstrogènes (Estrogen Receptor T2)
EST	Marqueur de séquence exprimée (expressed sequence tag)
FAF1	Fas-associated factor 1
Fbxl4	F-box and leucine-rich repeat protein 4
FH	Fissure hippocampique
FLEX	Système d'expression conditionnelle dépendant de la Cre (flip-excision)
FLIM	Fluorescence lifetime imaging microscopy
FRET	Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (Förster resonance energy transfer)
GABA	Acide γ-aminobutyrique

GABA-A / -B / -C	Récepteur du GABA de type A / B / C
GAD67	Glutamate-décarboxylase 67
GD	Gyrus denté
GDP / GTP	Guanosine diphosphate / triphosphate
GEF	Facteur d'échange nucléotidique (guanine nucleotide exchange factor)
GFP	Green fluorescent protein
GluA1	Sous-unité 1 du récepteur AMPA
GluK2	Sous-unité 2 du récepteur kaïnate
GluN1/2/3	Sous-unités du récepteur NMDA
GPR39	Récepteur couplé aux protéines G (G protein-coupled receptor 39)
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GTPase	Guanosine triphosphatase
H	Hippocampe
HbS	Hémoglobine S (hémoglobine falciforme)
HDAC	Histone-désacétylase
HEK-293	Human embryonic kidney 293 cells
IAP	Inhibitor of apoptosis protein
IC_{50}	Concentration inhibitrice médiane
IO	Conformation ouverte à l'intérieur (inward-open)
IP3	Inositol trisphosphate
IRES	Site interne d'entrée du ribosome (internal ribosome entry site)
JNK	c-Jun N-terminal kinase
K2P	Canal potassique à deux pores
KCC	Co-transporteur potassium-chlorure
Kir2.1	Canal potassique à rectification entrante 2.1
KO	Knock-out
L1	Couche 1 du néocortex (layer 1)
LeuT	Transporteur de leucine
LIMK	LIM kinase
LV	Lentivirus
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
mBDNF	BDNF mature
MeCP2	Methyl-CpG-binding protein 2
MEK	Protéine kinase activée par les mitogènes (mitogen-activated protein kinase kinase)
MO25	Mouse protein 25
MQAE	N-(éthoxycarbonylméthyl)-6-méthoxyquinolinium bromide

NA	Noyau accumbens
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCC	Co-transporteur sodium-chlorure
Neto2	Neuropilin and tolloid-like 2
NFκB	Nuclear factor kappa B
NKCC	Co-transporteur sodium-potassium-chlorure
NMDA	Acide N-méthyl-D-aspartique
NPY	Interneurones à neuropeptide Y
NRP	Noyau réticulaire du pont
NRSE	Neuron-restrictive silencer element
NRSF	Neuron-restrictive silencer factor
OO	Conformation ouverte à l'extérieur (outward-open)
ORF	Cadre de lecture ouvert (open reading frame)
OSR1	Oxidative stress-responsive kinase 1
P0, P2…	Jour postnatal
p75NTR	Récepteur aux neurotrophines p75
P2A	Peptide auto-clivant 2A
PACSIN1	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 1 (SYNDAPIN1)
Pak1	p21-activated kinase 1
panKCC2	Anticorps reconnaissant les deux isoformes de KCC2
pb / kpb	Paire de bases / kilopaire de bases
PCPZ	Prochlorpérazine
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne (polymerase chain reaction)
PGD	Potentiel géant dépolarisant
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKA / PKC	Protéine kinase A / protéine kinase C
PLCγ	Phospholipase C γ
PLT	Potentialisation à long terme
PP1 / PP2A / PP2B	Protéine phosphatase 1 / 2A / 2B (PP2B = calcineurine)
PPSE / PPSI	Potentiel post-synaptique excitateur / inhibiteur
proBDNF	Précurseur du BDNF
PROTAC	Chimère ciblant la protéolyse (proteolysis-targeting chimaera)
PTZ	Pentylènetétrazole
PV	Interneurone à parvalbumine
Pyr	Neurone pyramidal

Rab11 / Rab11b	Ras-related protein 11 / 11b
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RE	Réticulum endoplasmique
RE-1	Repressor element 1
R_{in}	Résistance d'entrée
REST	Repressor element 1 silencing transcription factor
RVD / RVI	Mécanisme de diminution / d'augmentation du volume cellulaire (regulatory volume decrease / increase)
SCF	Complexe d'ubiquitine ligase E3 Skp1-Cullin 1-F-box protein
SCG	Strate des cellules en grain
SE	*Status epilepticus*
SFK	Kinase de la famille des Src (Src family kinase)
shARN	ARN court en épingle à cheveux (Short hairpin RNA)
shmiARN	ARN court en épingle à cheveux dans une structure de microARN (Short hairpin microRNA)
SK	Canal potassique de faible conductance activé par le calcium
SLC	Transporteur de solutés (solute carrier)
SLM	Strate lacuneuse moléculaire
Smac/DIABLO	Second mitochondria-derived activator of caspases / direct IAP-binding protein with low pI
SME	Strate moléculaire externe
SN	Substance noire
SNAP23 / SNAP25	Synaptosomal-associated protein 23 / 25
SNARE	Soluble NSF attachment protein receptor
SNC	Système nerveux central
SOS	Son of sevenless
SP	Strate pyramidale
Sp1	Specificity protein 1
SPAK	SPS1-related proline/alanine-rich kinase
Sst	Interneurone à somatostatine
SYNDAPIN1	Synaptic dynamin-associated protein 1 (PACSIN1)
Task-3	TWIK-related acid-sensitive K^+ channel 3
TetOn	Système d'expression inductible par les tétracyclines
TGF-β2	Transforming growth factor β2
TNF	Tumor necrosis factor
TO	Tubercule olfactif
TrkB	Tropomyosin receptor kinase B

TSS	Site d'initiation de la transcription (transcription start site)
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
TWIK	Tandem of P domains in a weak inward rectifying K^+ channel
TβR1/2/3	Récepteurs du TGF-β de type 1 / 2 / 3
UniProt	Universal Protein Resource
V	Ventricule
VII	Noyau somato-moteur du nerf facial
VGAT	Transporteur vésiculaire du GABA
VLDLR	Very low density lipoprotein receptor
Vm	Potentiel de membrane
WNK	With-no-lysine (K) kinase
Wnt3a	Wingless-type MMTV integration site family member 3A
WT	Wild-type
YFP	Yellow fluorescent protein
ZV / ZSV	Zone ventriculaire / zone sous-ventriculaire
β-PIX	PAK-interacting exchange factor β (ARHGEF7)
ΔNTD	Délétion du domaine N-terminal
T_m	Constante de temps de la membrane
$[ion]_i$ / $[ion]_e$	Concentration intracellulaire / extracellulaire en ion

Introduction

Introduction générale

Dans le système nerveux central, les neurones encodent différentes informations sous forme de signal électrique, et communiquent entre eux par le biais de synapses. Les synapses sont des structures au niveau desquelles les neurones sont particulièrement proches, elles permettent la conversion d'un signal électrique à un signal chimique puis inversement. Lors de la propagation d'un potentiel d'action dans le bouton pré-synaptique, la dépolarisation locale du potentiel de membrane provoque l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants, entrainant une entrée de calcium à l'extrémité de l'axone (Dolphin & Lee, 2020). Le calcium active l'exocytose des vésicules présynaptiques contenant les neurotransmetteurs ce qui provoque la libération de ces derniers dans la fente synaptique (Dolphin & Lee, 2020). Les neurotransmetteurs se fixent alors à leurs récepteurs au niveau de la membrane post-synaptique et les activent.

La transmission synaptique rapide est médiée par des récepteurs dits ionotropiques, dont l'activation provoque des flux d'ions à travers leur canal. Au niveau des synapses excitatrices, l'activation des récepteurs du glutamate, tels que les récepteurs à l'α-amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate (AMPA) et à l'acide N-méthyl-D-aspartique (NMDA) entraine un influx de cations dans le compartiment post-synaptique (Traynelis et al., 2010). Cela provoque la dépolarisation de son potentiel de membrane, un phénomène appelé potentiel post-synaptique excitateur (Traynelis et al., 2010). Au niveau des synapses inhibitrices, l'activation des récepteurs de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA-A) et de la glycine provoque un influx de chlorure (et un faible efflux d'ions bicarbonate) dans le compartiment post-synaptique (Farrant & Kaila, 2007; Mizzi & Blundell, 2025). Cela entraine, à l'inverse, l'hyperpolarisation du potentiel de membrane du compartiment post-synaptique, aussi appelée potentiel post-synaptique inhibiteur (Farrant & Kaila, 2007; Mizzi & Blundell, 2025). Les potentiels post-synaptiques reçus par les différentes synapses d'un neurone lors d'une fenêtre temporelle sont sommés (Purves et al., 2001). Lorsque leur somme génère une dépolarisation supérieure à une valeur seuil, ils initient un potentiel d'action (Purves et al., 2001). Au cours de ma thèse, je me suis essentiellement intéressée aux synapses GABAergiques.

La polarité des flux au travers des récepteurs ionotropiques dépend de la différence entre le potentiel de repos du neurone et le potentiel d'équilibre des ions concernés. Le potentiel d'équilibre du chlorure étant relativement proche du potentiel de membrane chez les neurones

matures, il suffit de faibles variations de la concentration intra-neuronale de cet ion pour induire un changement de polarité de son flux au travers des récepteurs GABA-A (Biscoe & Duchen, 1985; Tyzio et al., 2008). Par conséquent et de façon simplifiée, la concentration du chlorure dans les neurones est précisément régulée par deux transporteurs cation-chlorure, KCC2 et NKCC1 (Blaesse et al., 2009; Gamba, 2005). Ces deux protéines utilisent respectivement le gradient de potassium ou de sodium établi par la pompe Na^+/K^+ ATPase pour financer énergétiquement l'export ou l'import de chlorure (Blaesse et al., 2009; Gamba, 2005; Figure 1).

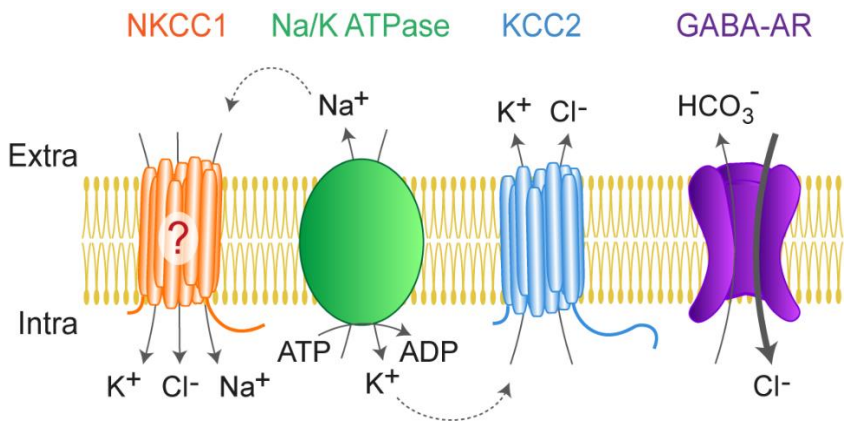


Figure 1. Modèle simplifié de la régulation de la concentration en chlorure dans les neurones matures.

NKCC1 (dont la présence dans les neurones matures est débattue) utilise le gradient de sodium établi par la pompe Na+/K+ ATPase afin d'importer le chlorure dans les neurones tandis que KCC2 utilise le gradient de potassium établi par cette même pompe pour exporter le chlorure des neurones. Dans les neurones matures, la faible concentration intracellulaire en chlorure est à l'origine d'un flux entrant de l'ion lorsque les récepteurs GABA-A sont activés. Adapté à partir de Kaila et al., 2014.

Les neurones immatures sont caractérisés par une forte expression de NKCC1 et une expression relativement faible de KCC2 (Kurki et al., 2023; H. Li et al., 2002; Rivera et al., 1999). Ils présentent donc une concentration intracellulaire en chlorure relativement élevée et l'activation de leurs récepteurs GABA-A entraine l'efflux de cet ion, à l'origine de la dépolarisation de leur potentiel de membrane (Kirmse et al., 2015; Rivera et al., 1999). Après la naissance, chez les rongeurs, il y a une augmentation progressive de l'expression de KCC2 tandis que celle de la forme neuronale de NKCC1 stagne, voire diminue (Kurki et al., 2023; Rivera et al., 1999). Les neurones matures présentent ainsi une concentration en chlorure particulièrement faible, à l'origine de l'hyperpolarisation de leur potentiel de membrane lorsque leurs récepteurs GABA-A sont activés (Rivera et al., 1999, Figure 1). Ce changement de la réponse des neurones au GABA, appelé *GABA shift*, repose principalement sur le changement d'expression de KCC2 et est régulé par divers mécanismes (Ben-Ari, 2002; Friedel et al., 2015;

Tyzio et al., 2006). Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à deux exceptions à cette augmentation développementale de l'expression de KCC2 que je vais maintenant détailler.

Le gène *SLC12A5* code pour deux isoformes distinctes du transporteur de chlorure, appelées KCC2a et KCC2b, qui diffèrent par leur domaine N-terminal (Uvarov et al., 2007). Tandis que l'expression de KCC2b augmente fortement lors du développement et sous-tend le *GABA shift*, celle de KCC2a varie relativement peu (Uvarov et al., 2007, 2009). KCC2a est donc très largement minoritaire dans la majorité du cerveau adulte et notamment dans le néocortex et l'hippocampe (Uvarov et al., 2007, 2009). Par conséquent, sa fonction n'a que très peu été étudiée.

D'un point de vue moléculaire, KCC2a forme des dimères avec KCC2b *in vitro* et *ex vivo* et présente la capacité de transporter le chlorure (Markkanen et al., 2014; Uvarov et al., 2007, 2009). Cette isoforme est aussi caractérisée par la présence d'un domaine de liaison de la kinase SPAK (SPS1-related proline/alanine rich kinase) localisé son domaine N-terminal, qui est absent de la séquence de KCC2b (Uvarov et al., 2007). Cela lui permet d'interagir structurellement avec SPAK lorsqu'elle est exprimée dans un système hétérologue (Markkanen et al., 2017; Uvarov et al., 2009).

Les animaux issus d'une lignée murine délétée pour KCC2a présentent une altération transitoire de la régulation de leur respiration lors de la période néonatale (Dubois et al., 2018). Cela souligne que KCC2a joue un rôle majeur dans l'inhibition du tronc cérébral après la naissance, une structure dans laquelle elle présente une expression élevée (Uvarov et al., 2007, 2009). Plusieurs études suggèrent aussi que KCC2a pourrait avoir une fonction importante, et potentiellement indépendante de son rôle de transporteur, dans le télencéphale. En effet, des patientes atteintes du syndrome de Rett, une maladie neurodéveloppementale caractérisée par une déficience intellectuelle sévère, présentent une altération de l'expression transcriptionnelle de KCC2a, mais pas de KCC2b, au niveau du cortex (Hinz et al., 2019). Additionnellement, des poissons-zèbres délétés pour *kcc2a* semblent présenter une altération de leurs capacités mnésiques et de leurs interactions sociales (Naderi et al., 2024). Il est néanmoins utile de noter que chez cette espèce, *kcc2a* est codé par un gène distinct de *kcc2b* (Naderi et al., 2024). KCC2a pourrait donc avoir une fonction spécifique dans le néocortex et l'hippocampe, des structures dans lesquelles elle est particulièrement peu exprimée à l'âge adulte.

L'étude de la fonction de KCC2a au cours du développement à fait l'objet de la plus grande partie de mon travail de thèse. J'ai tout d'abord analysé le niveau d'expression et la localisation

de cette isoforme dans des neurones en culture. Puis j'ai examiné l'effet de la perte de son expression dans les neurones immatures et matures. Ces résultats seront présentés sous forme d'un article scientifique.

Les cellules Cajal-Retzius font partie des quelques rares types de neurones à ne pas présenter d'augmentation de l'expression de KCC2b au cours du développement (Pozas et al., 2008; Szrinivasan et al., 2025). Ils sont aussi caractérisés par une apoptose activité-dépendante massive lors de la période post-natale (Ledonne et al., 2016; Riva et al., 2019). Celle-ci est inhibée lorsqu'une réponse hyperpolarisante au GABA est instaurée chez ces neurones par le biais de l'inhibition de NKCC1 (Blanquie et al., 2016). Cela suggère que l'absence d'augmentation de l'expression de KCC2b pourrait être à l'origine de l'apoptose des neurones Cajal-Retzius mais cela n'a jamais été étudié. Pendant ma thèse, j'ai développé différentes techniques d'infection virale *in utero* afin de tester cette hypothèse. Les expériences réalisées dans le cadre de ce projet seront présentées sous-forme de résultats additionnels. Avant de présenter plus en détail les projets qui constituent ma thèse, j'introduirai les concepts suivants : I) l'expression, la fonction et la régulation de KCC2, et II) les fonctions spécifiques associées à ce transporteur lors du neurodéveloppement.

I. Expression, fonction et régulation de KCC2

1. La famille des CCC

1.1. Phylogénie et diversité des CCC

KCC2 appartient à la famille des co-transporteurs cation-chlorure (CCC) codés par les gènes *Slc12a1-9* chez les Mammifères (Blaesse et al., 2009). La majorité des CCC sont des protéines membranaires qui modulent le transport de chlorure, de potassium et/ou de sodium de part et d'autre des membranes cellulaires (Blaesse et al., 2009; Gamba, 2005). Ils jouent un rôle essentiel dans la régulation de la concentration intracellulaire en chlorure, la régulation du volume cellulaire et la réabsorption transépithéliale des ions (Blaesse et al., 2009; Gamba, 2005), comme nous le verrons dans la partie I.1.4. La famille des CCCs appartient à la superfamille protéique des transporteurs d'acides aminés, de polyamine et de choline (APC) et à la série des transporteurs de solutés (SLC) (Arroyo et al., 2013; Prakash et al., 2003). Elle se subdivise en quatre sous-familles sur la base de leur homologie de séquence, leur structure tertiaire et quaternaire ainsi que leur fonction (Blaesse et al., 2009; Gamba, 2005). Les quatre sous-familles de CCCs comprennent les co-transporteurs couplés au sodium, qui incluent les transporteurs sodium-potassium-chlorure Na^+-K^+-Cl^- (NKCCs, *Slc12a1-2*) et sodium-chlorure Na^+-Cl^- (NCC, *Slc12a3*), les co-transporteurs potassium-chlorure K^+-Cl^- (KCCs, *Slc12a4-7*)

ainsi que deux sous-familles supplémentaires dont le rôle est moins bien défini (Blaesse et al., 2009; M. Gagnon et al., 2013; Gamba, 2005). Ces deux dernières sous-familles comprennent chacune une unique protéine : le transporteur de polyamine (CCC9, *Slc12a8*) et une protéine interagissant avec les CCC (CIP1, *Slc12a9*) (Blaesse et al., 2009; M. Gagnon et al., 2013; Gamba, 2005).

L'expression des NKCCs et de NCC chez certaines espèces d'Archées suggère que les CCCs sont apparus particulièrement tôt lors de l'évolution, avant l'émergence des Eucaryotes, aujourd'hui estimée aux alentours de 1,8 à 2,1 milliards d'années (A.-M. Hartmann et al., 2014). Nous supposons aujourd'hui que les sous-familles de CCCs ont été formées par trois duplications au cours de l'évolution, chacune suivie par une néo-fonctionnalisation ou subfonctionnalisation (i.e. acquisition d'une nouvelle fonction ou partage de la fonction initiale entre les deux gènes formés) des paralogues créés (A.-M. Hartmann et al., 2014). Une duplication initiale chez les Archées aurait séparé CCC9 de l'ancêtre commun du reste des CCCs et deux duplications chez les Eucaryotes auraient successivement séparé les NKCCs/NCC de l'ancêtre commun des KCCs et CIP1 pour la première, puis séparé les KCCs et CIP1 pour la seconde (A.-M. Hartmann et al., 2014). Ainsi, les NKCCs et NCC sont les sous-familles présentant le plus de similarités avec 50% d'homologie entre leurs séquences protéiques prédites chez l'Homme (Gamba, 2005). Les NKCCs/NCC présentent quant à elles 20% d'homologie avec les KCCs/CIP1 tandis que CCC9 a 19% d'homologie avec le reste des CCCs (Gamba, 2005). L'absence de certaines sous-familles chez différents groupes taxonomiques (absence de NKCCs et NCCs chez les plantes, mycètes et Choanoflagellés, absence de KCCs chez les mycètes) suggère que ces duplications ont été suivies de pertes indépendantes de certaines sous-familles au sein de différents groupes taxonomiques (A.-M. Hartmann et al., 2014). L'émergence de paralogues au sein des sous-familles des KCCs et NKCCs est attribuée à la succession de deux processus de duplication du génome entier peu après l'apparition des Vertébrés (Dehal & Boore, 2005; A.-M. Hartmann et al., 2014; D. Yu et al., 2024). Enfin, l'ensemble des gènes de la famille *Slc12a* génère plusieurs transcrits via un processus d'épissage alternatif (Blaesse et al., 2009). Ces transcrits codent pour différentes protéines, appelées isoformes, qui représentent un niveau supplémentaire de diversité protéique au sein des CCCs et présentent diverses structures et fonctions ainsi que différents domaines d'expression (voir Tableau 1; Castrop & Schnermann, 2008; Gamba et al., 1994; Garneau et al., 2019).

1.2. Structure protéique et oligomérisation des CCC

Les CCCs sont des glycoprotéines à poids moléculaire élevé (120-200 kDa) dont la majorité sont des transporteurs d'ions exprimés à la membrane plasmique (Blaesse et al., 2009). La structure protéique tertiaire des monomères de CCCs a d'abord été prédite par l'analyse du profil d'hydrophobicité de leur séquence d'acides aminés. Ces expériences ont permis d'identifier que l'ensemble des CCCs, à l'exception de CCC9, sont constitués de douze domaines transmembranaires hydrophobes ainsi que de larges domaines N- et C-terminaux cytosoliques (Gamba, 2005; Figure 2). Par la suite, la cristallographie ainsi que la cryo-microscopie électronique à particule unique ont permis d'élucider la structure de NKCC1, NCC ainsi que de l'ensemble des KCCs à plus haute résolution (X. Chi et al., 2021; S. Liu et al., 2019; Nan et al., 2022; Xie et al., 2020; S. Zhang et al., 2021). Cela a notamment permis d'identifier les sites de régulation post-traductionnelle des CCCs, dont de nombreux sites de phosphorylation au niveau de leurs domaines N- et C-terminaux impliqués dans la régulation de leur fonction.

a. Domaines de modifications post-traductionnelles

Les NKCCs et NCC sont très similaires structurellement et sont formés d'une boucle hydrophile extracellulaire contenant deux (NKCCs) ou trois (NCC) sites de N-glycosylation entre leurs domaines transmembranaires 7 et 8 (Gamba, 2005). Ils présentent plusieurs sites de phosphorylation au niveau de leur extrémité N-terminale, notamment phosphorylés par les kinases SPAK (SPS1-related proline/alanine rich kinase) et OSR1 (oxidative stress-responsive kinase 1) mais aussi par les protéines kinases A et C (PKA et PKC) dans le cas de NKCC2 (Gamba, 2005). En particulier, les thréonines localisées à l'extrémité N-terminale de NKCC1, NKCC2 et NCC sont phosphorylées par la voie WNK (WNK lysine-deficient protein kinase)-SPAK/OSR1 et sont relativement conservées (K. B. E. Gagnon et al., 2007; Richardson et al., 2008, 2011). Ces trois protéines partagent aussi une séquence consensus de fixation des kinases SPAK/OSR1 (RFXV/I) localisée à leur extrémité N-terminale (K. B. E. Gagnon et al., 2007; Piechotta et al., 2002; Richardson et al., 2008, 2011).

Les KCCs sont constitués d'une boucle hydrophile extracellulaire contenant entre 4 et 6 sites de N-glycosylation entre leurs domaines transmembranaires 5 et 6 (Agez et al., 2017; Kok & Brodsky, 2024; Weng et al., 2013). Ils présentent un nombre de domaines de (dé)phosphorylation variable mais globalement élevé (Kok & Brodsky, 2024). Certains résidus, notamment ceux phosphorylés par la voie WNK-SPAK/OSR1, sont conservés entre les différents KCCs. C'est notamment le cas des thréonines 926/906/991/926 et

983/1007/1048/980, présents chez l'ensemble des KCCs (respectivement KCC1/2/3/4) ou encore des thréonines 5 et 6, conservées chez KCC1, KCC2a et KCC4 (De Los Heros, 2018; article rétracté, voir fin paragraphe : de los Heros et al., 2014; Rinehart et al., 2009). KCC2 contient un nombre particulièrement élevé de sites de phosphorylation. Ces sites sont (dé)phosphorylés par différentes familles de kinases et phosphatases dont : SPAK/OSR1 (Thr6, Thr906, Thr1007 chez le rat/1006 chez la souris), PKC/PP1 (Ser940) et SFK (Tyr903, Tyr1087 chez le rat/1086 chez la souris) (A.-M. Hartmann & Nothwang, 2022). L'un des articles portant sur ce sujet (de los Heros et al., 2014) a récemment été rétracté pour cause de manipulation de données de Western blots dans les figures 3 à 7. Néanmoins, les informations portant sur la capacité de SPAK et OSR1 à phosphoryler les différents KCCs, sur l'identification des sites de phosphorylation et sur le développement d'anticorps reconnaissant les protéines phosphorylées semblent fiables et ont été confirmées par différentes autres études (Cordshagen et al., 2018; A.-M. Hartmann & Nothwang, 2022; Weber et al., 2014). Nous reviendrons plus en détail sur la régulation post-traductionnelle de KCC2 dans la partie I.4.4.

De façon surprenante, les CCCs ne présentent pas de séquence stricte de fixation des kinases SPAK/OSR1 chez la souris. Certaines isoformes de KCC2 (KCC2a) et de KCC3 (KCC3a) sont dotées d'un motif de type (RFXV/I) localisé dans leur domaine N-terminal dont les séquences sont respectivement RFTV et RFMV (Piechotta et al., 2002 ; NCBI Ref Seq). Il a été démontré que ce domaine permet l'interaction de SPAK avec ces deux protéines (Markkanen et al., 2017; Piechotta et al., 2002). KCC1/KCC3b et KCC4 sont dotées de séquences moins conservées, respectivement HFTV et NFTV (Piechotta et al., 2002 ; NCBI Ref Seq). Tandis que cette séquence permet l'interaction de SPAK avec KCC3b, la kinase ne semble pas interagir avec KCC1 et KCC4 (Piechotta et al., 2002).

La protéine CIP1 présente une structure proche de celle des KCCs avec notamment une boucle hydrophile extracellulaire entre ses domaines transmembranaires 5 et 6 qui contient deux domaines de N-glycosylation (Gamba, 2005). Elle ne semble cependant pas être un transporteur mais plutôt une protéine interagissant et régulant NKCC1 et KCC2 (Caron et al., 2000; Gamba, 2005; Wenz et al., 2009). CCC9 est la protéine présentant le moins de similarités avec le reste des CCCs. Il s'agit en effet d'une protéine relativement courte (714 acides aminés) avec 11 domaines transmembranaires et un domaine C-terminal réduit, localisé dans le compartiment extracellulaire (Gamba, 2005). CCC9 semble présenter une fonction de transporteur de polyamines et de mononucléotides nicotinamide mais son rôle est encore débattu (Daigle et al., 2009; Grozio et al., 2019).

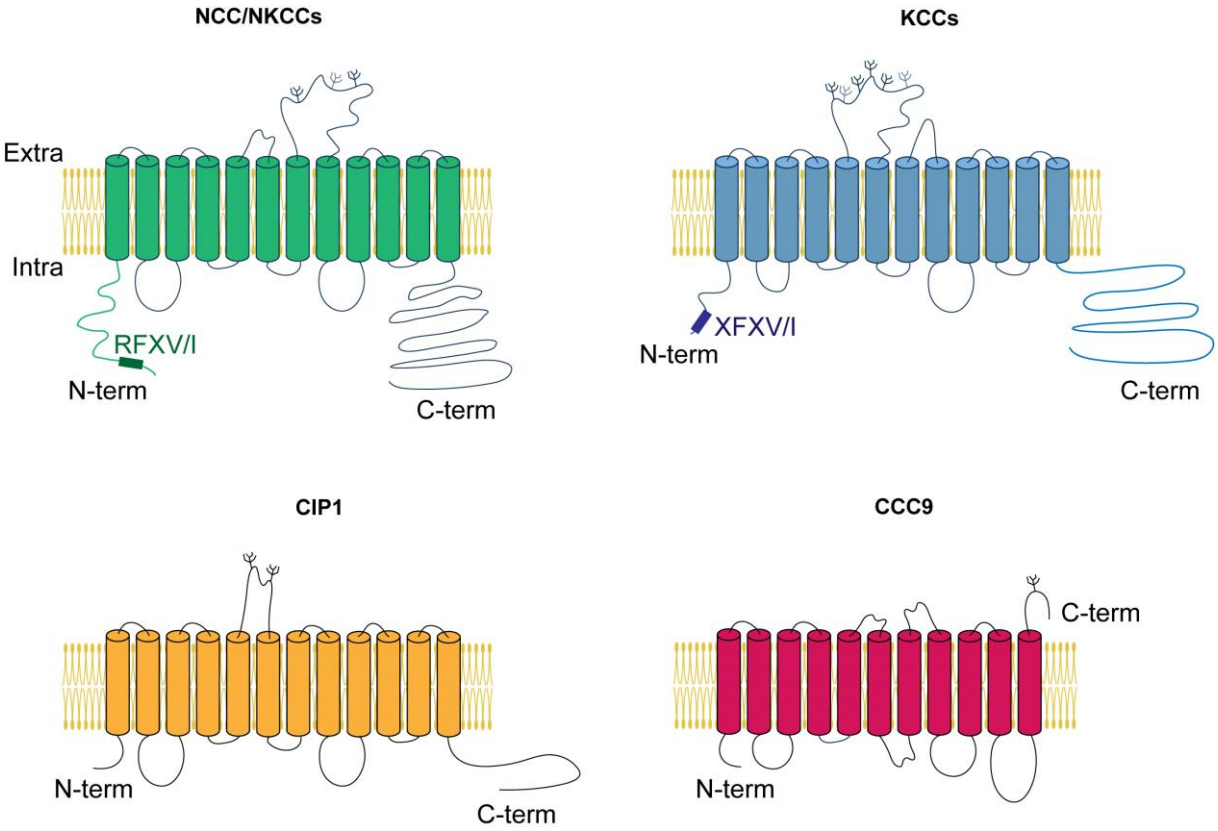


Figure 2. Structure des différentes sous-familles de co-transporteurs cation-chlorure.

Les domaines intracellulaires colorés représentent les régions majoritairement phosphorylées des protéines. Les boîtes colorées représentent le domaine de fixation des kinases SPAK et OSR1 (XFXV/I). Les fourches présentes sur les boucles extra-cellulaires représentent les domaines de N-glycosylation.

b. Domaines de transport des ions

Plusieurs études de mutagénèse dirigée et de cryo-microscopie électronique ont permis d'identifier les domaines de liaison des ions aux CCCs ainsi que les acides aminés responsables de la coordination de leur transport. Les différents ions se fixent chacun à un site qui leur est propre au sein du transporteur, qui est généralement une poche formée par plusieurs domaines transmembranaires (X. Yang et al., 2020; S. Zhang et al., 2021; Y. Zhao et al., 2022). Il a aussi été mis en évidence que les domaines transmembranaires des CCCs présentent un repliement similaire à celui du transporteur de leucine (LeuT) (Yamashita et al., 2005). Ce repliement, sous forme de deux motifs à symétrie inversée composés de cinq hélices transmembranaires, semble permettre la transition du transporteur entre un état ouvert à l'extérieur (outward-open, OO) et un état ouvert à l'intérieur (inward-open, IO) (Portioli et al., 2021; Yamashita et al., 2005). L'alternance entre ces deux conformations permettrait l'exposition des sites de liaison des ions du transporteur au milieu intra- et extracellulaire ainsi que la circulation des ions de part et d'autre de la membrane plasmique (Portioli et al., 2021;

Yamashita et al., 2005). Le domaine N-terminal des KCCs présente aussi une fonction d'auto-inhibition du transport ionique. En effet, il contient un peptide qui s'insère entre les domaines transmembranaire 1, 5, 6 et 8 du transporteur, le bloquant ainsi en conformation "ouvert à l'intérieur" et empêchant les ions d'accéder à leur site de liaison (A.-M. Hartmann & Nothwang, 2022; Xie et al., 2020; S. Zhang et al., 2021). Bien que la présence de ce peptide ait été démontrée pour KCC2 et KCC4, elle reste débattue concernant KCC1 et KCC3 (Xie et al., 2020; Zhang et al., 2021).

c. Oligomérisation des CCCs

L'ensemble des CCCs, à l'exception de CIP1 et CCC9, sont majoritairement exprimés à la membrane plasmique sous forme d'oligomères et notamment de dimères (Blaesse et al., 2006; Fan et al., 2023; Moore-Hoon & Turner, 2000; Simard et al., 2007; Y. Zhao et al., 2022). Les structures disponibles suggèrent que la dimérisation des CCCs pourrait jouer un rôle dans leur capacité de transporteur mais la contribution de l'oligomérisation à leur fonction reste à élucider (S. Zhang et al., 2021). Ainsi, l'ensemble des NKCCs, NCC et KCCs forment des homodimères (Blaesse et al., 2006; Moore-Hoon & Turner, 2000), et certains présentent en plus la capacité d'interagir entre eux pour créer des hétérodimères (Ding et al., 2013; Simard et al., 2007). En effet, des tests d'interaction protéique de type double hybride chez la levure, associés à des expériences de co-immunoprécipitation sur des protéines d'oocytes individuellement injectés avec de l'ARN codant pour des protéines de fusion c-myc-KCC ont permis de mettre en évidence l'existence d'hétérodimères NKCC1-KCC4, KCC2-KCC4 et KCC2-KCC3 (Ding et al., 2013; Simard et al., 2007) tandis que NKCC1 et NKCC2 ne semblent pas interagir entre eux (Parvin et al., 2007). Il est toutefois important de noter que les études sur l'hétérodimérisation CCCs ont essentiellement été réalisées dans des systèmes hétérologues (oocytes, levures, HEK-293, etc.), elles démontrent donc que les protéines ont la capacité d'interagir si elles sont exprimées conjointement dans certains organismes modèles mais pas nécessairement qu'elles interagissent de façon endogène. En effet, pour cela il faut que les deux partenaires soient exprimés dans le même type cellulaire et que leur régulation post-traductionnelle respective dans ce type cellulaire n'empêche pas leur interaction.

Les co-transporteurs cation-chlorure présentent une forte conservation globale de leur structure dimérique. Au sein des dimères de CCCs, les monomères interagissent entre eux via leurs domaines transmembranaires 11 et 12 qui sont en position apposée et inversée (Xie et al., 2020; X. Yang et al., 2020; S. Zhang et al., 2021). Le domaine C-terminal des monomères, organisé en un arrangement d'hélices alpha et feuillets beta est aussi impliqué

dans la dimérisation et joue un rôle essentiel dans la régulation de l'activation des CCCs (Xie et al., 2020; S. Zhang et al., 2021). Le domaine C-terminal d'une sous-unité est attaché au domaine transmembranaire de l'autre sous-unité au niveau de la surface intracellulaire de la membrane plasmique (Xie et al., 2020; X. Yang et al., 2020; S. Zhang et al., 2021). Il est supposé qu'à l'état inactif, les dimères de CCCs sont dans une conformation ouverte à l'intérieur (IO) avec leurs domaines transmembranaires 11 et 12 apposés et inversés et leurs domaines C-terminaux qui interagissent entre eux (S. Zhang et al., 2021). L'activation serait associée à un déplacement du domaine transmembranaire 12 de chacun des monomères et à une dissociation des domaines C-terminaux (S. Zhang et al., 2021). Ainsi, le modèle qui est aujourd'hui proposé pour expliquer le lien entre la structure et la fonction des dimères de CCCs est le suivant. Chez les KCCs, la phosphorylation des domaines C-terminaux des monomères entraine leur interaction qui, ajoutée à la liaison de l'extrémité N-terminale auto-inhibitrice de chaque monomère avec les domaines transmembranaires 1, 5, 6 et 8, inactive le dimère (Xie et al., 2020; S. Zhang et al., 2021). A l'inverse, la déphosphorylation et la séparation des domaines C-terminaux permet l'interaction entre le domaine N- et C-terminal de chaque monomère. Cela entraine la libération du pore et active le dimère (S. Zhang et al., 2021). Chez les NKCCs (et probablement NCC), la déphosphorylation des domaines N-terminaux entraine leur positionnement dans le domaine intracellulaire qui, associé à l'interaction des domaines C-terminaux entre eux, entraine l'inhibition du transport d'ions (S. Zhang et al., 2021). A l'inverse, la phosphorylation des domaines N-terminaux provoque leur interaction avec leur domaine C-terminal respectif ainsi que la séparation des extrémités C-terminales, ce qui active le dimère (S. Zhang et al., 2021).

1.3. Profils d'expression des CCCs

Bien que les CCCs soient relativement similaires dans leur structure protéique, ils présentent des profils d'expression bien distincts dans l'organisme (Tableau 1). Nous allons notamment nous intéresser ici à l'expression protéique des CCCs : si leur expression est mesurée relativement à leur niveau d'ARN messager (ARNm), cela sera clairement explicité. Chez les Mammifères, NCC et NKCC2 sont tous les deux presque exclusivement exprimés dans les reins. NCC est exprimé au niveau de la membrane apicale des cellules du tube contourné distal (Bostanjoglo et al., 1998; Obermuller et al., 1995). Chez l'Homme, l'ARNm de NCC est aussi présent dans les tubules connecteurs des reins (Obermuller et al., 1995). NKCC2 est exprimé au niveau de la membrane apicale des cellules de la branche ascendante de l'anse de Henlé et des cellules de la *macula densa* (Castrop & Schnermann, 2008; Gamba, 2005). Plusieurs études basées sur des Northen blots ont permis de distinguer les domaines

spécifiques d'expression de l'ARNm des différentes isoformes de NKCC2 chez la souris, le rat et le lapin. Ainsi, NKCC2A est exprimée dans les parties médullaire et corticale du rein, NKCC2F est spécifique à la partie médullaire et NKCC2B n'est présente que dans le cortex rénal (Castrop & Schnermann, 2008).

CCC (*Slc12a*)	Isoformes	Domaines d'expression
NKCC1 (*Slc12a2*)	NKCC1a NKCC1b	NKCC1a (**Ubiquitaire**, membrane basolatérale des cellules épithéliales). NKCC1b majoritairement exprimée dans le cerveau.
NKCC2 (*Slc12a1*)	6 différentes isoformes (dont 3 principales) : NKCC2A NKCC2B NKCC2F	**Reins** : membrane apicale des cellules de la branche ascendante de l'anse de Henlé. Médullaire rénale (NKCC2A/F), cortex rénal (NKCC2A/B). Testicules.
NCC (*Slc12a3)*	Une isoforme chez la souris, 3 principales chez l'Homme : NCC1 NCC2 NCC3	**Reins** : membrane apicale des cellules du tube contourné distal. Testicules.
KCC1 (*Slc12a4)*	3-4 (souris) ou 5-7 (Homme) isoformes. La forme la plus longue de la protéine (KCC1a/KCC1-1) est l'isoforme principale.	**Ubiquitaire.** Membrane basolatérale des cellules épithéliales.
KCC2 (*Slc12a5*)	3 différentes isoformes (dont 2 principales) : KCC2a KCC2b	**Système nerveux central***, uniquement neuronal. KCC2a (ganglions de la base, hypothalamus, substance noire, tronc cérébral), KCC2b (toutes structures).
KCC3 (*Slc12a6*)	5 différentes isoformes (dont 2 principales) : KCC3a KCC3b	KCC3a (SNC, cœur, rate, colon, poumons, muscles), KCC3b (reins, colon, intestin, poumons).
KCC4 (*Slc12a7*)	Une isoforme principale identifiée	**Ubiquitaire**, fortes différences d'expression chez l'Homme et la souris.
CCC9 (*Slc12a8)*	Plusieurs isoformes (dont 2 principales chez l'Homme) : CCC9-1 CCC9-2	**Ubiquitaire**, forte expression dans les poumons, le système digestif, les reins.
CIP1 (*Slc12a9*)	Isoformes variables selon les espèces	**Ubiquitaire.**

Tableau 1. Profil d'expression des co-transporteurs cation-chlorure.

***** il existe une isoforme supplémentaire de KCC2 (KCC2a-S25) exprimée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas.

NKCC1 est considérée comme une protéine ubiquitaire, notamment exprimée au niveau de la membrane basolatérale des cellules épithéliales (Gamba, 2005). Pourtant, seule l'isoforme NKCC1a est largement exprimée dans l'organisme (Kurki et al., 2023; Randall et al., 1997; Vibat et al., 2001). NKCC1b ne semble exprimée que dans le système nerveux, et plus particulièrement dans les neurones immatures (Kurki et al., 2023; Randall et al., 1997; Vibat et al., 2001). Lors du développement cérébral, une forte augmentation de l'expression de NKCC1a a lieu dans les cellules gliales (Kurki et al., 2023). Cela est responsable de

l'expression de cette isoforme dans la majorité des cellules non-neuronales du cerveau adulte (oligodendrocytes, astrocytes, microglies et péricytes) dans lesquelles elle régule divers mécanismes tels que l'apoptose ou le volume cellulaire (H. Chen et al., 2007; Kurki et al., 2023; G. Su et al., 2002). L'expression neuronale de NKCC1, quant à elle, est plus débattue. En effet, plusieurs études ont démontré que la protéine est exprimée et fonctionnelle dans les neurones immatures (Kolbaev et al., 2020; Kurki et al., 2023; Yamada et al., 2004). Diverses données d'hybridation *in situ,* de RT- PCR et de transcriptomique indiquent aussi une expression de l'ARNm de NKCC1b dans les neurones matures, à un niveau similaire à celui présenté dans les neurones immatures (Hübner, Lorke, et al., 2001; Kurki et al., 2023). Néanmoins, l'expression protéique de NKCC1 n'a jamais été détectée spécifiquement dans les neurones matures, malgré le développement récent d'anticorps spécifiques et validés contre la protéine (Kurki et al., 2023). Une étude récente semble démontrer que l'utilisation d'ARNs interférents contre NKCC1 altère son expression protéique et diminue la concentration intra-neuronale en chlorure $[Cl^-]_i$ dans des neurones matures en culture (Parrini et al., 2021). Néanmoins, à ce jour, aucune autre étude n'a répliqué ces résultats et l'interférence ARN ne semble pas affecter l'expression protéique de NKCC1 *in vivo* (Parrini et al., 2021). Cela suggère que NKCC1 présente une expression protéique extrêmement faible, voire nulle, dans les neurones matures et que les traitements agissant sur NKCC1 agissent essentiellement sur les cellules gliales.

Différentes sources rapportent un nombre variable d'isoformes de KCC1 dans différents modèles selon qu'elles aient été détectées expérimentalement ou prédites sur la base de la structure du gène. En effet, la protéine semble présenter entre trois et quatre isoformes principales chez la souris et entre cinq et sept isoformes chez l'Homme (Kok & Brodsky, 2024; Garneau et al., 2019; Gene ID NCBI : 6560 et 20498). L'isoforme principale de KCC1 (KCC1a/KCC1-1, forme la plus longue de la protéine) est la seule pour laquelle une fonction de transporteur a été identifiée et est exprimée dans la majorité des tissus, dont notamment les tissus du système érythroïde et des organes lymphoïdes (moelle rouge des os, nœuds lymphatiques, rate, érythrocytes, monocytes, etc.) (Gamba, 2005; Garneau et al., 2019; Gillen et al., 1996 ; The Human Protein Atlas). Dans les cellules épithéliales, KCC1 est exprimé au niveau de la membrane basolatérale (Garneau et al., 2019).

KCC2 présente trois isoformes dont deux principales (KCC2a et KCC2b) exprimées dans le système nerveux. Une isoforme supplémentaire (KCC2a-S25, UniProt: A0A076FR46), similaire à KCC2a avec une délétion de son exon 24 (séquence : EWENL), est spécifiquement exprimée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas chez l'Homme et la souris (Kursan et al., 2017). Cette isoforme n'étant exprimée que dans un type cellulaire très

spécifique, nous reviendrons peu dessus par la suite. KCC2a et KCC2b sont exprimées uniquement dans les neurones, notamment du SNC, ainsi que dans certaines lignées cellulaires cancéreuses humaines (Gamba, 2005; Payne et al., 1996; Wei et al., 2011; Williams et al., 1999). Bien que peu d'études se soient intéressées à l'expression de KCC2 dans le système nerveux périphérique, il semblerait qu'il n'y soit majoritairement pas exprimé dans un contexte physiologique. En effet des expériences d'hybridation *in situ* démontrent qu'il n'est pas exprimé dans le ganglion trigéminal (Toyoda et al., 2005). Il ne semble pas non plus détecté dans les ganglions rachidiens de rongeurs sains (S. Mao et al., 2012; Tan et al., 2020), hormis dans une étude récente (Xian et al., 2025). L'expression de KCC2 dans le système nerveux central sera explicitée en détail dans la partie I.2.3.

Chez les Mammifères, KCC3 présente deux isoformes principales formées par l'utilisation de promoteurs et de premiers exons alternatifs, KCC3a et KCC3b (Mercado et al., 2005). Chacune de ces deux isoformes présente plusieurs sous-types formés par différents phénomènes d'épissage alternatif, aboutissant à la formation de cinq isoformes différentes identifiées expérimentalement (Mercado et al., 2005). Chez l'Homme, les isoformes de KCC3 sont largement exprimées dans l'organisme, avec des niveaux élevés d'ARNm dans le cœur, le foie, les reins et le pancréas ainsi que dans diverses lignées cellulaires d'origine humaine (Hiki et al., 1999; Mount et al., 1999). Chez la souris, l'expression de KCC3 est plus régionalisée. KCC3a est exprimée dans différents organes dont notamment le cerveau mais aussi le cœur, les poumons et les muscles tandis que KCC3b parait essentiellement exprimée dans les reins, le colon, l'intestin et les poumons (Mercado et al., 2005; Pearson et al., 2001; Shekarabi et al., 2011). De plus, il y a une augmentation progressive de l'expression de KCC3a dans le système nerveux central (SNC) entre les jours postnataux 1 et 27 (P1 et P27), entrainant une forte expression de l'isoforme dans la moelle épinière mais aussi dans le cortex, le diencéphale, le tronc cérébral et le cervelet à l'âge adulte (Pearson et al., 2001; Shekarabi et al., 2011).

KCC4 ne semble présenter qu'une unique isoforme clairement identifiée chez les Mammifères, bien que plusieurs isoformes aient été prédites sur la base de la structure du gène. Chez l'Homme, l'ARNm et la protéine de KCC4 sont présents dans divers tissus dont les muscles, le cerveau, le cœur, les poumons et les reins (Mount et al., 1999 ; The Human Protein Atlas). Chez la souris, KCC4 présente des niveaux d'expression protéique particulièrement bas dans la majorité des régions du cerveau excepté le tronc cérébral (Gamba, 2005; Karadsheh et al., 2004), tandis qu'il est fortement exprimé dans la moelle épinière et le système nerveux périphérique (Gamba, 2005; Karadsheh et al., 2004). Ces données sont toutefois en contradiction avec celles du Human Protein Atlas qui indique une expression particulièrement

élevée de KCC4 dans la majorité du système nerveux humain. Cela suggère une régulation différentielle de l'expression protéique de KCC4 chez l'Homme et la souris.

1.4. Fonction des CCCs

Les co-transporteurs cation-chlorure sont des transporteurs actifs secondaires électro-neutres qui dissipent les gradients de sodium ou de potassium établis par la pompe Na^+/K^+ ATPase et financent ainsi énergétiquement le transport des ions chlorure de part et d'autre de la membrane plasmique (Gamba, 2005). La direction du flux du chlorure est donc imposée par le gradient transmembranaire des cations avec lesquels il est co-transporté. Les NKCCs utilisent le gradient de sodium afin d'importer le chlorure et le potassium dans la cellule avec une stœchiométrie de $1K^+:1Na^+:2Cl^-$ (Gamba, 2005). NCC utilise aussi le gradient de sodium afin de concentrer le chlorure dans le compartiment intracellulaire avec une stœchiométrie de $1Na^+:1Cl^-$ (Gamba, 2005). Enfin, les KCCs utilisent le gradient de potassium afin d'exporter le chlorure des cellules avec une stœchiométrie de $1K^+:1Cl^-$ (Gamba, 2005). Le potentiel d'équilibre du sodium (+60 mV) étant particulièrement éloigné du potentiel de membrane de la majorité des types cellulaires (généralement entre –50 et -90 mV), les NKCCs et NCC transportent quasiment toujours les ions de l'extérieur vers l'intérieur des cellules (Delpire & Gagnon, 2018). En revanche, le potentiel d'équilibre du potassium (-90 mV) étant relativement proche du potentiel de membrane (Chrysafides et al., 2026), les KCCs peuvent théoriquement à la fois exporter et importer les ions des cellules. Cela a notamment été démontré chez les neurones matures dont l'activité peut élever la concentration en potassium extracellulaire et entrainer le transport de potassium et de chlorure du milieu extra- vers le milieu intracellulaire par KCC2 (Byvaltcev et al., 2023; DeFazio et al., 2000; Payne, 1997). Le transport d'ion par les CCCs entraine aussi un flux de molécules d'eau au travers de ces mêmes transporteurs, dans la même direction que les ions transportés (Hamann et al., 2005; Zeuthen, 1994). Cela est essentiel pour assurer l'équilibre osmotique à la suite du transport des ions, notamment dans les cellules qui n'expriment pas ou peu d'aquaporines telles que les neurones et les cellules épithéliales de la branche ascendante de l'anse de Henlé (Andrew et al., 2006; Nielsen et al., 2002; Papadopoulos & Verkman, 2013).

a. Régulation de la concentration intracellulaire en chlorure

Du fait de leur rôle de transporteur de chlorure, les CCCs ont une fonction essentielle dans la régulation de la concentration intracellulaire de cet ion. Cette régulation est primordiale car le chlorure joue un rôle majeur dans divers processus biologiques tels que la régulation du volume cellulaire, de l'excitabilité neuronale, de la tension artérielle, etc. (De Los Heros, 2018;

Hübner et al., 2015; Raut et al., 2024). Le chlorure est aussi l'anion assurant l'équilibre des charges de part et d'autre de la membrane plasmique lors du déplacement de cations (Raut et al., 2024). La majorité des types cellulaires présentent une concentration en chlorure relativement faible (30-60 mM) mais certains, tels que les neurones ou les cellules du tubule contourné distal des reins, nécessitent le maintien d'une concentration drastiquement plus réduite (5-10 mM) pour fonctionner (Boffi et al., 2018; Raut et al., 2024; X.-T. Su et al., 2020).

Les CCCs régulent la concentration intracellulaire en chlorure et le volume cellulaire via une boucle de rétroaction impliquant la voie WNK-SPAK/OSR1 (De Los Heros, 2018; Kahle et al., 2015; Piala et al., 2014; Figure 3). Les WNKs constituent une sous-famille de kinases chez lesquelles la lysine permettant l'activation de leur activité catalytique, qui se trouve dans le feuillet beta 3 du sous-domaine II de la majorité des kinases, est localisée dans le feuillet beta 2 (Kahle et al., 2015; Min et al., 2004). La sous-famille WNK comprend quatre kinases (WNK1-4) dont l'activation est régulée par l'autophosphorylation de sérines spécifiques (378 et 382 pour WNK1, 331 et 335 pour WNK4) localisées dans leur boucle d'activation appelée T-loop (Murillo-de-Ozores et al., 2021; Piala et al., 2014). Cette autophosphorylation est inhibée par le chlorure et par le gonflement des cellules (Ponce-Coria et al., 2008; Zagórska et al., 2007). Plus particulièrement, concernant le chlorure, sa liaison au site catalytique des WNKs inhibe leur autophosphorylation et par conséquent empêche leur activation (Piala et al., 2014; Ponce-Coria et al., 2008). A l'inverse, lorsqu'il y a une faible concentration intracellulaire en chlorure, les WNKs s'auto-activent et phosphorylent les kinases effectrices SPAK et OSR1, qui se lient au domaine RFXV/I des CCCs et les phosphorylent à leur tour (Moriguchi et al., 2005; Ponce-Coria et al., 2008). Comme nous l'avons détaillé précédemment, la phosphorylation des résidus N-terminaux conservés des NKCCs et de NCC par la voie WNK/SPAK-OSR1 est responsable de leur activation tandis que la phosphorylation des thréonines 926/906/991/926 et 983/1007/1048/980 de KCC1/2/3/4 entraine leur inhibition (De Los Heros, 2018; Ponce-Coria et al., 2008; Rinehart et al., 2005, 2009). Ces deux processus convergent ainsi vers une augmentation de l'entrée de chlorure dans la cellule en réponse à une faible $[Cl^-]_i$ initiale.

b. Régulation du volume cellulaire

Les CCCs régulent le volume des cellules en modifiant leur osmolarité en fonction des stress osmotiques auxquels elles sont soumises (De Los Heros, 2018; Hoffmann et al., 2009). Cela a notamment été démontré dans les érythrocytes, dont le volume est régulé par les KCC (KCC1 et KCC3) : dans la drépanocytose, une activité anormalement élevée de ces transporteurs favorise la déshydratation des hématies et donc la polymérisation de l'hémoglobine falciforme (HbS), contribuant ainsi à la physiopathologie de la maladie sans en

être la cause première (Brugnara, 2001; Rust et al., 2007). En effet, une cellule placée dans un environnement hypertonique subit une perte d'eau au profit du milieu extracellulaire, entrainant son rétrécissement. En réponse à ce rétrécissement, des mécanismes d'augmentation du volume cellulaire (Regulatory Volume Increase, RVI) sont activés (De Los Heros, 2018; Hoffmann et al., 2009, Figure 3). Ces mécanismes sont basés sur l'activation de divers canaux et des NKCCs/NCC ainsi que sur l'inhibition des KCCs (Hoffmann et al., 2009). Ce processus entraine le transport d'ions, et par conséquent d'eau, vers le milieu intracellulaire ce qui restaure l'osmolarité et le volume de la cellule (De Los Heros, 2018; Hoffmann et al., 2009). A l'inverse, une cellule placée dans un environnement hypotonique subit un influx d'eau provoquant son gonflement. Cela entraine l'activation de mécanismes de diminution du volume cellulaire (Regulatory Volume Decrease, RVD), en partie basés sur l'activation des KCCs et l'inhibition des NKCCs/NCC (De Los Heros, 2018; Hoffmann et al., 2009; Figure 3). Le rôle de régulateur du volume cellulaire de NCC et NKCC2 est cependant limité par leur expression très restreinte et limitée à certaines cellules rénales.

L'(in)activation des NKCCs et KCCs en réponse aux variations de volume des cellules est contrôlée par leur phosphorylation via la voie WNK-SPAK/OSR1 et par leur déphosphorylation par certaines phosphatases (De Los Heros, 2018; Zagórska et al., 2007). Ainsi, il a été démontré que le rétrécissement des cellules entraine l'auto-activation de certaines kinases WNK (probablement WNK1/3), ce qui provoque l'activation des NKCCs et l'inhibition des KCCs (De Los Heros, 2018; Rinehart et al., 2009; Zagórska et al., 2007). A l'inverse, le gonflement des cellules provoque l'activation de phosphatases telles que PP1 et PP2A qui déphosphorylent les résidus précédemment cités des NKCCs et KCCs, entrainant l'inhibition des NKCCs et l'activation des KCCs (De Los Heros, 2018; Rinehart et al., 2009). Il existe toutefois des variations dans les modalités d'activation des CCCs par le stress osmotique. En conditions isotoniques, KCC1, 3 et 4 présentent une activité minimale, qui serait due à leur phosphorylation à l'état basal (Adragna et al., 2015; article rétracté : de los Heros et al., 2014; Mercado et al., 2000). Ces KCCs sont donc spécifiquement activés dans des conditions hypotoniques (Adragna et al., 2015; Mercado et al., 2000). A l'inverse, le co-transporteur neurone-spécifique KCC2 présente une activité constitutive et est actif dans des conditions isotoniques (Mercado et al., 2006 ; Song et al., 2002). Cette activité constitutive repose sur la présence d'une séquence spécifique PSPVSSEGIKDFFSM (acides aminés 1021 à 1035), appelée domaine ISO, qui est flanquée de deux séquences PEST (proline, glutamate, sérine, thréonine) au niveau de l'extrémité C-terminale de KCC2 (Mercado et al., 2006; Song et al., 2002). L'activité du transporteur est, par ailleurs, modulée par la (dé)phosphorylation de ses thréonines 906 et 1007 (Friedel et al., 2015; Mercado et al., 2006; Song et al., 2002). En particulier, elle est augmentée par le gonflement cellulaire qui provoque l'activation de

phosphatases et conduit à la déphosphorylation et à la stabilisation de KCC2 (Mercado et al., 2006; Song et al., 2002). Enfin, NKCC1 et NKCC2 présentent aussi une activité constitutive mais leur fonction est fortement augmentée dans le cadre d'un stress hypotonique (Adragna et al., 2015; Hannemann & Flatman, 2011; Luo et al., 2020).

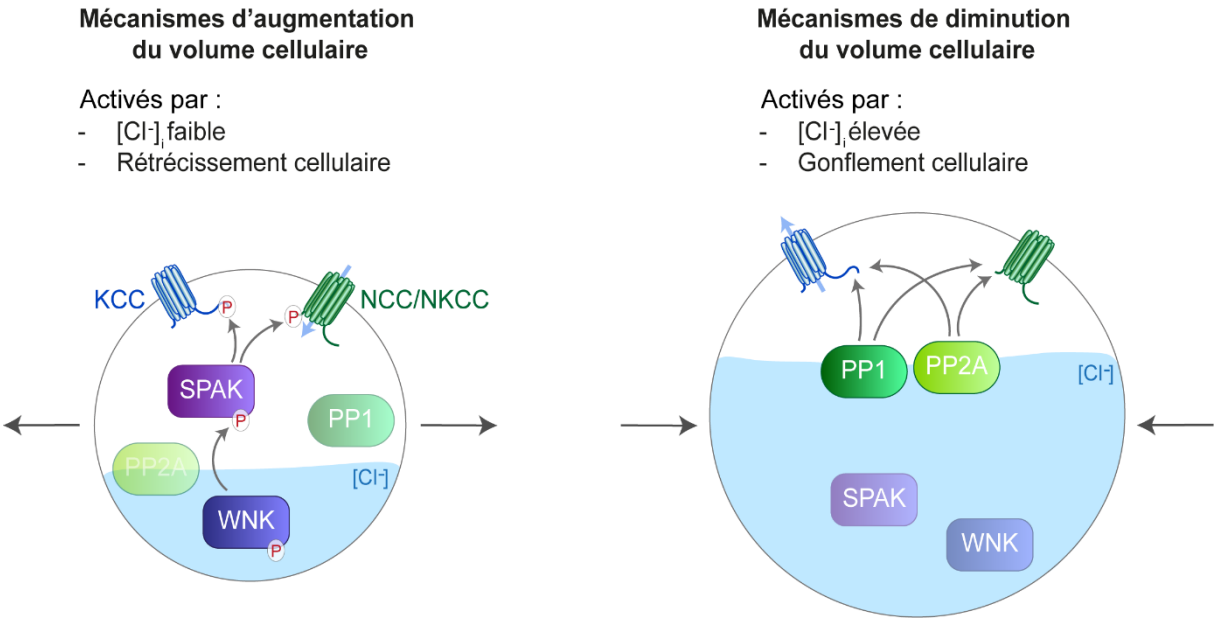


Figure 3. Implication des co-transporteurs cation-chlorure dans la régulation du volume cellulaire et de la concentration en chlorure intracellulaire.

Le rétrécissement des cellules / une faible concentration intracellulaire en chlorure provoque l'activation des mécanismes d'augmentation du volume cellulaire. Cela inclus l'activation de la voie WNK-SPAK/OSR1 qui phosphoryle les CCCs, entrainant l'activation de NCC et des NKCCs ainsi que l'inhibition des KCCs. Les NCC et NKCCs importent du chlorure dans les cellules. Cela provoque une entrée d'eau dans ces dernières ainsi que leur gonflement. Le gonflement des cellules / une concentration intracellulaire en chlorure élevée provoque l'activation des mécanismes de diminution du volume cellulaire. La voie WNK-SPAK/OSR1 n'est pas activée et les phosphatases (PP1 et PP2A) sont activées. La non-phosphorylation des CCCs est associée à l'activation des KCCs et à l'inhibition des NCC/NKCCs. Les KCCs exportent le chlorure des cellules entrainant la sortie d'eau de ces dernières et leur rétrécissement.

c. Autres fonctions des CCCs

Le rôle de transporteur d'ions des CCCs leur confère un ensemble d'autres fonctions, essentielles pour la physiologie des organismes. L'accumulation du chlorure à l'intérieur des cellules par les NKCCs et NCC est nécessaire pour divers processus dont l'absorption et la sécrétion d'ions par les tissus épithéliaux. Par exemple, la sécrétion transépithéliale du chlorure par le colon repose sur l'expression basolatérale de NKCC1 (Reynolds et al., 2007),

la réabsorption de NaCl le long de la branche ascendante de l'anse de Henlé dans les reins est assurée par NKCC2 (Castrop & Schießl, 2014; Castrop & Schnermann, 2008) et la réabsorption de NaCl au niveau du tubule contourné distal des reins dépend de l'expression de NCC (Meor Azlan et al., 2021; You & Jia, 2024). La réabsorption de sel au niveau des reins, assurée par NCC et NKCC2, permet par ailleurs de réguler la tension artérielle. En effet, une forte activité de NCC et NKCC2 est à l'origine d'une réabsorption élevée de NaCl dans le sang, ce qui entraine une augmentation de la concentration sanguine en chlorure qui semble être un facteur déterminant dans l'augmentation de la tension artérielle (Gonzalez-Vicente et al., 2019; Rinehart et al., 2005). Par ailleurs, NKCC1 est en partie responsable de l'accumulation de chlorure dans les cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins, qui est importante pour leur contractilité (Chipperfield & Harper, 2000; Jiang et al., 2004). Enfin, comme nous le verrons dans la partie I.3.1, le maintien d'une faible concentration intracellulaire de chlorure par KCC2 joue un rôle essentiel dans les neurones car elle sous-tend l'inhibition synaptique portée par l'activation des récepteurs de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) (Acton et al., 2012; Blaesse et al., 2006; Rivera et al., 1999).

2. Expression de KCC2

2.1. Structure du gène *Slc12a5*

Le gène *Slc12a5* a été découvert par l'identification de deux marqueurs de séquences exprimées (expressed sequence tags, ESTs) humains codant pour un peptide dont la séquence est proche de celle de NKCC1 dans la base de données GenBank (Payne et al., 1996). Il a ensuite été caractérisé par l'amplification et le séquençage de fragments d'ADN complémentaire correspondant à la région identifiée issus de la transcription inverse de l'ARN de cerveau de rat (Payne et al., 1996). Chez la souris, le gène *Slc12a5* est localisé sur le chromosome 2 (chromosome 20 chez l'Homme) et contient trois cadres de lecture ouverts identifiés (open reading frame, ORF) qui sont transcrits puis traduits pour former les trois isoformes de KCC2 (Kursan et al., 2017; Payne et al., 1996; Sallinen et al., 2001; Uvarov et al., 2007 ; Gene ID NCBI : 57138). KCC2a et KCC2b (correspondant respectivement aux transcript variant 1, NM_001355480.1, et transcript variant 3, NM_020333.2 chez la souris) contiennent tous les deux 26 exons (Uvarov et al., 2007). KCC2a-S25 (transcript variant 2, NM_001355481.1) présente une séquence similaire à celle de KCC2a avec une délétion de son exon 24 et contient donc 25 exons (Kursan et al., 2017). Les ARNs messagers codant pour KCC2a et KCC2b sont transcrits à partir de deux promoteurs distincts et présentent un premier exon différent (exon-1a et exon-1b) qui, dans les deux cas, est rattaché au même

exon 2 lors du processus d'épissage alternatif (Uvarov et al., 2007; Figure 4). Ainsi, les séquences codantes (CDS) de KCC2a et KCC2b ne diffèrent qu'au niveau de leur extrémité 5' où l'ARNm de KCC2a contient une séquence spécifique de 120 paires de bases (pb), contre 51 pb pour l'ARNm de KCC2b (Uvarov et al., 2007 ; base de données du NCBI). Au niveau protéique, KCC2a et KCC2b ne diffèrent que par leur extrémité N-terminale qui présente une séquence spécifique de 40 acides aminés pour KCC2a et 17 acides aminés pour KCC2b (Uvarov et al., 2007 ; base de données du NCBI).

Le transcrit codant pour KCC2b présente un site d'initiation de la transcription (TSS, noté +1) localisé 130 pb en amont du codon d'initiation de KCC2b, lui-même inclus dans une séquence Kozak consensus (Payne et al., 1996; Uvarov et al., 2005). Le promoteur minimal nécessaire à la transcription de ce transcrit s'étend de −180 à +42 pb autour du TSS et est riche en îlots CpG (Uvarov et al., 2005, 2006). En amont du TSS se trouve le promoteur proximal qui est la principale région qui régule la transcription de l'ARNm de KCC2b (Uvarov et al., 2006). Cette région qui s'étend sur 1.4 kpb est conservée entre l'Homme et la souris et contient divers domaines de fixation pour des facteurs de transcription capables d'activer (enhancers) et/ou de réprimer (silencers) l'expression de KCC2b (Uvarov et al., 2006; Figure 4). Parmi ces domaines présents dans le promoteur proximal du transcrit codant pour KCC2b, nous pouvons distinguer plusieurs types de séquences enhancers telles que le domaine de liaison des activating enhancer-binding protein (AP-1, AP-2) ou du myocyte-enhancing factor 2 (MEF2) ainsi que le domaine de fixation des facteurs de transcription de type hélice-boucle-hélice (E-box) (Markkanen et al., 2008; Uvarov et al., 2006). Cette région régulatrice contient aussi des séquences de fixation pour des protéines pouvant activer ou réprimer la transcription du transcrit selon le contexte, telles que la specificity protein 1 (Sp1) ou la protéine early growth response 4 (Egr4) (Uvarov et al., 2006). Enfin, il existe d'autres domaines qui régulent l'expression du transcrit codant pour KCC2b, situés à l'extérieur de cette région régulatrice principale. C'est le cas d'un domaine non caractérisé nommé Block et des séquences qui répriment l'expression de KCC2b dans les cellules non-neuronales appelées neuron-restrictive silencer elements (NRSE) ou repressor elements 1 (RE-1) (Uvarov et al., 2005). Il existe deux domaines RE-1 à proximité du gène *Slc12a5* qui sont situés 1.7 kpb en amont du TSS et dans l'intron 1 du transcrit codant pour KCC2b (Karadsheh & Delpire, 2001; Uvarov et al., 2005, 2006; Yeo et al., 2009). Nous reviendrons plus en détail sur la régulation transcriptionnelle de cette isoforme dans la partie I.4.1.

Le transcrit codant pour KCC2a présente un site d'initiation de la transcription localisé 7454 pb en amont du TSS de KCC2b (Uvarov et al., 2007). Le TSS de KCC2a se trouve aussi dans une région riche en îlots CpG et est localisé 59 pb en amont du codon d'initiation de la

traduction de cette isoforme (Uvarov et al., 2007). A ce jour, l'existence de séquences régulatrices à proximité du TSS de KCC2a n'a pas été élucidée.

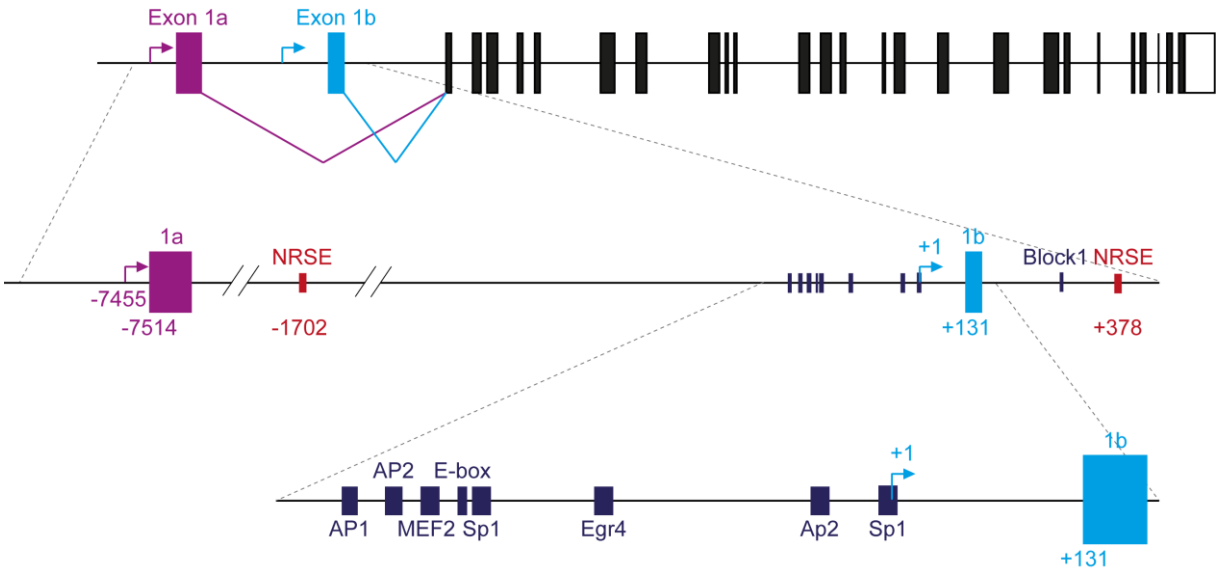


Figure 4. Structure du gène *Slc12a5* chez la souris.

Ligne 1. Organisation des exons du gène *Slc12a5*. Les exons sont représentés par des boîtes et les introns par des lignes, le schéma n'est pas à l'échelle. Les exons 1a et 1b, respectivement spécifiques de KCC2a et KCC2b, sont mutuellement exclusifs et sont rattachés à l'exon 2, qui est commun aux deux isoformes, lors de l'épissage alternatif. **Ligne 2.** Structure génétique de la région régulatrice du transcrit codant pour KCC2b. Les petites boites bleues et rouges représentent les séquences de fixation de facteurs de transcription. Le schéma est à l'échelle et les distances sont indiquées en paires de bases par rapport au site d'initiation de la transcription de KCC2b (flèche bleue). **Ligne 3.** Grossissement sur la région régulatrice directement en amont du TSS de KCC2b. Le schéma est à l'échelle. Les facteurs de transcription présentant des sites de fixation dans cette région sont : les activating enhancer-binding proteins (AP-1, AP-2), le myocyte-enhancing factor 2 (MEF2), la specificity protein 1 (Sp1) et le early growth response 4 (Egr4).

2.2. Évolution développementale de l'expression de KCC2

Au cours du développement embryonnaire et postnatal, l'expression de KCC2 augmente progressivement dans le SNC jusqu'à atteindre son maximum environ deux semaines après la naissance chez la souris et le rat (Rivera et al., 1999; Stein et al., 2004). Une fois qu'elle a atteint son maximum, l'expression du transporteur parait relativement stable en l'absence de contexte pathologique ou de traumatisme (Rivera et al., 1999). Chez l'Homme, l'expression de KCC2 augmente plus lentement lors du développement et semble évoluer tout au long de la vie des individus (Sedmak et al., 2016). L'augmentation développementale de l'expression

de KCC2 est plus ou moins forte selon la structure du SNC étudiée. En effet, si l'expression protéique du transporteur augmente d'un facteur 10 dans le cortex de souris entre P2 et l'âge adulte, elle est seulement doublée dans le tronc cérébral et varie peu dans la moelle épinière (Uvarov et al., 2009; voir aussi Stein et al., 2004 qui présente des résultats légèrement différents). Ces variations dans l'élévation de l'expression de KCC2 entre les différentes régions du cerveau est aussi expliquée par le stade développemental étudié. En effet, l'augmentation de l'expression de KCC2 est initiée à des stades développementaux variables dans les différentes régions du SNC et est fortement corrélée avec la différenciation des neurones localisés dans ces régions (H. Li et al., 2002; Rivera et al., 1999; Stein et al., 2004). Par ailleurs, elle présente un retard de quelques jours chez le rat, dont le développement embryonnaire est légèrement plus long que chez la souris (Kovács et al., 2014; H. Li et al., 2002; Stil et al., 2009). Dans la suite de ce manuscrit, nous discuterons majoritairement de l'expression et de la fonction de KCC2 chez la souris et le rat : si un autre organisme modèle est cité, cela sera clairement explicité.

Ainsi, les structures du SNC avec une différenciation précoce telles que la moelle épinière et le tronc cérébral (Wentworth, 1984) commencent à exprimer l'ARNm de KCC2 10 jours après la conception (E10.5) et présentent déjà une expression protéique élevée à E15.5 chez la souris (Hübner, Stein, et al., 2001; Stein et al., 2004). A partir de E15.5, de nombreux autres types neuronaux se différencient dont les cellules de Purkinje dans le cervelet ou les neurones du noyau dorsolatéral du thalamus et commencent à exprimer les transcrits de KCC2 (Stein et al., 2004). Les dernières structures du SNC à voir leur expression de KCC2 augmenter sont le néocortex et l'hippocampe, dont les neurones se différencient tardivement. A E15.5, l'expression d'ARNm et de protéines de KCC2 est détectée dans certaines régions du cortex de souris telles que le cortex piriforme (Stein et al., 2004; Zavalin et al., 2024). Leur expression augmente progressivement et se propage au reste du cortex jusqu'à atteindre leur maximum une semaine après la naissance pour l'ARNm et plus de deux semaines après la naissance pour la protéine (H. Li et al., 2002; Stein et al., 2004; Zavalin et al., 2024). Enfin, l'ARNm de KCC2 commence à être exprimé dans la corne d'Ammon (CA3) de la formation hippocampique à E15.5 (Stein et al., 2004). Cette expression s'étend à CA1 à E18.5 et au gyrus denté (GD) lors de la première semaine après la naissance chez la souris (Stein, 2004) et est retardée de quelques jours dans l'hippocampe de rat (Rivera et al., 1999). La protéine KCC2 n'est en revanche détectée dans la formation hippocampique qu'à partir de la naissance, entre E18.5 et P3 chez la souris et entre P2 et P4 chez le rat (Gulyás et al., 2001; Kovács et al., 2014; Stein et al., 2004).

Il existe aussi une hétérogénéité dans l'organisation temporelle de l'augmentation de l'expression de KCC2 entre différents types de neurones d'une même structure du SNC. En effet, certaines populations d'interneurones corticaux, notamment localisées dans la sous-plaque, expriment KCC2 dès E18.5 tandis qu'il n'est pas exprimé par les neurones pyramidaux adjacents jusqu'après la naissance (Szrinivasan et al., 2025). Ces neurones sont majoritairement des interneurones à somatostatine localisés dans les strates 2 à 6 du néocortex mais il semblerait qu'une population neuronale glutamatergique de la strate 6b présente aussi une expression précoce de KCC2 (Szrinivasan et al., 2025). Certains types de neurones semblent aussi ne pas présenter d'augmentation de l'expression de KCC2 au cours du développement, entrainant une expression particulièrement faible du transporteur chez ces derniers même lorsqu'ils sont matures. C'est notamment le cas des cellules Cajal-Retzius localisées dans le néocortex et l'hippocampe (Pozas et al., 2008; Szrinivasan et al., 2025) mais aussi des neurones de la habenula médiale (U. Kim & Chung, 2007; Koppensteiner et al., 2016), du noyau réticulaire thalamique (Barthó et al., 2004) et des neurones dopaminergiques de la substance noire (Gulácsi et al., 2003).

L'évolution neurodéveloppementale de l'expression de KCC2 diffère aussi selon l'isoforme considérée. En effet, KCC2a ne subit globalement pas d'augmentation de son expression au cours du développement (Uvarov et al., 2007, 2009). Dans les neurones immatures, l'expression des deux isoformes est relativement équilibrée. A E17.5, KCC2a représente plus de 50% de la quantité totale d'ARNm de KCC2 dans le néocortex, l'hippocampe et le tronc cérébral de souris (Uvarov et al., 2007). De même, à P2, KCC2a représente près de 60% de la quantité totale de protéine de KCC2 (détectée par des anticorps panKCC2 qui reconnaissent les deux isoformes) dans le néocortex et le tronc cérébral (Uvarov et al., 2007). Or, entre E17.5 et P14 seule la quantité d'ARNm de KCC2b augmente, sans variation significative de l'expression de KCC2a (Uvarov et al., 2007). Similairement, entre la période périnatale et l'âge adulte, la quantité de protéine KCC2 totale double dans le tronc cérébral et est multipliée par dix dans le néocortex tandis que celle de KCC2a diminue dans le tronc cérébral et est à peine doublée dans le néocortex (Uvarov et al., 2009). Cela résulte en un fort déséquilibre d'expression protéique entre les deux isoformes chez l'adulte, où KCC2a est largement minoritaire et ne représente plus que 8% de l'expression totale de KCC2 dans le néocortex, 10% dans l'hippocampe et 17% dans le tronc cérébral (Uvarov et al., 2009). KCC2a a été découverte près de 10 ans après la caractérisation de KCC2 (Payne et al., 1996; Uvarov et al., 2007). Par conséquent, il est important de garder à l'esprit que la majorité des études portant sur KCC2 jusqu'en 2007 étaient menées sur les deux isoformes indistinctement. Cela est notamment le cas des études portant sur l'expression de KCC2, car les sondes et anticorps utilisés ciblaient rarement l'exon 1 de l'ARNm ou le domaine N-terminal de la protéine, qui

diffèrent entre les isoformes. Si chez l'adulte, il est raisonnable d'imputer les propriétés observées chez KCC2 total à KCC2b car il est largement majoritaire, la fonction de chacune des isoformes est plus difficile à élucider lors du développement et fait l'objet d'une partie du travail expérimental de ma thèse. Il existe cependant des exceptions à cette observation, dont les études réalisées avec un anticorps spécifique contre KCC2b (Hübner, Stein, et al., 2001) ou menées sur une lignée murine avec une délétion de l'exon 1b de KCC2 (KCC2b KO) (Woo et al., 2002).

2.3. Expression de KCC2 dans le SNC adulte et en développement

Les premiers articles ayant caractérisé le transporteur ont permis de mettre en évidence que l'ARNm et la protéine de KCC2 total sont tous deux largement exprimés dans le système nerveux central adulte, dont notamment dans le néocortex, l'hippocampe, le cervelet, le tronc cérébral et la moelle épinière (Payne et al., 1996; Williams et al., 1999 ; The Human Protein Atlas). Néanmoins, il faudra attendre l'étude de Markkanen et al., publiée en 2014, pour obtenir un atlas précis de l'expression des deux isoformes de KCC2 dans l'ensemble du cerveau adulte et en développement (Markkanen et al., 2014). Cet article, précédé par l'étude d'Uvarov et al. publiée en 2007 et portant sur les transcrits, met en évidence qu'à la fin du développement embryonnaire (E18.5), les deux isoformes présentent une expression relativement similaire dans les différentes régions du cerveau (Markkanen et al., 2014; Uvarov et al., 2007). Elles sont toutes deux exprimées dans l'hypothalamus et le tronc cérébral (excepté le système auditif dans lequel KCC2a n'est pas présente) et sont peu ou pas exprimées dans le néocortex, la formation hippocampique et le thalamus (Markkanen et al., 2014; Uvarov et al., 2009). Ces résultats sont en accord avec plusieurs études précédentes concernant l'expression développementale de KCC2 total, hormis concernant l'expression dans le thalamus qui semble plus précoce dans ces dernières (Kovács et al., 2014; Stein et al., 2004). Par ailleurs, lors de la première semaine après la naissance, KCC2a est transitoirement exprimée dans les cellules de Purkinje du cervelet, tandis que KCC2b est stablement exprimée dans ces cellules de la naissance à l'âge adulte (Markkanen et al., 2014).

Dans le cerveau adulte, KCC2b est fortement exprimée dans la majorité des structures tandis que KCC2a, qui est largement minoritaire, présente une distribution plus polarisée (Markkanen et al., 2014; Figure 5). En effet, KCC2b a une forte expression dans la majorité des régions du issues du proencéphale dont le néocortex, l'hippocampe, le striatum, l'hypothalamus et le thalamus tandis que KCC2a est globalement très peu exprimée dans le proencéphale et notamment dans le néocortex et l'hippocampe (Markkanen et al., 2014).

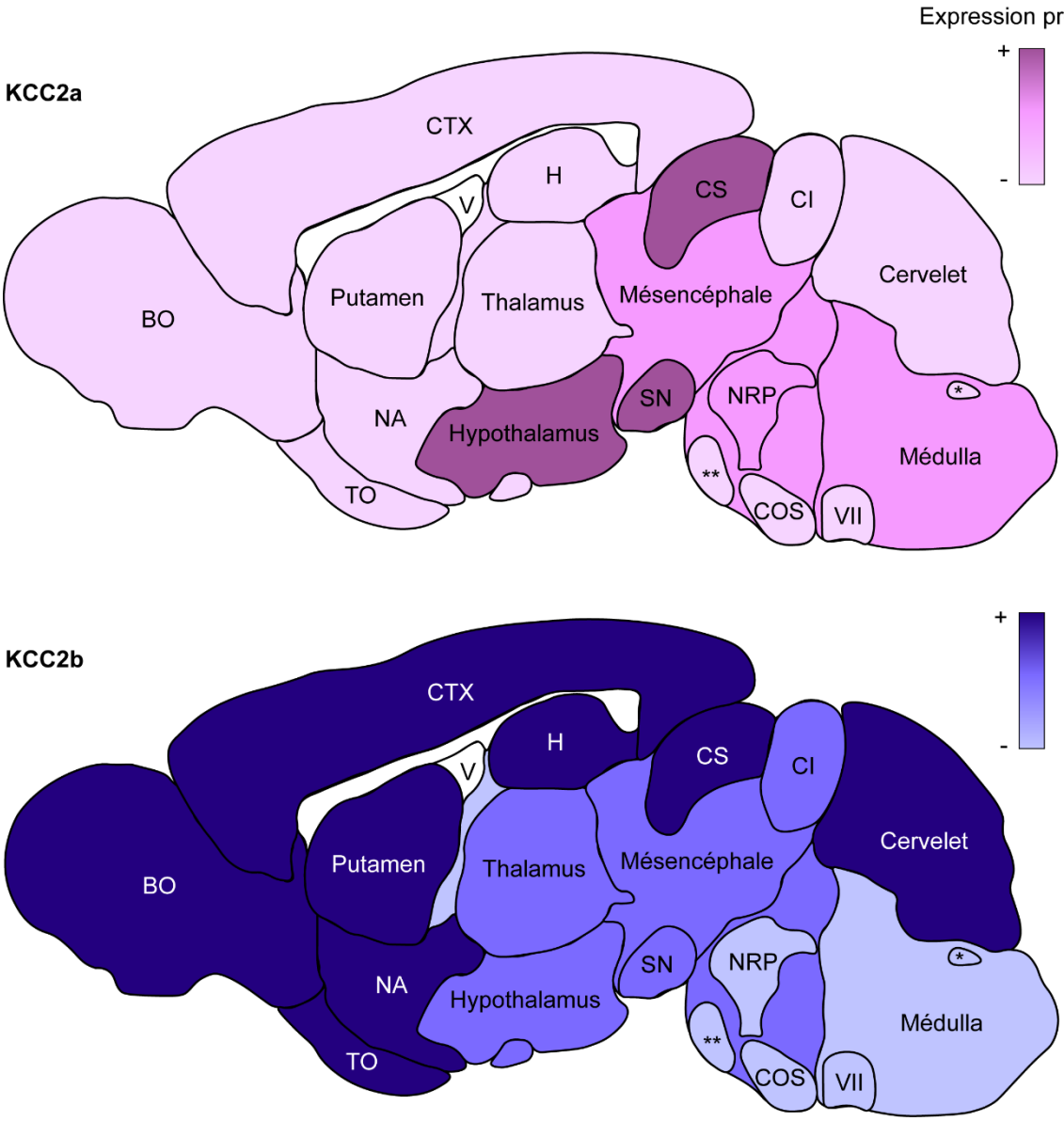


Figure 5. Expression de KCC2a et KCC2b dans le cerveau adulte.

Schéma réalisé à partir des données de Markkanen et al., 2014 et de l'atlas de coupes sagittales du cerveau de souris adulte du Allen Brain Atlas (coupe 14/21). Les couleurs représentent une estimation non quantitative de l'expression des isoformes. BO : bulbe olfactif, CI : colliculus inférieur, CS : colliculus supérieur, COS : complexe olivaire supérieur, CTX : néocortex, H : hippocampe, NA : noyau accumbens, SN : substance noire, NRP : noyau réticulaire du pont, TO : tubercule olfactif, V : ventricule, VII : noyau somato-moteur du nerf facial, * : noyau cunéiforme, ** : substance grise pontique.

Certaines structures présentent néanmoins une expression plus élevée de KCC2a. C'est notamment le cas du *globus pallidus*, du noyau ventral du corps géniculé latéral du thalamus et de l'hypothalamus (Markkanen et al., 2014). Similairement, KCC2b est présente dans la majorité des régions issues du mésencéphale et du rhombencéphale (Markkanen et al., 2014). KCC2a est aussi relativement exprimée dans le mésencéphale et notamment dans le

colliculus supérieur et la substance noire (Markkanen et al., 2014). Les niveaux de KCC2a sont particulièrement faibles dans le cervelet et élevés dans la majorité des structures du tronc cérébral dont le noyau réticulaire du pont et les noyaux pontiques (Markkanen et al., 2014). Elle est en revanche peu exprimée dans le complexe olivaire supérieur et le noyau somato-moteur du nerf facial (Markkanen et al., 2014). Enfin, les deux isoformes sont présentes dans la moelle épinière où elles présentent une distribution relativement semblable (Markkanen et al., 2014).

2.4. Expression différentielle de KCC2 dans différents types de neurones matures

Hormis quelques études ayant mis en évidence une augmentation différentielle de l'expression de KCC2 dans les interneurones corticaux (Bortone & Polleux, 2009; Szrinivasan et al., 2025), peu d'articles se sont intéressés à la variabilité de l'expression du transporteur entre différents types de neurones. Une étude a mis en évidence que certains interneurones hippocampiques, dont les interneurones à parvalbumine des régions CA1 et CA3 ainsi que les interneurones exprimant la calbindine et GluR1a ou la calretinine, présentent des niveaux protéiques de KCC2 particulièrement élevés (Gulyás et al., 2001). Les données de séquençage d'ARN issu du néocortex et de l'hippocampe de souris adultes du Allen Brain Atlas (10x genomics 2020 with 10x-SMART-seq taxonomy 2021), suggèrent que la majorité des neurones du néocortex et de l'hippocampe présentent une expression transcriptionnelle relativement similaire de KCC2. Il semblerait néanmoins que les interneurones issus de l'éminence ganglionnaire caudale (EGC) aient des niveaux de transcrit de KCC2 globalement légèrement plus faibles que les interneurones issus de l'éminence ganglionnaire médiale (EGM). Parmi les différents types de cellules en grain du gyrus denté répertoriées, la majorité présente une expression particulièrement faible du transporteur. Il s'agit probablement de cellules en grain issues de la neurogénèse adulte dans lesquelles l'expression de KCC2 n'a pas encore augmenté. Quelques autres types neuronaux présentent une faible expression de KCC2 dont les interneurones corticaux Lamp5-Lhx6 et 5-HT3AR Meis2 ainsi que les cellules Cajal-Retzius qui sont les seuls neurones dans lesquels aucune expression de KCC2 n'est détectée dans cette base de données, en accord avec plusieurs études (Pozas et al., 2008; Szrinivasan et al., 2025).

2.5. Expression subcellulaire de KCC2 dans les neurones immatures et matures du SNC

Dès l'initiation de leur expression et jusqu'à l'âge adulte, les deux isoformes de KCC2 sont présentes au niveau du soma et des dendrites des neurones, tandis qu'elles sont exclues de l'axone et de son segment initial (Blaesse et al., 2006; Gulyás et al., 2001; Hübner, Stein, et al., 2001; Kovács et al., 2014; Uvarov et al., 2009). La localisation spécifique de chacune des isoformes n'a été étudiée que dans les neurones matures et non lors du développement, nous y reviendrons donc par la suite. Dans les neurones immatures, KCC2 total est majoritairement exprimé au niveau des membranes, qu'il s'agisse de la membrane plasmique ou de la membrane des vésicules de transport localisées dans les dendrites (Blaesse et al., 2006; Gulyás et al., 2001; Kovács et al., 2014). En effet, à P0 le transporteur est déjà fortement exprimé à la membrane plasmique du soma et des dendrites proximales ainsi qu'au niveau du neuropile du complexe olivaire supérieur (Blaesse et al., 2006). Similairement, à P2, il est exprimé à la membrane des dendrites distales et dans les vésicules de transport de l'hippocampe de rat (Gulyás et al., 2001; Kovács et al., 2014). Lors du développement, il y a une augmentation progressive de l'expression de KCC2 à la membrane plasmique au détriment de son expression dans les vésicules de transport (Gulyás et al., 2001 ; mais contradictoire avec les données de Kovács et al., 2014). Il y a aussi une diminution progressive de son expression au niveau du neuropile, qui serait due à l'élagage dendritique (Blaesse et al., 2006), et une augmentation de sa densité dans la tête et le cou des épines dendritiques (Gauvain et al., 2011; Gulyás et al., 2001; Kovács et al., 2014). Pour autant, dès l'apparition des synapses et jusqu'à l'âge adulte, KCC2 semble être autant exprimé à proximité des synapses excitatrices qu'inhibitrices (Blaesse et al., 2006; Chamma et al., 2013).

Dans les neurones matures, KCC2b est fortement exprimée à la membrane plasmique, avec une densité plus élevée dans la membrane des dendrites que du soma (Báldi et al., 2010; Gulyás et al., 2001; Markkanen et al., 2014, 2017). La localisation de KCC2a a été plus difficile à élucider. En effet, différentes expériences d'immunochimie sur des neurones en cultures ainsi que sur des tranches de cerveau de souris semblent indiquer une absence de KCC2a dans la membrane du soma et des dendrites des neurones ainsi qu'une restriction de son expression dans la partie intracellulaire de ces deux compartiments (Markkanen et al., 2014, 2017; Uvarov et al., 2009). Pourtant, des expériences de biotinylation de surface sur des neurones matures en culture indiquent qu'environ 45% des protéines KCC2a sont exprimées à la membrane plasmique, un pourcentage similaire à celui obtenu pour KCC2b (Markkanen et al., 2017). Cette discordance entre les résultats d'immunochimie et de biochimie suggère

que KCC2a est probablement exprimée à la membrane plasmique mais que cette expression ne peut pas être détectée via des expériences d'immunochimie à cause d'un masquage du domaine de fixation de l'anticorps quand l'isoforme est localisée à la membrane plasmique (Markkanen et al., 2017). Cela a été confirmé expérimentalement lors de ma thèse et nous aborderons plus en détail la répartition de KCC2a au sein des neurones dans les résultats.

La localisation intracellulaire de chacune des isoformes n'a pas été élucidée de façon plus précise, les données suivantes ne font donc pas la distinction entre KCC2a et KCC2b. La répartition de KCC2 total le long des dendrites semble varier en fonction du type neuronal et de la méthode d'analyse. En effet, si dans les neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe, KCC2 présente une plus forte densité dans les dendrites apicales que basales ainsi qu'une variation de son expression le long des dendrites apicales, il ne semble pas y avoir de variation de sa densité dans les dendrites des cellules en grain du gyrus denté (Báldi et al., 2010). Sa densité ne semble pas non plus varier dans les dendrites de neurones pyramidaux en culture (Doyon et al., 2011). Similairement à ce qui a été observé dans les neurones pyramidaux de CA1, il y a aussi une augmentation progressive de la densité de KCC2 au fur et à mesure du rétrécissement des dendrites dans le thalamus (Barthó et al., 2004). Enfin, dans les cellules bipolaires de type OFF et les cellules amacrines étoilées de la rétine, KCC2 est enrichi dans les dendrites distales (Gavrikov et al., 2006; Vardi et al., 2000).

Au sein des dendrites, KCC2 est environ 1.5 fois plus exprimé au niveau des épines que du tronc dendritique (Gauvain et al., 2011). Il est notamment présent au niveau du cou et de la tête des épines matures de type champignon, où il interagit avec divers éléments du cytosquelette, et est complètement absent des épines immatures de type filipode (Chamma et al., 2012; Gauvain et al., 2011; Gulyás et al., 2001). KCC2 est préférentiellement localisé à proximité des synapses (Barthó et al., 2004; Chamma et al., 2013; Hübner, Stein, et al., 2001) et est exprimé à la fois au niveau des synapses excitatrices asymétriques et des synapses inhibitrices symétriques (Belenky et al., 2008; Blaesse et al., 2006; Chamma et al., 2013), entre lesquelles il semble équitablement réparti (Chamma et al., 2013). A proximité des synapses, le transporteur est majoritairement présent dans la zone péri-synaptique des neurones post-synaptiques (Barthó et al., 2004; Blaesse et al., 2006; Gulyás et al., 2001), permettant notamment de maintenir le gradient de chlorure nécessaire pour l'inhibition synaptique, mais il est parfois exprimé au niveau pré-synaptique chez certains types de neurones tels que les cellules bipolaires de type ON de la rétine (Vardi et al., 2000).

3. Fonctions de KCC2 dans les neurones matures

3.1. Rôle de KCC2 dans l'inhibition synaptique rapide

a. Généralités sur l'inhibition synaptique rapide

L'inhibition synaptique est un processus reposant notamment sur l'hyperpolarisation du potentiel de membrane des neurones, en deçà de leur potentiel de repos. Cela augmente l'écart entre le potentiel de membrane de la cellule et le potentiel seuil de déclenchement d'un potentiel d'action ce qui diminue la probabilité que le neurone génère un potentiel d'action. L'inhibition synaptique rapide repose sur les potentiels post-synaptiques inhibiteurs (PPSIs) qui résultent d'un influx d'ions chargés négativement, généralement du chlorure, au niveau des synapses inhibitrices (Benardo, 1994; Farrant & Nusser, 2005). Elle est majoritairement médiée par les récepteurs synaptiques ionotropiques à l'acide γ-aminobutyrique (GABA-A) et à la glycine (Aickin et al., 1984; Avila et al., 2013; Deisz & Dose, 1983; Farrant & Nusser, 2005). Les récepteurs GABA-A et glycinergiques sont des hétéropentamères, généralement constitués de deux sous-unités α, deux sous-unités β et une sous-unité γ pour le récepteur GABA-A (Ghit et al., 2021; Sigel & Steinmann, 2012). Le récepteur à la glycine est, lui, formé de sous-unités α et β dont la stœchiométrie, longtemps estimée à 2α:3β, est aujourd'hui établie à 4α:1β par cryo-microscopie électronique (H. Yu et al., 2021; H. Zhu & Gouaux, 2021). Dans ces deux types de récepteurs, les sous-unités délimitent un canal central perméable au chlorure et au bicarbonate (HCO_3^-) (Avila et al., 2013; Ghit et al., 2021; Sigel & Steinmann, 2012). Les récepteurs GABA-A et glycinergiques présentent un ratio de perméabilité bicarbonate/chlorure de 20 à 40% (Bormann et al., 1987; Pressey et al., 2023). La liaison du GABA ou de la glycine à leur récepteur respectif entraine un changement de conformation de ce dernier qui permet l'ouverture de son canal et engendre des flux de chlorure et de bicarbonate dont la polarité dépend de leur gradient électrochimique (Avila et al., 2013; Sigel & Steinmann, 2012). Le récepteur GABA-A est présent dans la majorité des structures du système nerveux central, avec des variations propres à chacune de ses sous-unités, tandis le récepteur à la glycine est essentiellement présent dans le tronc cérébral et la moelle épinière (Frostholm & Rotter, 1985; Sieghart & Sperk, 2002). Pour cette raison, nous allons majoritairement nous intéresser à l'inhibition synaptique médiée par le récepteur GABA-A.

Dans les années 1980, plusieurs équipes ont démontré qu'un transporteur spécifique exporte le chlorure et le potassium des neurones, maintenant une concentration en chlorure particulièrement faible (estimée à 4 mM) dans ces cellules, à l'origine de l'hyperpolarisation de leur potentiel de membrane quand le récepteur GABA-A est activé (Aickin et al., 1984; Deisz & Dose, 1983; Misgeld et al., 1986; Thompson & Gahwiler, 1989). En effet, il a été démontré que la valeur à laquelle la polarité des potentiels post-synaptiques inhibiteurs s'inverse (E_{PPSI})

est quasiment similaire au potentiel d'équilibre du chlorure E_{Cl^-} (Aickin et al., 1984). Il a aussi été observé qu'une élévation artificielle de $[Cl^-]_i$ dans les cellules pyramidales de l'hippocampe entraine une dépolarisation de E_{PPSI} (Misgeld et al., 1986). L'ensemble de ces données suggèrent que les PPSIs reposent sur un influx de chlorure dans les neurones. Néanmoins, il a été démontré par la suite que le potentiel d'inversion des courants au travers du récepteur GABA-A (E_{GABA}) est toujours plus dépolarisé que le potentiel d'équilibre de l'ion chlorure (E_{Cl^-}) car l'ouverture du canal associé au récepteur GABA-A provoque additionnellement un efflux de bicarbonate (Kaila et al., 1993). Comme nous le verrons par la suite cela contribue à conférer un effet dépolarisant au GABA dans certaines conditions.

Avant de nous intéresser plus en détail au rôle de KCC2 dans l'inhibition synaptique rapide, nous allons détailler les différentes méthodes qui sont utilisées afin d'estimer sa fonction de transporteur.

b. Méthodes d'étude de la fonction de transporteur de chlorure de KCC2

KCC2 est un transporteur électro-neutre, il co-exporte le chlorure et le potassium des neurones avec une stœchiométrie de 1:1 (Payne et al., 1996; Rivera et al., 1999). Cela maintient l'équilibre des charges de part et d'autre de la membrane plasmique et entraine un flux de charge observé nul. Le déplacement des ions par KCC2 ne pouvant pas être directement mesuré par des techniques d'électrophysiologie, différentes méthodes ont été développées afin d'estimer son activité. Parmi ces méthodes, différentes techniques de patch-clamp sont utilisées afin d'estimer la concentration en chlorure des cellules, qui permet indirectement d'évaluer la fonction de transporteur KCC2. Le patch clamp en configuration cellule attachée avec un fort scellement (résistance > 1 Gigaohm) consiste à presser une microélectrode contre la membrane plasmique de la cellule, sans arracher cette dernière (Otsu et al., 2020; Perkins, 2006). Cela permet de maintenir l'intégrité du milieu intracellulaire et d'analyser de manière non-invasive si l'activation des récepteurs GABA-A (via des agonistes tels que l'isoguvacine) entraine une hyperpolarisation ou une dépolarisation du potentiel de membrane lorsque qu'aucun courant n'est injecté à la cellule par l'électrode (Otsu et al., 2020). Bien que cette méthode soit non-invasive, elle confère une lecture peu précise de la fonction de KCC2 car elle permet uniquement de déterminer la polarité mais pas l'amplitude ni le potentiel d'inversion du courant en réponse à l'activation des récepteurs GABA-A.

Le patch clamp perforé en cellule attachée repose sur le remplissage de l'électrode de patch clamp avec un antibiotique (gramicidine) qui, au contact de la membrane plasmique, forme des canaux perméables aux cations monovalents et peu perméables au chlorure (Kyrozis &

Reichling, 1995; Medina et al., 2014; Otsu et al., 2020; Figure 6). Cette méthode permet ainsi de préserver la concentration intracellulaire en chlorure physiologique des neurones. L'expérimentateur active les récepteurs GABA-A avec un agoniste tout en imposant différents paliers de potentiels à la cellule. Cela lui permet d'enregistrer les courants au travers des récepteurs GABA-A à différents potentiels et d'établir la relation de dépendance du courant synaptique au potentiel, afin d'en déduire le potentiel d'inversion du courant au travers des récepteurs GABA-A (E_{GABA}) (Kyrozis & Reichling, 1995; Medina et al., 2014; Otsu et al., 2020). Comme nous l'avons vu précédemment, E_{GABA} est une approximation du potentiel d'équilibre des ions chlorure (E_{Cl-}). La mesure de E_{GABA} permet donc d'estimer la fonction de transporteur de KCC2 selon l'équation de Nernst. En effet, la valence du chlorure étant égale à -1, l'équation de Nernst pour le chlorure est la suivante (avec E_{Cl-} : potentiel d'inversion du chlorure en volts; R : constante des gaz parfaits, 8,314 $J.K^{-1}.mol^{-1}$; T : température en Kelvin; F : constante de Faraday, 96 485 $C.mol^{-1}$; $[Cl^-]_i$: concentration intracellulaire en chlorure ; $[Cl^-]_e$: concentration extracellulaire en chlorure) :

$$E(Cl-) = \frac{RT}{F} \ln\left(\frac{[Cl-]i}{[Cl-]e}\right)$$

Lorsque KCC2 est fonctionnel, $[Cl^-]_i << [Cl^-]_e$, donc, si nous négligeons l'influence du bicarbonate sur E_{GABA}, $E_{GABA} \sim E_{Cl-} << 0$. Ainsi, plus KCC2 exporte du chlorure, plus E_{GABA} est hyperpolarisé. La mesure approximative de E_{Cl-} permet aussi de calculer la force motrice s'appliquant sur le chlorure. La force motrice qui s'applique sur un ion est l'écart entre le potentiel de repos de la cellule (V_m) et le potentiel d'équilibre de l'ion. Elle représente la contrainte électrochimique qui détermine la polarité et la force de déplacement de l'ion de part et d'autre de la membrane plasmique lorsque celle-ci y est perméable (notamment via l'ouverture de canaux). Dans le cas d'anions tels que le chlorure, une force motrice positive indique un flux entrant d'ion tandis qu'une force motrice négative indique un flux sortant. La méthode de patch perforé présente néanmoins plusieurs inconvénients : elle est difficile à mettre en place expérimentalement, affecte la concentration intracellulaire en potassium (qui influence la fonction de transporteur de KCC2) et la configuration en voltage clamp influence la force motrice qui s'applique sur le chlorure (Medina et al., 2014).

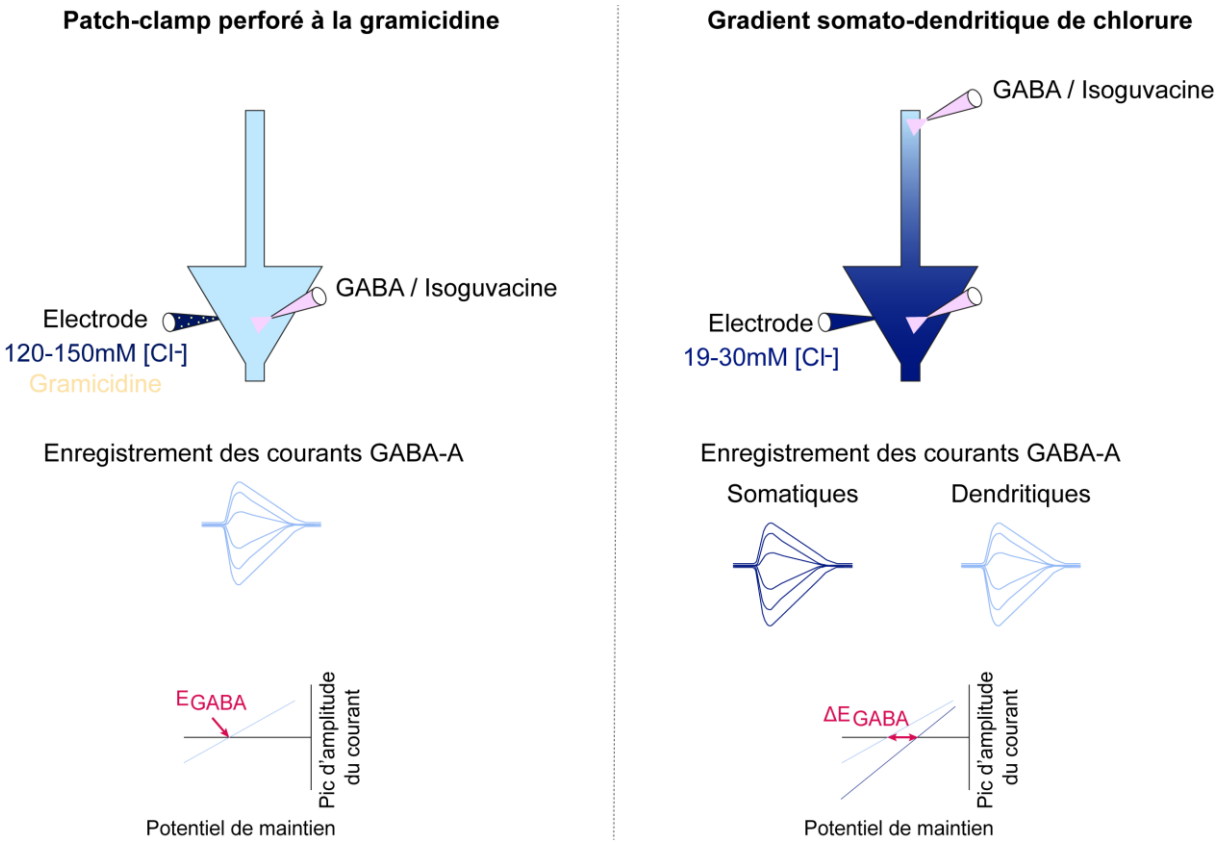


Figure 6. Comparaison de deux méthodes électrophysiologiques pour estimer la fonction de KCC2.

Le patch clamp perforé préserve la concentration intra-neuronale en chlorure et permet de mesurer le potentiel d'inversion du courant au travers des récepteurs GABA-A (E_{GABA}) au niveau du soma. E_{GABA} dépend de la concentration intra-neuronale en chlorure et permet donc d'estimer si le neurone présente un export efficace de cet ion. La méthode du gradient somato-dendritique impose une forte concentration en chlorure au niveau du soma par le biais de l'électrode. Cela permet d'estimer l'efficacité de l'export de chlorure par KCC2 entre le soma et une dendrite en mesurant la différence entre le potentiel d'inversion du courant au travers des récepteurs GABA-A dendritique et somatique (ΔE_{GABA}).

La méthode du gradient somato-dendritique de chlorure est basée sur le patch d'une cellule en configuration cellule entière avec une électrode contenant une solution intracellulaire concentrée en chlorure (Jarolimek et al., 1999; Medina et al., 2014; Otsu et al., 2020; Figure 6). L'utilisation d'une solution intracellulaire riche en chlorure permet de « fixer » la concentration de l'ion à un niveau élevé au niveau du soma. Ainsi, lorsque KCC2 est fonctionnel, bien que $[Cl^-]_i$ soit contrôlée dans le soma, le transporteur exporte le chlorure dans les dendrites et entraine une diminution progressive de $[Cl^-]_i$ le long de celles-ci. Cette variation somato-dendritique $[Cl^-]_i$ peut être estimée en mesurant E_{GABA} au niveau du soma et d'une dendrite par une libération focale d'agoniste sur ces deux compartiments et l'établissement d'une courbe IV, comme détaillé précédemment. Lorsque l'export de chlorure est fonctionnel, $E_{GABA,\ dendrite}$ est largement inférieur à $E_{GABA,\ soma}$ ce qui se traduit par une valeur de ΔE_{GABA}

($E_{GABA,\ dendrite}$ - $E_{GABA,\ soma}$) négative. Le désavantage principal de cette méthode est la possible inhibition de la voie WNK-SPAK/OSR1 par la forte concentration intracellulaire maintenue dans le soma (Medina et al., 2014). Cette méthode est celle que j'ai utilisée au cours de ma thèse, notamment car il s'agit d'une mesure dynamique de l'extrusion du chlorure, mais aussi car d'autres équipes et nous-mêmes avons démontré qu'elle permet une mesure efficace de la fonction de KCC2 en montrant que l'utilisation de bloqueurs du transporteur abolit efficacement le gradient somato-dendritique de chlorure (Otsu et al., 2020; Schmidt et al., 2018).

D'autres méthodes consistent à estimer la valeur basale de $[Cl^-]_i$ relativement à un contrôle ou plus rarement, à mesurer sa variation après que les cellules aient été chargées en chlorure par le biais de capteurs de chlorure (Ludwig et al., 2017; Parrini et al., 2021). Ces capteurs peuvent être des molécules fluorescentes capables d'entrer dans les cellules par un transport passif tel que le dérivé de la quinoléine, le N-(ethoxycarbonylmethyl)-6-methoxyquinolinium bromide (MQAE) (Jayaraman & Verkman, 2000; Medina et al., 2014), ou des protéines fluorescentes modifiées et surexprimées de façon exogène dans les cellules telles que le Chlomeleon ou le ClopHensor (Arosio et al., 2010; Kuner & Augustine, 2000; Medina et al., 2014).

La quinoléine et ses dérivés sont des molécules aromatiques hétérocycliques qui fluorescent lorsqu'elles sont excitées (pic d'excitation du MQAE : 319 nm) en absence de chlorure (Jayaraman & Verkman, 2000). Quand du chlorure est ajouté dans le milieu, l'excitation de la quinoléine entraine sa collision avec l'ion avant qu'elle n'ait le temps de fluorescer, ce qui l'empêche d'émettre de la fluorescence (Jayaraman & Verkman, 2000). Ainsi, la fluorescence de la quinoléine est mesurée afin de déterminer la variation de $[Cl^-]_i$ entre différentes conditions ou après activation des récepteurs GABA-A (Jayaraman & Verkman, 2000; Parrini et al., 2021). $[Cl^-]_i$ peut aussi être estimée par l'analyse de la demi-vie de la fluorescence de la quinoléine après son excitation aigue par un laser (fluorescent lifetime imaging microscopy, FLIM), la vitesse de diminution de la fluorescence étant inversement corrélée à la concentration intracellulaire en chlorure (Weilinger et al., 2022).

Les capteurs de chlorure dérivés de la yellow fluorescent protein (YFP) tels que le Clomeleon et le Cl-Sensor sont des protéines de fusion composées d'une YFP et d'une cyan fluorescent protein (CFP) liées par un domaine de liaison souple (Kuner & Augustine, 2000; Medina et al., 2014). En absence de chlorure, les deux protéines interagissent entrainant un transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET) : lorsqu'elle est excitée autour de 433 nm, la CFP transmet de l'énergie à la YFP qui fluoresce autour de 530 nm (Kuner & Augustine, 2000). La liaison du chlorure à la YFP bloque ce processus de FRET ce qui permet de mesurer les

variations de $[Cl^-]_i$ à partir de la variation de la fluorescence de la YFP lorsque la CFP est excitée (Kuner & Augustine, 2000). L'un des principaux désavantages de cette méthode est que la fluorescence de la YFP est fortement influencée par le pH intracellulaire (Medina et al., 2014).

Enfin, les capteurs de chlorure dérivés de ^{E2}GFP tels que le ClopHensor sont notamment composés d'une green fluorescent protein (GFP) mutante sensible au pH et au chlorure (Arosio et al., 2010; Medina et al., 2014). L'influence du pH sur sa fluorescence dépend de la longueur d'onde avec laquelle elle est excitée tandis que l'effet du chlorure est indépendant de la longueur d'onde d'excitation. Ce double standard permet à l'expérimentateur de s'affranchir de l'influence du pH sur la fluorescence de la GFP en mesurant sa fluorescence à deux longueurs d'ondes, l'une qui correspond à l'émission de la protéine liée à un proton et l'autre qui correspond à l'émission de la protéine sans proton. Le ratio entre ces deux valeurs permet d'estimer l'influence du pH sur la mesure de la concentration en chlorure (Arosio et al., 2010). La ^{E2}GFP est utilisée sous forme de protéine de fusion avec une protéine (DsRed, mCherry, etc.) dont la fluorescence ne dépend ni du pH, ni de la concentration en chlorure et qui est utilisée comme une référence interne (Arosio et al., 2010).

L'ensemble des méthodes présentées jusqu'ici permettent d'évaluer la fonctionnalité de KCC2 en se basant sur des mesures indirectes de $[Cl^-]_i$ ou de sa variation mais ne permettent pas de mesurer directement le transport d'ion par le transporteur. Nous allons maintenant détailler les techniques permettant de mesurer les flux d'ion au travers de KCC2. Ces méthodes sont basées sur l'utilisation de cations monovalents (rubidium, ammonium, thallium) qui se substituent au potassium au niveau de son site de liaison à KCC2 et sont transportés avec le chlorure. Ces ions présentent tous des propriétés chimiques spécifiques (radioactivité, acidité, caractère métallique) permettant de mesurer leur flux, et par conséquent, celui du chlorure (Medina et al., 2014). Lors de ces expériences, la fonction de KCC2 est analysée de manière inversée, le cation est concentré dans le milieu extracellulaire et c'est son influx, ainsi que celui du chlorure, qui est mesuré (Medina et al., 2014). La plus ancienne de ces méthodes est le test d'absorption de l'isotope 86 du rubidium (^{86}Rb), qui est radioactif. L'absorption du rubidium par les cellules est mesurée par l'analyse de la radiation de l'ensemble des cellules après leur lyse et nécessite donc l'utilisation d'une population de cellules homogène telle qu'une lignée cellulaire (Medina et al., 2014; Payne, 1997). L'ammonium (NH_4^+) est une molécule acide qui est aussi transportée par KCC2 (Williams & Payne, 2004). Lorsqu'il est utilisé, des capteurs de pH sont ajoutés au milieu d'incubation afin mesurer l'influx d'ammonium dans les cellules, ce qui permet d'obtenir une résolution à l'échelle cellulaire ou subcellulaire (Williams & Payne, 2004). Enfin, le thallium (Tl^+) est un métal qui est utilisé comme substitut au potassium (A.-M.

Hartmann et al., 2010; D. Zhang et al., 2010). Sa teneur dans les cellules peut être mesurée de manière cellule spécifique en utilisant des colorants sensibles au potassium ou au zinc, qui reconnaissent additionnellement le thallium avec une efficacité variable (A.-M. Hartmann et al., 2010; D. Zhang et al., 2010). Le principal désavantage des méthodes basées sur l'utilisation de substituts au potassium est la non-spécificité de ces derniers pour KCC2. En effet, les cations monovalents précédemment cités se substituent au potassium et sont transportés par divers canaux, transporteurs et pompes (Britten & Blank, 1968; Karlish & Stein, 1982). Les différents ions présentent par ailleurs une affinité différente pour chacun de ces systèmes de transport (Britten & Blank, 1968; Karlish & Stein, 1982). Cela nécessite l'utilisation de contrôles spécifiques tels que des bloqueurs de KCC2 afin d'isoler sa fonction.

c. Maintien de l'inhibition synaptique dans les neurones matures par KCC2

Après la découverte de KCC2 en 1996, les techniques que nous venons de mentionner ont été utilisées pour mettre en évidence qu'il s'agissait du transporteur responsable du maintien d'une faible concentration intra-neuronale de chlorure sur laquelle repose l'inhibition synaptique rapide (Acton et al., 2012; Blaesse et al., 2006; Rivera et al., 1999) . Il a été observé qu'une diminution de son expression via des ARNs anti-sens entraine une forte diminution de la force motrice ($V_m - E_{GABA}$, qui reste cependant positive) qui s'applique sur le chlorure (Rivera et al., 1999). De même, la délétion d'une région spécifique de KCC2, appelée domaine ISO, est suffisante pour entrainer une forte dépolarisation de E_{GABA} (Acton et al., 2012). Ces résultats démontrent que KCC2, via son domaine ISO, assure le maintien du gradient de chlorure entre le milieu intra- et extra-cellulaire des neurones. Le maintien d'une faible concentration intracellulaire de chlorure dans les neurones matures, dû à la prédominance de l'expression de KCC2 sur celle de NKCC1, leur confère un potentiel d'inversion des courants au travers du récepteur GABA-A d'environ -70 mV dans la strate pyramidale de l'hippocampe (Tyzio et al., 2008) . Le potentiel de repos des neurones pyramidaux matures de l'hippocampe se situant autour de -65 mV (Biscoe & Duchen, 1985; Malik et al., 2016), la force motrice du chlorure (ici approximée par $V_m - E_{GABA}$) est positive pour ces neurones. L'activation des récepteurs GABA-A entraine donc un influx de chlorure dans les neurones matures, qui hyperpolarise leur potentiel de membrane.

La fonction de transporteur de KCC2 a majoritairement été analysée indistinctement pour les deux isoformes de la protéine (Friedel et al., 2015; Hübner, Stein, et al., 2001; Pellegrino et al., 2011). Néanmoins, plusieurs études ont étudié l'implication spécifique de KCC2a et KCC2b dans le transport de chlorure. D'une part, il a été démontré qu'une altération spécifique de l'expression de KCC2b entraine une diminution de l'influx de chlorure dans les neurones en

réponse à l'activation des récepteurs GABA-A (Rivera et al., 1999). De même, l'ablation génétique spécifique de KCC2b chez la souris entraine une hyperexcitabilité des neurones de l'hippocampe traduisant un défaut d'inhibition de ces cellules (Woo et al., 2002). Ces deux exemples démontrent que KCC2b joue un rôle essentiel dans le transport de chlorure et l'inhibition synaptique. D'autre part, il a été observé que la surexpression de KCC2a dans des neurones en culture issus d'une lignée murine KCC2 -/- est suffisante pour entrainer une augmentation de la valeur absolue de ΔE_{GABA} (Markkanen et al., 2017). La transfection de cellules HEK-293, qui n'expriment pas KCC2 à l'état endogène, avec des plasmides codant pour l'une ou l'autre des isoformes entraine aussi une forte augmentation de l'import de rubidium 86 (^{86}Rb) par rapport aux cellules contrôles (Markkanen et al., 2017). Cette augmentation semble similaire entre les cellules transfectées avec la construction codant pour KCC2a et KCC2b (Markkanen et al., 2017). Enfin, l'expression de KCC2a ou de KCC2b dans des cellules Neuro-2a, qui présentent un faible transport de chlorure à l'état basal, est suffisante pour provoquer une augmentation de l'export de chlorure, comparable entre les deux isoformes, en réponse à une élévation du chlorure intracellulaire (Ludwig et al., 2017). Ces résultats illustrent que les deux isoformes de KCC2 présentent une capacité d'export du chlorure similaire lorsqu'elles ont des niveaux d'expression semblables. Par ailleurs, l'ablation génétique spécifique de KCC2a chez la souris entraine une diminution transitoire de la fréquence respiratoire et une augmentation des apnées après la naissance (Dubois et al., 2018). Bien que les mécanismes sous-jacents à ce phénotype n'aient pas encore été élucidés, il semble être le résultat d'une activité neuronale anormale dans plusieurs régions du tronc cérébral, une structure qui présente une forte expression de KCC2a, dont le pont et le nerf hypoglosse (Dubois et al., 2018) . La fonction de transporteur de chlorure de KCC2a lui confère donc un rôle majeur dans la modulation de la respiration après la naissance, ce qui est rendu possible par sa prépondérance face à KCC2b dans le tronc cérébral à cette période (Dubois et al., 2018; Uvarov et al., 2009). Cela soulève des interrogations quant à la fonction de KCC2a dans les neurones matures du télencéphale, dans lesquels l'isoforme est peu exprimée et où le maintien de $[Cl^-]_i$ est majoritairement assuré par KCC2b. KCC2a pourrait en effet présenter une fonction spécifique, indépendante du transport de chlorure, dans ces neurones. Comme nous le détaillerons par la suite, l'étude du rôle de KCC2a dans le néocortex et l'hippocampe a fait l'objet de la majeure partie du travail expérimental réalisé au cours de ma thèse (voir Article principal).

d. Mise en place de l'inhibition synaptique au cours du développement

Comme nous l'avons détaillé précédemment, lors du développement les neurones expriment NKCC1b tandis qu'ils présentent de faibles niveaux de KCC2 (Kurki et al., 2023; H. Li et al.,

2002; Rivera et al., 1999). Les neurones immatures ayant un faible ratio KCC2/NKCC1, ils subissent un net import de chlorure et ont une concentration intracellulaire en chlorure située autour de 15 - 50 mM à P0-2, bien plus élevée que celle des neurones matures (Kuner & Augustine, 2000; Tyzio et al., 2007 ; ces études rapportent toutefois de forts écarts dans leur estimation de $[Cl^-]_i$). Cela leur confère un potentiel d'inversion des courants GABAergiques et glycinergiques d'environ -30 à -55 mV (Gonzalez-Islas et al., 2009; Owens et al., 1999; Tyzio et al., 2007). Le potentiel de repos des neurones immatures (V_m) se situant autour de –50 mV (Johansson et al., 1992; Lombardi et al., 2018), la force motrice du chlorure est généralement négative chez ces neurones. Par conséquent, l'activation des récepteurs GABA-A et glycinergiques provoque un efflux de chlorure chez les neurones immatures, entrainant la dépolarisation de leur potentiel de membrane (Hübner, Stein, et al., 2001; Kirmse et al., 2015; Rivera et al., 1999; Figure 7). Comme nous le verrons par la suite, cette dépolarisation peut être associée, selon le contexte, à l'excitation ou à l'inhibition des neurones.

La maturation neuronale est associée à une forte augmentation de l'expression de KCC2b, tandis que l'expression de NKCC1b semble stagner, voire diminuer (Kurki et al., 2023; H. Li et al., 2002; Rivera et al., 1999). L'augmentation de l'expression de KCC2b provoque une variation développementale de l'effet de l'activation des récepteurs GABA-A, que l'on appelle le *GABA shift* (Ben-Ari, 2002; Rivera et al., 2005; Figure 7). En effet, il existe une forte corrélation entre le niveau d'expression de KCC2 et l'effet du GABA sur le potentiel de membrane des neurones : une faible expression de KCC2 est associée à un effet dépolarisant du GABA tandis qu'une forte expression de KCC2 est corrélée à un effet hyperpolarisant (Rivera et al., 1999).

Dès le début du développement du SNC et jusqu'à environ P4 dans l'hippocampe, les neurones immatures ont une concentration en chlorure particulièrement élevée, par conséquent le GABA semble entrainer leur dépolarisation et leur excitation aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Gao & Van Den Pol, 2001; Murata & Colonnese, 2020; Obata et al., 1978; Owens & Kriegstein, 2002; Valeeva et al., 2013; mais voir partie II.1.1). Au fur et à mesure que les neurones maturent et expriment KCC2, il y a une diminution de leur concentration en chlorure (Kuner & Augustine, 2000). Pendant une période transitoire s'étendant jusqu'à la deuxième semaine après la naissance chez la souris, le GABA entraine toujours la dépolarisation du potentiel de membrane des neurones mais celle-ci est associée à leur inhibition (Kirmse et al., 2015; Obata et al., 1978; Owens & Kriegstein, 2002). Cela est dû à un phénomène appelé effet de shunt ou *shunting inhibition* (Ben-Ari, 2002; Staley & Mody, 1992).

Le principe de cet effet est que l'ouverture des canaux associés aux récepteurs GABA-A, même lorsqu'elle entraine un efflux de chlorure, provoque une augmentation de la perméabilité de la membrane. Cela se traduit par la réduction de la résistance d'entrée (R_{in}) de la cellule (Ben-Ari, 2002; S. J. Zhang & Jackson, 1995). La diminution de la résistance membranaire a deux conséquences principales. D'une part, elle tamponne l'augmentation du potentiel de membrane provoquée par l'influx de chlorure en abaissant ce dernier selon la loi d'Ohm : $\Delta V_m = I \times R_{in}$ (avec ΔV_m en volts, R_{in} en ohms et I en ampères). Cela empêche le potentiel de membrane d'être suffisamment dépolarisé pour atteindre le seuil de déclenchement des potentiels d'action (situé autour de –55 mV, il dépend du potentiel de repos et de la densité des canaux sodiques) (Platkiewicz & Brette, 2010; S. J. Zhang & Jackson, 1995). D'autre part, la chute de la résistance membranaire entraine la diminution de la constante de temps de la membrane ($\tau_m = R_{in} \times C_m$, avec τ_m en secondes, R_{in} en ohms, C_m en farads) qui représente le temps au bout duquel une variation de potentiel associée à un courant post-synaptique a atteint 1-1/e de son amplitude finale (~63% de ΔV_m) (Staley & Mody, 1992). La diminution de la constante de temps de la membrane réduit la fenêtre de temps pendant laquelle a lieu la sommation temporelle des potentiels post-synaptiques excitateurs (PPSEs) et réduit donc la probabilité que le neurone génère un potentiel d'action. Enfin, entre P7 et P15 pour les neurones pyramidaux hippocampiques et corticaux, l'activation des récepteurs GABA-A commence à provoquer une hyperpolarisation du potentiel de membrane des neurones, entrainant leur inhibition (Murata & Colonnese, 2020; Rivera et al., 1999, 2005; Valeeva et al., 2016).

Enfin, le groupe de Y. Ben Ari à Marseille a mis en évidence l'existence d'un changement transitoire de la réponse au GABA juste avant la naissance, entre E20 et P0 chez le rat, lors duquel l'activation des récepteurs GABA-A entraine l'hyperpolarisation et l'inhibition des neurones (Tyzio et al., 2006). Cette inversion temporaire de l'effet du GABA est due à la forte production d'ocytocine par la mère juste avant la naissance, qui provoque une diminution de la fonction de NKCC1 ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation et de la stabilité membranaire de KCC2 (Leonzino et al., 2016; Tyzio et al., 2006).

Le déplacement progressif de la polarité de la signalisation GABAergique (*GABA shift*) suit une cinétique différente selon les types neuronaux et dépend directement de l'évolution de l'expression de KCC2 (Hübner, Stein, et al., 2001; Rivera et al., 1999; Szrinivasan et al., 2025). Par ailleurs, comme nous le verrons dans la partie II.3.3, certains types de neurones tels que les cellules Cajal-Retzius, ne subissent pas de *GABA shift* et maintiennent une réponse dépolarisante à l'activation des récepteurs GABA-A (Marchionni et al., 2010; Quattrocolo & Maccaferri, 2013).

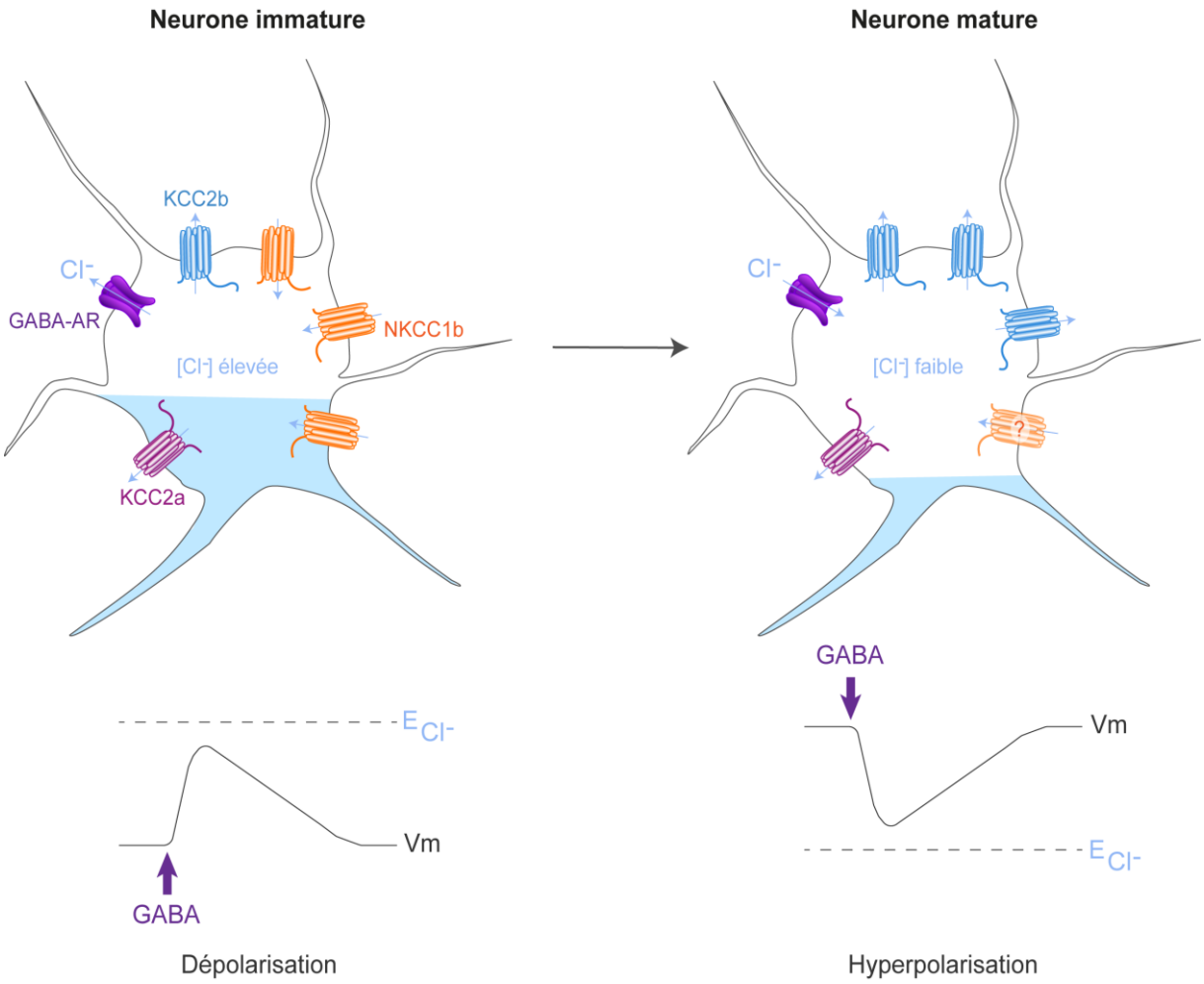


Figure 7. Modifications moléculaires à l'origine du *GABA shift*.

Les neurones immatures sont caractérisés par une faible expression de KCC2a/KCC2b et une expression plus élevée de NKCC1b. Ils présentent donc une concentration intracellulaire en chlorure élevée et l'activation de leurs récepteurs GABA-A entraine un flux sortant de chlorure, qui est à l'origine de la dépolarisation de leur potentiel de membrane. A l'inverse, les neurones matures expriment fortement KCC2b et faiblement NKCC1b. Ils ont donc une faible concentration intracellulaire en chlorure et l'activation de leurs récepteurs GABA-A entraine un flux entrant de l'anion qui provoque l'hyperpolarisation de leur potentiel de membrane.

3.2. Fonctions de KCC2 qui découlent de son rôle de transporteur

En plus de son rôle essentiel dans l'inhibition synaptique, KCC2 assure un ensemble d'autres fonctions qui reposent sur le transport de chlorure et de potassium. Nous allons mentionner ici les différents rôles de KCC2 dans les neurones matures, sa fonction lors du développement sera détaillée dans la partie II.

a. Régulation du volume des neurones

Comme nous l'avons expliqué dans la partie I.1.4, les CCCs régulent le volume des cellules en fonction des stress osmotiques auxquels elles sont soumises. Cette régulation est particulièrement importante dans le cerveau, dont le volume est restreint par le crâne. Son gonflement peut entrainer la formation d'un œdème cérébral qui augmente la pression intracrânienne tandis que son rétrécissement peut abîmer les vaisseaux sanguins corticaux et provoquer la formation d'hématomes sous-duraux (Kahle et al., 2015). De plus, au-delà du danger associé aux changements volumiques du cerveau, la variation du volume des neurones affecte leurs propriétés électrophysiologiques (Pasantes-Morales & Tuz, 2006). Contrairement à la majorité des cellules, les neurones n'expriment pas ou peu d'aquaporines (Papadopoulos & Verkman, 2013). De ce fait, il a été observé que le stress osmotique n'affecte pas ou peu leur volume, et les variations volumiques du cerveau en condition de stress osmotique semblent essentiellement dues aux changements de volume des cellules non-neuronales, telles que les astrocytes (Andrew et al., 2006). Néanmoins, le volume des neurones augmente lorsque ces derniers sont placés en conditions pathologiques telles que lors d'une déprivation en oxygène/glucose ou d'une dépolarisation prolongée, selon un phénomène ne mettant *a priori* pas en jeu les aquaporines (Andrew et al., 2006). Dans ce cadre, la participation des différents KCCs à la restauration du volume des neurones n'a pas été étudiée en détail mais il semble probable que les KCCs qui sont le plus exprimés dans les neurones (KCC2, KCC3 et KCC4) jouent un rôle dans ce processus (Department of Anesthesiology and Neuroscience Graduate Program, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN, USA et al., 2020; Kahle et al., 2015). En particulier, KCC2 compense l'entrée d'eau dans les neurones engendrée par la transmission glutamatergique ionotropique en assurant son efflux lorsqu'il transporte des ions (Jourdain et al., 2011).

b. Régulation de la survie des neurones matures

Il a été proposé que KCC2 régule la survie des neurones matures via un processus qui dépend de sa fonction de transporteur de chlorure (Kelley et al., 2018; Kontou et al., 2021; Pellegrino et al., 2011). En effet, plusieurs études ont démontré qu'altérer l'expression du transporteur dans des neurones en culture via de l'interférence ARN (Pellegrino et al., 2011) ou par la délétion de ses exons 22 à 25 (Kelley et al., 2018; Kontou et al., 2021) entraine une diminution de la survie neuronale. De même, l'inhibition pharmacologique de KCC2 et la surexpression d'une protéine KCC2 non fonctionnelle entrainent une diminution de la survie des neurones, démontrant que le rôle protecteur de la protéine dépend de sa fonction de transporteur (Kontou et al., 2021; Pellegrino et al., 2011). Nous n'avons néanmoins pas observé d'effet de la

suppression de KCC2 sur la survie neuronale au sein de notre équipe (Gauvain et al., 2011; Goutierre et al., 2019; Simonnet et al., 2023). Cette discordance pourrait venir de variations dans l'efficacité de la suppression du transporteur, la délétion des exons 22 à 25 entrainant probablement l'expression d'une protéine tronquée, qui est ensuite dégradée, plutôt qu'une absence de transcription ou de traduction (Kelley et al., 2018; Kontou et al., 2021). Cela peut aussi provenir de différences dans les conditions expérimentales, telles que dans l'entretien des cultures.

La perte de KCC2 entraine la mort des neurones en provoquant l'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose chez ces derniers (Kontou et al., 2021). L'apoptose est un phénomène de mort cellulaire programmée, lors duquel la cellule suit un ensemble d'étapes précises menant à son démantèlement (Wong & Marín, 2019). Elle peut être déclenchée par deux processus différents selon l'origine du signal de mort cellulaire : si le signal provient de l'extérieur de la cellule, nous parlons de voie extrinsèque tandis que nous parlons de voie intrinsèque s'il vient de l'intérieur de la cellule (Fulda & Debatin, 2006; Wong & Marín, 2019). La voie extrinsèque de l'apoptose est déclenchée par l'activation de récepteurs à dépendance ou de récepteurs de mort cellulaire (tels que les récepteurs Fas ou $p75^{NTR}$), qui entraine le clivage successif de certaines cystéines-protéases (caspases) et résulte en l'activation de la caspase-3 (Bhakar et al., 2003; Fulda & Debatin, 2006; Wong & Marín, 2019). La caspase-3 activée clive à son tour de nombreux composants structuraux de la cellule et provoque son démantèlement (Fulda & Debatin, 2006). Le mécanisme par lequel la perte de fonction de KCC2 active la voie extrinsèque de l'apoptose n'est pas encore entièrement résolu mais pourrait reposer sur la libération de la protéine du complément C1q, qui interagit avec KCC2 lorsque celui-ci est exprimé (Ji et al., 2025).

L'excitotoxicité est un mécanisme par lequel l'activation intensive des récepteurs à l'acide N-méthyl-D-aspartique (NMDA) par le glutamate entraine un influx massif de calcium dans les neurones, provoquant leur gonflement et leur mort cellulaire via un phénomène d'apoptose et/ou de nécrose (Dong et al., 2009). Il a été démontré que la diminution de l'expression de KCC2 par interférence ARN ainsi que l'inhibition de sa fonction de transporteur altèrent fortement le nombre de neurones survivant à un traitement avec une dose toxique de NMDA (Pellegrino et al., 2011). Cela démontre que KCC2 ne régule pas uniquement la survie des neurones en conditions basales mais joue aussi un rôle protecteur lorsque ces derniers subissent un choc excito-toxique. Il est par ailleurs possible que l'augmentation de la sensibilité des neurones à l'excitotoxicité en réponse à la perte de KCC2 soit à l'origine de l'augmentation de la mort neuronale chez les cellules délétées pour le transporteur.

c. Régulation locale de $[K^+]_e$ au niveau des synapses excitatrices

La transmission synaptique glutamatergique rapide repose majoritairement sur l'activation initiale des récepteurs à l'α-amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate (AMPA) par le glutamate (Traynelis et al., 2010). L'ouverture du canal des récepteurs AMPA entraine un influx de sodium dans le neurone post-synaptique provoquant la dépolarisation de son potentiel de membrane (Traynelis et al., 2010). Cette dépolarisation, associée à la libération de glutamate par le neurone pré-synaptique, active les récepteurs NMDA provoquant un influx de calcium et de sodium dans le neurone post-synaptique (Traynelis et al., 2010). L'activation des récepteurs NMDA est aussi à l'origine d'un efflux de potassium, à la fois directement au travers de ces récepteurs (Shih et al., 2013; Tyurikova et al., 2022) et via des canaux potassiques à faible conductance activés par le calcium (SK) (Ngo-Anh et al., 2005). Cette libération de potassium résulte en une élévation de sa concentration dans la fente synaptique $[K^+]_e$, ce qui joue un rôle important dans la régulation de la libération de glutamate par le neurone pré-synaptique (Shih et al., 2013). Le potassium libéré dans la fente synaptique est majoritairement recapturé par les astrocytes, dont la membrane présente une perméabilité élevée pour cet ion (Bellot-Saez et al., 2017).

Il a récemment été démontré qu'en addition à ce phénomène, KCC2 régule localement $[K^+]_e$ à proximité des épines dendritiques (Byvaltcev et al., 2023; Weilinger et al., 2022). En effet, l'élévation de $[K^+]_e$ dans la fente synaptique à la suite d'une stimulation suffisamment forte modifie localement le gradient de potassium et entraine l'inversion du transport des ions par KCC2 qui importe le chlorure et le potassium dans le compartiment post-synaptique (Byvaltcev et al., 2023; Weilinger et al., 2022). Ce mécanisme joue un rôle dans le fonctionnement physiologique des synapses excitatrices. L'augmentation de $[K^+]_e$ dans la fente synaptique dépolarise la terminaison pré-synaptique et augmente la probabilité de libération du glutamate (Shih et al., 2013). En tamponnant rapidement la concentration de potassium en réponse à son augmentation, KCC2 limite ainsi la transmission glutamatergique à l'échelle de la synapse et régule la fréquence des potentiels post-synaptiques excitateurs (PPSEs) (Byvaltcev et al., 2023). Ce mécanisme est aussi mis en jeu dans la réponse des neurones à des conditions excito-toxiques (Weilinger et al., 2022). L'excitotoxicité est associée au gonflement des neurones, notamment au niveau de leurs dendrites qui forment des bourgeonnements (Guo et al., 2012). Il a récemment été démontré que ces gonflements dendritiques sont causés par un influx local d'eau, provoqué par l'import de chlorure par KCC2 dans certaines régions dendritiques en réponse à une stimulation intense des récepteurs NMDA (Weilinger et al., 2022). Ainsi, KCC2 agit comme un senseur de potassium au niveau des épines dendritiques.

Il régule la concentration du potassium dans la fente synaptique lorsque celle-ci varie dans un intervalle physiologique et participe à la mise en place d'un mécanisme de défense de la cellule lorsque $[K^+]_e$ est trop élevée et témoigne d'une stimulation présynaptique toxique pour le neurone post-synaptique.

3.3. Fonctions de KCC2 indépendantes de son rôle de transporteur

KCC2 participe à un ensemble de fonctions dites non-canoniques, qui sont indépendantes de son rôle de transporteur et qui reposent sur son interaction structurale avec d'autres protéines. Au niveau des épines dendritiques, KCC2 interagit étroitement avec le cytosquelette d'actine et régule sa stabilité (Chevy et al., 2015; H. Li et al., 2007; Llano et al., 2015; Figure 8). Cela lui permet notamment de réguler la motilité des épines dendritiques, qui est essentielle pour le raffinement des connexions neuronales (Llano et al., 2015). Ces interactions lui confèrent aussi un rôle de protéine d'échafaudage et lui permettent d'étroitement réguler la stabilité membranaire des récepteurs AMPA exprimant la sous-unité GluA1 (aussi appelée GluR1) selon deux mécanismes complémentaires (Chevy et al., 2015; Gauvain et al., 2011; Figure 8). D'une part, KCC2 et GluA1 interagissent tous les deux avec 4.1N, une protéine d'échafaudage neuronale qui lie plusieurs protéines membranaires à la forme filamenteuse et polymérisée de l'actine, appelée actine F (H. Li et al., 2007; Shen et al., 2000). L'ancrage de GluA1 et KCC2 à l'actine F par 4.1N joue un rôle essentiel dans la stabilisation membranaire de ces deux protéines. La délétion du domaine de liaison à 4.1N de GluA1, tout comme le désassemblage des filaments d'actine entrainent une forte diminution de l'expression de GluA1 à la membrane plasmique (D.-T. Lin et al., 2009; Shen et al., 2000). De même, la perte d'expression de 4.1N et le désassemblage des filaments d'actine augmentent la diffusion latérale de KCC2 (Chamma et al., 2013). La perte d'expression de KCC2 entraine aussi une diminution de la formation d'agrégats des récepteurs AMPA à la membrane et une augmentation de leur diffusion latérale, ce qui entraine une diminution de l'efficacité de l'excitation synaptique (Gauvain et al., 2011). Il a donc été proposé que KCC2 participe à la formation d'un complexe impliquant GluA1, 4.1N et le cytosquelette d'actine au niveau des épines dendritiques. Ce complexe serait responsable de l'agrégation de GluA1 à la membrane plasmique et favoriserait la transmission synaptique excitatrice (Gauvain et al., 2011).

D'autre part, KCC2 régule l'expression membranaire de GluA1 en réponse à l'activité neuronale via le recrutement de β-PIX et l'inhibition de la voie β-PIX/Rac1/cofiline (Chevy et al., 2015; Llano et al., 2015). Rac1 est une Rho GTPase, c'est à dire une petite protéine G qui alterne entre un état inactif lié au GDP et un état actif lié au GTP et agit comme un interrupteur

pour de nombreux processus cellulaires dont la régulation de la stabilité de l'actine F (N. Yang et al., 1998). Son activité est régulée par β-PIX, une protéine de la famille des facteurs d'échange nucléotidiques (guanine nucleotide exchange factors, GEFs) qui active Rac1 en accélérant la dissociation du GDP qui lui est associé et en favorisant la formation d'un complexe Rac1-GTP actif (Manser et al., 1998). Une fois activée, Rac1 est à l'origine de l'activation d'une cascade de kinases entrainant la phosphorylation successive de la p21-activated kinase 1 (Pak1), de la LIM kinase (LIMK) et de la cofiline (Delorme-Walker et al., 2011; Edwards et al., 1999). La cofiline est une protéine ubiquitaire qui, lorsqu'elle est active, dépolymérise les filaments d'actine et entraine donc une perte de stabilité cette dernière (Bernstein & Bamburg, 2010). La phosphorylation de la sérine 3 de la cofiline par la LIM kinase entraine son inactivation et favorise la stabilité de l'actine F (Bernstein & Bamburg, 2010). Il a été démontré que l'interaction de KCC2 avec β-PIX via son domaine C-terminal empêche β-PIX d'activer Rac1 et inhibe ainsi la cascade de kinase (Chevy et al., 2015; Llano et al., 2015). Cela maintient la cofiline dans un état déphosphorylé actif et assure une certaine instabilité de l'actine dans les épines dendritiques (Chevy et al., 2015; Llano et al., 2015). Le maintien de la labilité de l'actine par cette voie favorise l'insertion membranaire des récepteurs AMPA contenant GluA1 à la suite d'un processus de potentialisation à long terme, probablement en permettant le transport des vésicules contenant GluA1 vers la membrane (Chevy et al., 2015; J. Gu et al., 2010). Il semblerait donc que l'expression membranaire de GluA1 au niveau des épines dendritiques requière un équilibre complexe dans la stabilité du cytosquelette d'actine. Celui-ci doit être suffisamment stable pour permettre la stabilisation de GluA1 par 4.1N et KCC2 en conditions basales et suffisamment labile pour permettre son transport jusqu'à la membrane dans un contexte de potentialisation synaptique à long terme.

Enfin, KCC2 interagit avec le canal potassique de fuite à deux pores TWIK-related acid-sensitive K^+ 3 (Task-3) et stabilise son expression membranaire en limitant son endocytose (Goutierre et al., 2019). Les canaux potassiques de fuite sont des canaux dont l'activation est indépendante du potentiel de membrane et qui maintiennent ainsi un efflux quasiment continu de potassium (Enyedi & Czirják, 2010). Ils maintiennent le potentiel de repos de la membrane à une valeur proche du potentiel d'équilibre du potassium et participent à la repolarisation de la membrane (Enyedi & Czirják, 2010). La diminution de l'expression de KCC2 par de l'interférence ARN entraine une augmentation de l'excitabilité neuronale ainsi qu'une dépolarisation du potentiel de membrane des neurones, phénomènes qui ne sont pas aggravés par l'application de bupivacaine, un bloqueur des canaux K2P (Goutierre et al., 2019). Cela démontre que KCC2 régule indirectement le potentiel de membrane ainsi que l'excitabilité neuronale via son interaction avec Task-3 (Goutierre et al., 2019).

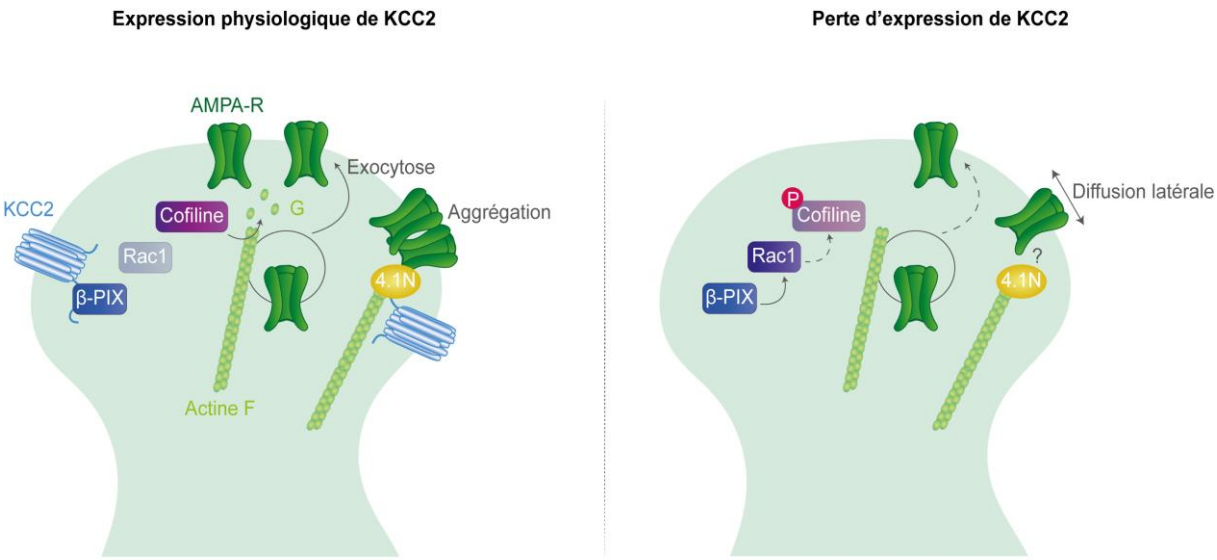


Figure 8. Modèle proposé pour expliquer la régulation de l'expression membranaire des récepteurs AMPA par KCC2.

Dans les neurones exprimant KCC2, la liaison de β-PIX au transporteur l'empêche d'activer Rac1. Cela est responsable du maintien de l'activation de la cofiline qui dépolymérise les filaments d'actine. Cette dépolymérisation facilite l'insertion membranaire des récepteurs AMPA exprimant GluA1 selon un mécanisme encore inconnu mais qui pourrait résulter de la facilitation du transport des vésicules contenant ces récepteurs jusqu'à la membrane ou de leur exocytose (voir Eitzen et al., 2003). Une fois les récepteurs AMPA exprimés à la membrane, leur interaction avec KCC2 et les filaments d'actine via la protéine 4.1N favorise leur agrégation et leur stabilité. A l'inverse, dans les neurones n'exprimant pas ou peu KCC2, β-PIX active Rac1 ce qui résulte en une inhibition de la cofiline. Le maintien de la stabilité des filaments d'actine empêche l'insertion membranaire des récepteurs AMPA. En parallèle, l'absence d'interaction entre KCC2 et les récepteurs AMPA à la membrane augmente la diffusion latérale de ces derniers et diminue leur stabilité. Cela pourrait être dû à une stabilisation ou un renforcement de l'interaction entre 4.1N et les récepteurs AMPA en présence de KCC2.

4. Régulation de KCC2 dans les neurones matures

KCC2 est une protéine jouant un rôle essentiel dans les neurones matures. Par conséquent, son expression globale et membranaire sont étroitement régulées par divers mécanismes qui incluent des formes de régulation transcriptionnelle, post-traductionnelle ainsi qu'un contrôle de son endocytose et de sa dégradation. Nous allons d'abord nous intéresser à la régulation transcriptionnelle de *Slc12a5*.

4.1. Régulation transcriptionnelle

a. Régulation par le système RE-1/REST

Comme nous l'avons mentionné dans la partie I.2.1., aucune séquence régulatrice propre au transcrit codant pour KCC2a n'a été identifiée à ce jour. Par conséquent, la majorité des études portant sur la régulation transcriptionnelle de *Slc12a5* concernent la régulation du transcrit codant pour KCC2b. L'expression de KCC2b est contrôlée au niveau transcriptionnel par plusieurs mécanismes complémentaires, certains régulant aussi les modifications post-traductionnelles de la protéine comme nous le verrons dans la partie I.4.4. Parmi ces mécanismes, le système de répression transcriptionnelle RE-1/REST est responsable de la spécificité de l'expression de KCC2 dans les neurones (Karadsheh & Delpire, 2001; Uvarov et al., 2005; Yeo et al., 2009). Ce système repose sur la liaison du facteur de transcription à doigts de zinc REST (repressor element 1 silencing transcription factor), aussi appelé NRSF (neuron-restrictive silencer factor), à une séquence de 21-23 pb appelée RE-1 (repressor element 1) ou NRSE (neuron-restrictive silencer elements) (Kraner et al., 1992; Mori et al., 1992; X.-J. Su et al., 2022). La liaison de REST à RE-1 entraine le recrutement d'effecteurs épigénétiques qui s'associent en complexe avec REST et agissent en synergie pour inhiber l'expression du gène en aval (X.-J. Su et al., 2022). Le domaine N-terminal de REST recrute notamment un complexe d'histone-désacétylases (HDACs) de type Sin3A/B. Ce complexe désacétyle différentes lysines appartenant aux histones 3 et 4 des nucléosomes, entrainant une compaction l'ADN autour de ces derniers et le rendant inaccessible aux protéines responsables de la transcription (Milazzo et al., 2020; X.-J. Su et al., 2022). Le domaine C-terminal de REST recrute un complexe d'histone-désacétylases de type corépresseur de REST (coREST). Ce complexe désacétyle et déméthyle plusieurs lysines de l'histone 3 des nucléosomes résultant en une compaction de la chromatine (Milazzo et al., 2020; X.-J. Su et al., 2022). CoREST est aussi responsable du recrutement d'autres effecteurs épigénétiques tels que HDAC1, HDAC2 et MeCP2 (methyl-CpG-binding protein-2) qui participent à la répression de l'expression du gène situé en aval de RE-1 (X.-J. Su et al., 2022). Les séquences RE-1 sont généralement localisées dans le promoteur de gènes spécifiquement exprimés dans les neurones (Mori et al., 1992; Schoch et al., 1996; Schoenherr & Anderson, 1995). REST est fortement exprimé dans la majorité des types cellulaires excepté les neurones matures où son expression est réprimée par divers processus transcriptionnels ainsi que par de l'épissage alternatif (Kraner et al., 1992; Nakano et al., 2019; Schoenherr & Anderson, 1995). Cela est responsable de l'inhibition de l'expression des gènes spécifiques aux neurones dans les autres types cellulaires. Par ailleurs, l'augmentation de l'expression des gènes spécifiquement exprimés dans les neurones au cours du développement est corrélée avec une diminution progressive de l'expression de REST (Schoenherr & Anderson, 1995) et la

perte d'expression de REST dans des progéniteurs de cellules en grain à neurogenèse adulte promeut leur différenciation (H. J. Kim et al., 2015). La diminution développementale de l'expression de REST est donc responsable de l'expression progressive des gènes neuronaux et de la différenciation neuronale.

La région du génome dans laquelle est situé *Slc12a5* contient deux séquences RE-1 distinctes, l'une 1.7 kpb en amont du TSS de KCC2b et l'autre dans l'intron 1 du gène (voir partie I.2.1). La première séquence à avoir été identifiée est celle localisée dans l'intron 1 du gène (Karadsheh & Delpire, 2001). La transfection de cellules hétérologues avec un plasmide contenant le gène de la luciférase en aval de la séquence régulatrice de *Slc12a5* a permis d'observer que la séquence RE-1 localisée dans l'intron 1 du gène semble suffisante pour permettre l'inhibition du gène rapporteur par REST (Karadsheh & Delpire, 2001; Uvarov et al., 2005; Yeo et al., 2009). Pourtant, des souris mutantes avec le gène de la luciférase en aval de la région régulatrice de *Slc12a5* dont la séquence RE-1 a été supprimée présentent une expression uniquement neuronale de la luciférase, malgré l'absence de régulation par le système RE-1/REST (Uvarov et al., 2005). Ce résultat, en apparence surprenant, sera expliqué quelques années plus tard par l'existence d'une seconde séquence RE-1 dans la région régulatrice de *Slc12a5* (Yeo et al., 2009). La présence des deux séquences RE-1, de part et d'autre du TSS de KCC2b, est nécessaire pour l'inhibition de KCC2 dans les cellules non-neuronales ainsi que dans les neurones immatures (Yeo et al., 2009). Néanmoins, le système RE-1/REST n'est pas responsable de l'augmentation neurodéveloppementale de l'expression de KCC2 puisque celle-ci a lieu même en absence des séquences RE-1 (Yeo et al., 2009).

b. Régulation par Egr4

Egr4 (aussi appelé NGFI-C) est un facteur de transcription à doigts de zinc codé par un gène de type précoce immédiat et exprimé quasiment exclusivement dans le cerveau (Crosby et al., 1992 ; The Human Protein Atlas). Cette protéine n'est pas exprimée chez l'embryon et subit une augmentation développementale de son expression entre la première et la troisième semaine après la naissance chez le rat (Crosby et al., 1992). La présence d'un site de liaison de Egr4 dans la séquence régulatrice de KCC2b ainsi que la similitude de l'évolution de l'expression des deux protéines au cours du développement ont mené à suspecter l'existence d'une régulation transcriptionnelle de *Slc12a5* par Egr4 (Uvarov et al., 2006). La transfection de neurones en culture avec une construction contenant le gène de la luciférase en aval du promoteur de KCC2b a démontré que la perte d'expression de Egr4 entraine une nette diminution de l'activation du promoteur de KCC2b (Uvarov et al., 2006). De même, la

transfection de cellules N2a avec des plasmides contenant le gène de la luciférase en aval de différents fragments de la région régulatrice de KCC2 a mis en évidence que la liaison de Egr4 au promoteur de KCC2b est nécessaire pour induire une forte augmentation de son activation (Uvarov et al., 2006). D'autres expériences, non illustrées dans cette étude, auraient aussi permis de mettre en évidence que Egr4 est requis pour l'augmentation neurodéveloppementale de l'activité du promoteur de KCC2b (Uvarov et al., 2006). Egr4 est donc une protéine essentielle pour la transcription de KCC2b, notamment en réponse à l'activité neuronale comme nous le verrons dans le paragraphe suivant. Il est aussi probable que Egr4 soit à l'origine de l'augmentation neurodéveloppementale de l'expression de KCC2b, bien qu'il manque de données concrètes confirmant cette hypothèse.

c. Régulation par le BDNF

L'expression de *Slc12a5* est fortement régulée par un ensemble de cascades complexes mettant en jeu le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (brain derived neurotrophic factor, BDNF). Le BDNF est une protéine de la famille des neurotrophines, des facteurs de croissance impliqués dans la différenciation, le guidage axonal et la survie des neurones ainsi que dans la plasticité synaptique (Lessmann & Brigadski, 2009; Schirò et al., 2022). Tout comme les autres neurotrophines, le BDNF est initialement traduit chez la souris sous forme d'un précurseur de 249 acides aminés (pré-proBDNF), qui donne après clivage du peptide signal un pro-BDNF de 231 acides aminés, lui-même clivé en une forme mature de 119 acides aminés (mBDNF) (Lessmann & Brigadski, 2009). Le pro-BDNF et le mBDNF peuvent être sécrétés par les neurones selon deux mécanismes différents : la voie dite régulée ou dépendante de l'activité, lors de laquelle le BDNF est libéré par le neurone post-synaptique en réponse à une élévation de sa concentration intracellulaire en calcium, et la voie constitutive, lors de laquelle le BDNF est libéré par le neurone indépendamment de son activité (Brigadski & Leßmann, 2020; Kuczewski et al., 2009). Dans le cadre de la voie régulée, l'excitation du neurone entraine une augmentation de sa concentration intracellulaire en calcium, ce qui active la transcription du BDNF et accroit l'exocytose des vésicules qui le contiennent activité (Brigadski & Leßmann, 2020). Le BDNF est aussi secrété par différents types de cellules gliales en réponse à certains neurotransmetteurs, neuropeptides et facteurs pro-inflammatoires (Brigadski & Leßmann, 2020). L'expression des deux formes du BDNF est régulée différentiellement lors du développement (Menshanov et al., 2015; W. Sun et al., 2021; J. Yang et al., 2009). Bien que les différentes études sur le sujet présentent des résultats parfois contradictoires, elles semblent indiquer que le pro-BDNF est la forme majoritaire lors de la période périnatale tandis que le mBDNF prédomine à l'âge adulte (Menshanov et al., 2015; W. Sun et al., 2021; J. Yang et al., 2009). Chacune des formes du BDNF se lie à un

récepteur qui lui est spécifique, ce qui entraine l'activation de voies de signalisation différentes (Huang & Reichardt, 2003; Schirò et al., 2022).

Le mBDNF se lie au récepteur TrkB (tropomyosin receptor kinase B), entrainant sa dimérisation et la transphosphorylation d'une tyrosine de chacun de ses dimères (Tyr816 and Tyr515) par le domaine de type kinase du dimère opposé (Huang & Reichardt, 2003; Lee-Hotta et al., 2019; Schirò et al., 2022). La stimulation de TrkB peut entrainer l'activation de trois cascades de signalisation différentes : la voie de la phospholipase PLC_{γ}, la cascade MAPK/ERK et la voie PI3K/Akt (Huang & Reichardt, 2003; 2019; Schirò et al., 2022). La phosphorylation de la tyrosine 816 de TrkB entraine le recrutement de la phospholipase PLC_{γ} et son activation (Lee-Hotta et al., 2019; Schirò et al., 2022). L'activation de PLC_{γ} lui permet de cliver le phospholipide membranaire PIP2 et de former de l'inositol trisphosphate (IP3), qui provoque la libération de calcium par le réticulum endoplasmique (Huang & Reichardt, 2003). L'élévation de la concentration intracellulaire en calcium est ensuite responsable de l'activation de la protéine-kinase Ca2+/calmoduline-dépendante (CaMKII) qui phosphoryle et active le facteur de transcription CREB (cAMP response element binding protein) (Huang & Reichardt, 2003; Schirò et al., 2022). CREB induit alors l'expression de différents gènes mis en jeu dans la survie et la différenciation des neurones (Huang & Reichardt, 2003). La phosphorylation de la tyrosine 515 de TrkB entraine successivement la liaison de la protéine adaptatrice Shc, sa phosphorylation et le recrutement d'une autre protéine adaptatrice (Grb2) par Shc (Huang & Reichardt, 2003; Lee-Hotta et al., 2019; Schirò et al., 2022). Grb2 présente la capacité de recruter différentes protéines (SOS ou Gab1 et Gab2) de façon mutuellement exclusive (Huang & Reichardt, 2003; Schirò et al., 2022). Le recrutement du facteur d'échange nucléotidique (SOS) accélère l'activation de Ras. Cela active la voie Ras/Raf/MEK/ERK et induit la transcription de gènes impliqués dans la différenciation cellulaire (Huang & Reichardt, 2003; Schirò et al., 2022). A l'inverse, la liaison entre Grb2, Gab1 et Gab2 active la voie PI3K/Akt qui joue un rôle essentiel dans la survie des cellules (Huang & Reichardt, 2003; Schirò et al., 2022).

Le pro-BDNF se lie au récepteur de neurotrophines $p75^{NTR}$, un dimère qui appartient à la superfamille des récepteurs de TNF, ainsi qu'à son corécepteur, la sortiline (Ibáñez & Simi, 2012; Schirò et al., 2022). La liaison du pro-BDNF à $p75^{NTR}$ entraine à son tour un changement de conformation du récepteur qui résulte en l'exposition des sites actifs du domaine pro-apoptotique de ses monomères (Ibáñez & Simi, 2012). Les domaines pro-apoptotiques recrutent alors diverses protéines impliquées dans l'activation des voies NFκB et c-Jun kinase (JNK) (Ibáñez & Simi, 2012). L'activation de la voie NFκB résulte en l'expression de gènes

pro-inflammatoires et favorisant la survie des cellules tandis que l'activation de la voie JNK résulte en l'expression de gènes pro-apoptotiques (Ibáñez & Simi, 2012).

Le BDNF régule la transcription de KCC2b selon un mécanisme particulièrement complexe qui dépend de la maturité neuronale ainsi que de la forme de BDNF considérée (Figure 9). Il ne semble en revanche pas avoir d'effet sur l'expression transcriptionnelle de KCC2a (Ludwig, Uvarov, Soni, et al., 2011). Dans les neurones immatures, l'activation des récepteurs TrkB par un traitement aigu au mBDNF entraine rapidement la phosphorylation des kinases Erk1 et 2 et résulte en une augmentation de l'expression protéique de KCC2 (Ludwig, Uvarov, Soni, et al., 2011). L'effet du mBDNF sur la phosphorylation des protéines Erk est aboli lorsque les protéine-kinases activées par les mitogènes (MEK) sont inhibées, ce qui démontre que la stimulation de TrkB active la voie MAPK/ERK (Ludwig, Uvarov, Soni, et al., 2011). Par ailleurs, il est connu que le mBDNF induit l'expression de diverses protéines de la famille Erg via la voie MAPK/ERK (Calella et al., 2007; Roberts et al., 2006). L'implication de Egr4 dans la régulation de KCC2b par le mBDNF a donc été testée en transfectant des neurones en culture avec une construction contenant le gène de la luciférase en aval du promoteur de KCC2b, contenant ou non le site de fixation de Egr4 (Ludwig, Uvarov, Soni, et al., 2011). Dans cette configuration, le mBDNF provoque une augmentation de l'expression de la luciférase en présence du domaine de liaison de Egr4 mais pas lorsque ce domaine est absent (Ludwig, Uvarov, Soni, et al., 2011). Cela démontre que la régulation de l'expression de KCC2b par le BDNF dépend de Egr4 dans les neurones immatures. Ainsi, le modèle proposé pour expliquer l'effet du mBDNF sur l'expression de KCC2b dans les neurones immatures est le suivant. L'activation du récepteur TrkB par le mBDNF entraine l'activation successive des kinases MEK et Erk, ce qui aboutit à la transcription du gène codant pour Egr4. Une fois traduit, Egr4 se fixe à son site de liaison au sein de la séquence régulatrice de KCC2b et active sa transcription (Aguado et al., 2003; Carmona et al., 2006; Lee-Hotta et al., 2019; Ludwig, Uvarov, Soni, et al., 2011).

Étonnamment, le blocage de la liaison du mBDNF à TrkB dans des cultures de neurones de six jours entraine une augmentation de la fonction de transporteur de KCC2 (Hamze et al., 2024). Ce résultat, qui va à l'encontre du modèle précédent, pourrait être dû à un effet différent du mBDNF sur la transcription de *Slc12a5* et sur la stabilité protéique et/ou l'expression membranaire de KCC2. Par ailleurs, il est intéressant de noter que la liaison d'un autre facteur neurotrophique, la neurturine, à son récepteur présente la capacité d'activer la même voie que le mBDNF (MAPK/ERK) dans les neurones immatures et de favoriser la transcription de KCC2b (Ludwig, Uvarov, Pellegrino, et al., 2011).

Dans les neurones matures, l'activation des récepteurs TrkB en réponse à une forte activité neuronale de type pathologique provoque la phosphorylation du facteur de transcription CREB et entraine une diminution de l'expression de KCC2b (Rivera et al., 2002, 2004). L'application de mBDNF sur des tranches d'hippocampe exprimant un récepteur TrkB muté au niveau du site de liaison de Shc ne modifie pas l'expression de KCC2 (Rivera et al., 2004). A l'inverse, l'application de mBDNF sur des tranches d'hippocampe exprimant un récepteur TrkB muté au niveau du site de liaison de PLC_{γ} entraine une augmentation de l'expression du transporteur (Rivera et al., 2004). Cela démontre que dans les neurones matures, l'effet du mBDNF sur l'expression de KCC2 dépend des effecteurs recrutés. La co-activation de PLC_{γ} et Shc par TrkB entraine l'inhibition de l'expression de KCC2 tandis que l'activation de Shc seule active la transcription de *Slc12a5* (Lee-Hotta et al., 2019; Rivera et al., 2004).

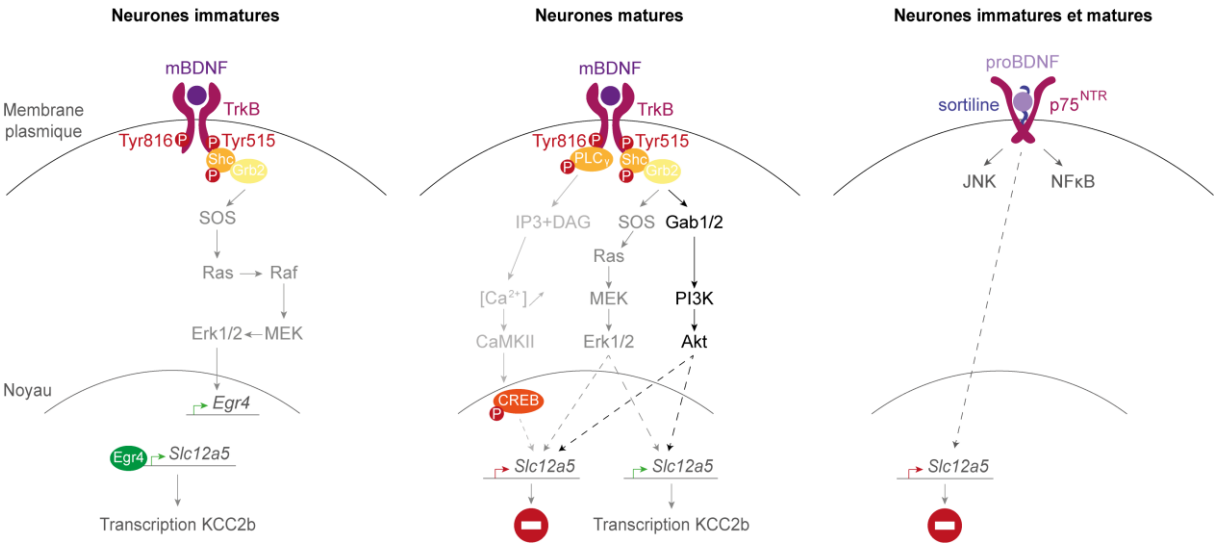


Figure 9. Modèle de régulation transcriptionnelle de *Slc12a5* par le BDNF.

Modèle proposé pour expliquer la régulation de la transcription de KCC2b par le mBDNF et le proBDNF en fonction de la maturité neuronale. Les flèches en pointillées indiquent les voies qui n'ont pas encore été élucidées.

L'effet du précurseur du BDNF (pro-BDNF) sur la régulation transcriptionnelle de KCC2 a été moins étudié et reste relativement peu connu. Des expériences d'électroporation *in utero* ont démontré que l'expression dans du cortex de rat entre E15 et P30 de pro-BDNF ne pouvant pas être clivé entraine une diminution de l'expression du transcrit et de la protéine de KCC2 (Riffault et al., 2018). Bien que ce résultat démontre que le pro-BDNF entraine une inhibition de la transcription de *Slc12a5*, il ne permet pas de déterminer si cet effet a lieu dans les neurones matures et/ou immatures, du fait de l'expression ininterrompue du pro-BDNF jusqu'à ce que les animaux soient juvéniles. En accord avec ce résultat, l'expression de pro-BDNF dans des neurones immatures et matures en culture entraine une dépolarisation de E_{GABA}

(Hamze et al., 2024). Cet effet est corrélé à une augmentation de l'endocytose de KCC2 chez les cellules traitées avec du pro-BDNF, mais l'effet du précurseur sur la transcription de *Slc12a5* n'a pas été testé (Hamze et al., 2024). Ainsi, il semblerait que le pro-BDNF inhibe l'expression de KCC2 mais l'effet spécifique de ce précurseur sur la transcription de *Slc12a5,* chez les neurones immatures et matures, reste à élucider.

d. Régulation par TGF-β2

TGF-β2 est un facteur de croissance transformant (*transforming growth factor*) qui appartient à la famille des cytokines. Il présente un pic transitoire d'expression dans le cervelet entre la naissance et P15 mais semble exprimé de façon relativement stable dans l'hippocampe et le néocortex lors du développement et à l'âge adulte (Böttner et al., 2000; Constam et al., 1994). Après avoir été sécrété, clivé en sa forme mature et activé, TGF-β2 se lie au corécepteur TβR3 qui recrute alors successivement les récepteurs TβR2 et TβR1 (M.-Y. Wang et al., 2023). Une fois que les trois récepteurs ont formé un complexe, TβR3 se dissocie de ce dernier (M.-Y. Wang et al., 2023). La liaison de TGF-β2 à TβR1/TβR2 entraine la phosphorylation et l'activation de TβR1 par TβR2 (M.-Y. Wang et al., 2023; Wrana et al., 1994). TβR1 phosphoryle alors à son tour les protéines Smad2 et Smad3 et provoque l'activation de la cascade Smad (M.-Y. Wang et al., 2023). Le récepteur active aussi de nombreuses autres voies non-canoniques (ERK, PI3K/Akt, JNK) qui assurent régulation transcriptionnelle des gènes cibles de TGF-β2 (M.-Y. Wang et al., 2023). Parmi ces cibles, il a été démontré que le complexe Smad2/3 se lie et régule la transcription du facteur de transcription AP-2 (Koinuma et al., 2009), qui présente un site de liaison dans la séquence régulatrice de *Slc12a5* (Uvarov et al., 2006). Ainsi, l'effet de TGF-β2 sur la régulation transcriptionnelle de *Slc12a5* a été étudié (Rigkou et al., 2022). Il a été démontré que l'inhibition de la voie TGF-β/activine dans des neurones immatures en culture diminue l'expression de l'ARNm codant pour KCC2b (Rigkou et al., 2022). De plus, une lignée de souris délétée pour TGF-β2 présente une diminution de l'expression transcriptionnelle et protéique de KCC2a et KCC2b à E17.5 (Rigkou et al., 2022). Cela est associé à une diminution de l'expression transcriptionnelle d'AP-2 ainsi qu'à une diminution de sa liaison au promoteur de *Slc12a5* (Rigkou et al., 2022). Ces résultats démontrent que TGF-β2 stimule la transcription de AP-2 dans les neurones immatures, qui à son tour active la transcription des deux isoformes de KCC2. Du fait de son expression précoce lors du développement, TGF-β2 pourrait participer à l'initiation de l'expression de KCC2 dans les neurones immatures et/ou agir en synergie avec Egr4 afin d'entrainer l'augmentation neurodéveloppementale de l'expression du transporteur.

4.2. Régulation de l'expression membranaire

KCC2 est un transporteur permettant la translocation d'ions entre le cytosol et le milieu extra-cellulaire. Par conséquent son expression membranaire est primordiale et est précisément régulée par divers mécanismes que nous allons détailler (Figure 10).

a. Exocytose

Après leur traduction dans le réticulum endoplasmique (RE), la majorité des protéines sécrétées ou insérées à la membrane plasmique subissent un processus de maturation dans le RE et l'appareil de Golgi, lors duquel elles sont N-glycosylées (Guay et al., 2025). Leur glycosylation est essentielle pour assurer leur repliement, leur stabilité et leur adressage à la membrane plasmique (Guay et al., 2025). Comme nous le verrons par la suite, KCC2 est N-glycosylé au niveau de six asparagines localisées dans sa troisième boucle extra-cellulaire (Agez et al., 2017). Après sa maturation dans les organites de la voie de sécrétion, KCC2 est inséré à la membrane par un phénomène d'exocytose. Des expériences basées sur la transfection de neurones en culture avec des constructions codant pour des protéines recombinantes KCC2-pH_{ext} (insertion d'un tag pHluorine dans la seconde boucle extracellulaire du transporteur) présentant une délétion de leur domaine N- ou C-terminal ont permis d'étudier le rôle de chacun de ces domaines dans l'expression membranaire de KCC2 (Friedel et al., 2017). La délétion du domaine N-terminal du transporteur entraine une diminution de son expression membranaire, sans affecter la quantité de protéines internalisées (Friedel et al., 2017). La délétion du domaine C-terminal de KCC2 provoque aussi une diminution de son expression membranaire mais celle-ci est associée à une augmentation de la quantité de protéines internalisées (Friedel et al., 2017). Ces résultats suggèrent que le domaine N-terminal de KCC2 est nécessaire pour son insertion à la membrane plasmique tandis que son domaine C-terminal est important pour sa stabilité membranaire (Friedel et al., 2017).

Lors de l'exocytose, la vésicule d'exocytose commence par s'attacher à la membrane plasmique par le biais de diverses protéines d'attachement, dont la GTPase Rab11 (Takahashi et al., 2012). La fusion entre la membrane plasmique et celle de la vésicule repose sur l'interaction d'une protéine localisée dans la membrane de la vésicule (la synaptobrévine) avec des protéines de la membrane plasmique (la protéine associée aux synaptosomes, SNAP et la syntaxine 1A) (Han et al., 2017). L'ensemble de ces protéines forment le complexe SNARE (Han, 2017). Après l'attachement de la vésicule à la membrane plasmique, les composants du complexe SNARE interagissent et forment un faisceau stable qui s'enroule et entraine la fusion

des membranes (Han et al., 2017). Plusieurs études ont démontré que l'interaction de KCC2 avec diverses molécules impliquées dans l'exocytose joue un rôle essentiel dans son insertion membranaire. C'est le cas de la protéine d'attachement Rab11b dont la perte d'expression altère fortement l'expression membranaire de KCC2 (Roussa et al., 2016). La régulation de la localisation subcellulaire du transporteur par Rab11b est contrôlée par le facteur de croissance TGF-β2 (Roussa et al., 2016). En effet, TGF-β2 active la phosphorylation du facteur de transcription CREB qui favorise la transcription de la GTPase Rab11b (Roussa et al., 2016). Il est supposé que Rab11b interagit alors avec KCC2 et favorise la fusion des vésicules dans lesquelles il est contenu avec la membrane plasmique (Roussa et al., 2016).

KCC2 interagit aussi avec deux protéines du complexe SNARE SNAP23 et SNAP25, ainsi qu'avec la syntaxine 1A par le biais de son domaine C-terminal (Asraf et al., 2022; Saadi et al., 2012). Cette interaction favorise l'exocytose du transporteur en réponse à l'activité neuronale (Asraf et al., 2022; Chorin et al., 2011; Saadi et al., 2012). Lors d'une activité neuronale physiologique, du zinc synaptique (contenu dans un type particulier de vésicules de glutamate) est libéré et se lie au récepteur couplé aux protéines G, GPR39, localisé dans la membrane post-synaptique (Chorin et al., 2011). Ce processus active la voie MAPK, ce qui résulte en une phosphorylation de SNAP23 et en une augmentation de l'insertion membranaire de KCC2 (Asraf et al., 2022; Chorin et al., 2011; Saadi et al., 2012). La façon dont la phosphorylation de SNAP23 favorise l'exocytose de KCC2 n'est pas encore connue mais dépend probablement du recrutement de la syntaxine 1A (Asraf et al., 2022).

b. Oligomérisation, agrégation et diffusion membranaire

Les CCCs sont majoritairement exprimés sous forme d'oligomères et notamment de dimères (Simard et al., 2007). Néanmoins, le taux d'oligomérisation de KCC2 varie fortement en fonction des études. Cela est probablement dû aux différences dans la capacité du transporteur à former des oligomères selon le système dans lequel il est exprimé et à la variation de la sensibilité de ces oligomères à différentes conditions de dénaturation selon le système d'étude (Blaesse et al., 2006; Kok et al., 2024). Les différentes études sur le sujet s'accordent néanmoins pour dire que le taux d'oligomérisation de KCC2 augmente lors de la maturation neuronale (Blaesse et al., 2006; Liabeuf et al., 2026). Cette augmentation est corrélée à une diminution de la phosphorylation de ses tyrosines lors du développement (Liabeuf et al., 2026). Il est donc probable que la déphosphorylation des tyrosines de KCC2 soit nécessaire à sa dimérisation et permette son oligomérisation progressive lors du développement. Or, comme nous le verrons dans la partie I.4.4, l'effet de la phosphorylation des tyrosines de KCC2 est débattu. Par ailleurs, plusieurs protéines, en interagissant

structurellement avec KCC2, favorisent son oligomérisation. C'est le cas de la sous-unité GluK2 des récepteurs kaïnate (Mahadevan et al., 2014) et de la protéine neuropilin and tolloid like-2 (Neto2) (Ivakine et al., 2013). L'effet direct de l'oligomérisation sur la fonction du transporteur n'a jamais été testé mais le modèle actuel de transport des ions par KCC2 suggère que son rôle de transporteur requiert sa dimérisation (G. Chi et al., 2021; S. Zhang et al., 2021). De plus, l'augmentation développementale de l'oligomérisation de KCC2 est fortement corrélée à l'acquisition de sa fonction de transporteur (Blaesse et al., 2006).

Les protéines synaptiques se déplacent constamment au sein de la membrane plasmique et alternent entre une localisation synaptique et extra-synaptique selon un phénomène de diffusion latérale (Jaskolski & Henley, 2009; Triller & Choquet, 2005). En fonction de leur localisation, elles présentent deux types de mouvements latéraux dans la membrane plasmique. En dehors des synapses, les protéines synaptiques sont relativement instables et présentent une trajectoire aléatoire due aux chocs avec de plus petites molécules, appelée mouvement brownien (Jaskolski & Henley, 2009; Triller & Choquet, 2005). Lorsqu'elles sont localisées à proximité des synapses, le mouvement de ces protéines est plus restreint car il est contraint par leur interaction avec le cytosquelette, leur association en agrégats et par la composition spécifique de la membrane synaptique (Jaskolski & Henley, 2009; Triller & Choquet, 2005). La membrane pré- et post-synaptique contient des radeaux lipidiques qui sont des domaines membranaires dynamiques enrichis en cholestérol et en sphingolipides (Allen et al., 2007). Ces domaines, qui sont associés à divers éléments du cytosquelette, permettent la stabilisation et l'agrégation des protéines (Allen et al., 2007). Ils peuvent aussi, dans certaines conditions, favoriser l'exocytose et endocytose des protéines membranaires (Allen et al., 2007).

L'expression membranaire de KCC2 est régulée par ce phénomène de diffusion latérale. En effet, 66% des protéines KCC2 sont présentes sous forme d'agrégats à proximité des synapses, où elles présentent un mouvement particulièrement restreint (Chamma et al., 2012, 2013). Les protéines restantes sont localisées à l'extérieur des synapses et explorent une surface membranaire beaucoup plus large (Chamma et al., 2012, 2013). Il a été démontré que le domaine C-terminal de KCC2 est important pour son agrégation et que diverses modifications post-traductionnelles, notamment au niveau de ce domaine, sont responsables de la transition entre la forme stable et agrégée de KCC2 et sa forme diffuse (Watanabe et al., 2009; voir partie I.4.4). De même, l'interaction de KCC2 avec la protéine d'échafaudage 4.1N joue un rôle essentiel dans le confinement du transporteur au niveau des épines dendritiques, à proximité des synapses excitatrices (Chamma et al., 2013). La façon dont les radeaux lipidiques régulent l'expression membranaire de KCC2 est encore débattue. Une étude a

rapporté une augmentation de l'agrégation et de la fonction de KCC2 au niveau de ces domaines membranaires (Watanabe et al., 2009). A l'inverse, une autre a suggéré que ces derniers inhibent KCC2 (Hartmann et al., 2009). Étant donné que les radeaux lipidiques jouent un rôle central dans de nombreux processus de signalisation cellulaire, il est possible que leur effet sur KCC2 varie en fonction du modèle et du contexte dans lequel se trouvent les cellules. Enfin, il a été observé à plusieurs reprises qu'il existe une corrélation entre l'agrégation de KCC2 et sa fonction de transporteur (Chamma et al., 2013; Watanabe et al., 2009). Cependant, aucun lien causal n'a pour l'instant été établi car il n'existe pas de méthode permettant d'empêcher l'agrégation de KCC2 sans altérer son expression membranaire.

c. Endocytose

KCC2 est une protéine qui présente un renouvellement membranaire constitutif particulièrement rapide. Il faut environ 20 minutes pour que 50% des protéines KCC2 membranaires soient endocytées en conditions basales (Chamma et al., 2013; Lee et al., 2010; Rivera et al., 2004). Par ailleurs, une activité neuronale élevée est associée à une accélération et une augmentation de l'endocytose de KCC2 (Chamma et al., 2013; Rivera et al., 2004). Bien qu'il existe différentes formes d'endocytose, l'interaction de KCC2 avec le complexe protéique de liaison à la clathrine AP-2 (clathrin-binding adaptor protein-2) et avec la protéine régulatrice de l'endocytose PACSIN1 (aussi appelée SYNDAPIN1) démontre que le transporteur fait essentiellement l'objet d'une endocytose médiée par la clathrine (Mahadevan et al., 2017; B. Zhao et al., 2008). L'endocytose médiée par la clathrine repose sur la liaison d'un complexe protéique adaptateur, tel que AP-2, à la protéine à endocyter (Kok & Brodsky, 2024; Thottacherry et al., 2019). Ce complexe permet le recrutement de la clathrine qui polymérise et déforme la membrane plasmique, formant ainsi des puits couverts de clathrine (Thottacherry et al., 2019). Enfin, la dynamine (une GTPase) est recrutée et s'oligomérise autour du cou de la vésicule formée, entrainant son détachement de la membrane plasmique (Kok & Brodsky, 2024; Thottacherry et al., 2019). Dans le cas de KCC2, le complexe AP-2 se lie à un motif di-leucine non canonique (657LLXXEE662) localisé dans le domaine C-terminal du transporteur (B. Zhao et al., 2008). Lorsque ce motif est muté, il n'y a quasiment aucune endocytose des protéines KCC2 membranaires lors d'une fenêtre de trente minutes, ce qui démontre que ce motif est essentiel pour l'internalisation du transporteur (B. Zhao et al., 2008). Cela illustre aussi que la majorité de l'endocytose de KCC2 est médiée par la clathrine. Lors de l'endocytose, les protéines de la famille des syndapines, telles que PACSIN1, sont mises en jeu dans la déformation de la membrane plasmique ainsi que dans le recrutement d'autres protéines permettant l'endocytose, dont la dynamine (Modregger et al., 2000). Le mécanisme selon lequel KCC2 et PACSIN1 interagissent n'est pas encore

connu. Néanmoins, la perte d'expression de PACSIN1 est associée à une augmentation de l'expression protéique de KCC2 ainsi qu'à une hyperpolarisation de E_{GABA}, suggérant que cette protéine joue un rôle important dans l'internalisation du transporteur (Mahadevan et al., 2017). Plusieurs autres équipes ont étudié l'endocytose de KCC2, notamment en bloquant ce processus avec des inhibiteurs de la dynamine (Chamma et al., 2013; H. H. C. Lee et al., 2010). Il est important de noter que la dynamine est impliquée dans différents types d'endocytose, dont l'endocytose médiée par la clathrine mais aussi l'endocytose cavéolaire, qui permet l'internalisation des protéines localisées dans les radeaux lipidiques (Allen et al., 2007; Thottacherry et al., 2019). Étant donné la localisation de KCC2 dans les radeaux lipidiques nous pouvons supposer qu'il est aussi soumis à ce type d'endocytose, mais cela n'a pas été démontré. Le blocage de l'endocytose de KCC2 entraine une augmentation de son expression membranaire mais aussi de son agrégation et de son confinement (Chamma et al., 2013). Cela démontre que l'ensemble de ces processus sont liés. Il a été proposé que la diffusion latérale de KCC2 en dehors des synapses, où il est agrégé et stabilisé, est rapidement suivie de son endocytose (Côme et al., 2019).

En conditions basales, une fois endocyté KCC2 est majoritairement recyclé (B. Zhao et al., 2008) et réinséré à la membrane plasmique. En effet, les protéines KCC2 internalisées colocalisent avec le marqueur d'endosome de recyclage Rab11 (B. Zhao et al., 2008). Lorsque KCC2 est endocyté en réponse à une forte activité neuronale ou à une autre forme de perturbation, il est dégradé par l'une de ces voies que nous allons détailler dans la partie suivante.

4.3. Dégradation de KCC2

Malgré un renouvellement membranaire rapide, KCC2 est une protéine particulièrement stable en conditions basales, probablement car elle est fortement recyclée. L'incubation de tranches d'hippocampe avec de la leupeptine, un inhibiteur de protéases qui bloque l'action des lysosomes, pendant quatre heures ne modifie pas l'expression protéique de KCC2 (Puskarjov et al., 2012). De même, l'incubation de neurones en culture avec de la leupeptine ou avec un bloqueur du protéasome (MG132) pendant huit heures n'affecte pas l'expression du transporteur (Kok et al., 2024 ; voir Article principal). Cela démontre que KCC2 a une durée de vie supérieure à huit heures. Néanmoins, lorsque le fonctionnement physiologique des neurones est altéré par une augmentation de leur activité ou par la présence d'anesthésiques, l'expression protéique de KCC2 chute drastiquement en quelques dizaines de minutes ou quelques heures selon le processus de dégradation (Hu et al., 2023; H. H. C. Lee et al., 2010;

Puskarjov et al., 2012). KCC2 peut être dégradé par le biais de plusieurs voies que nous allons détailler (Figure 10).

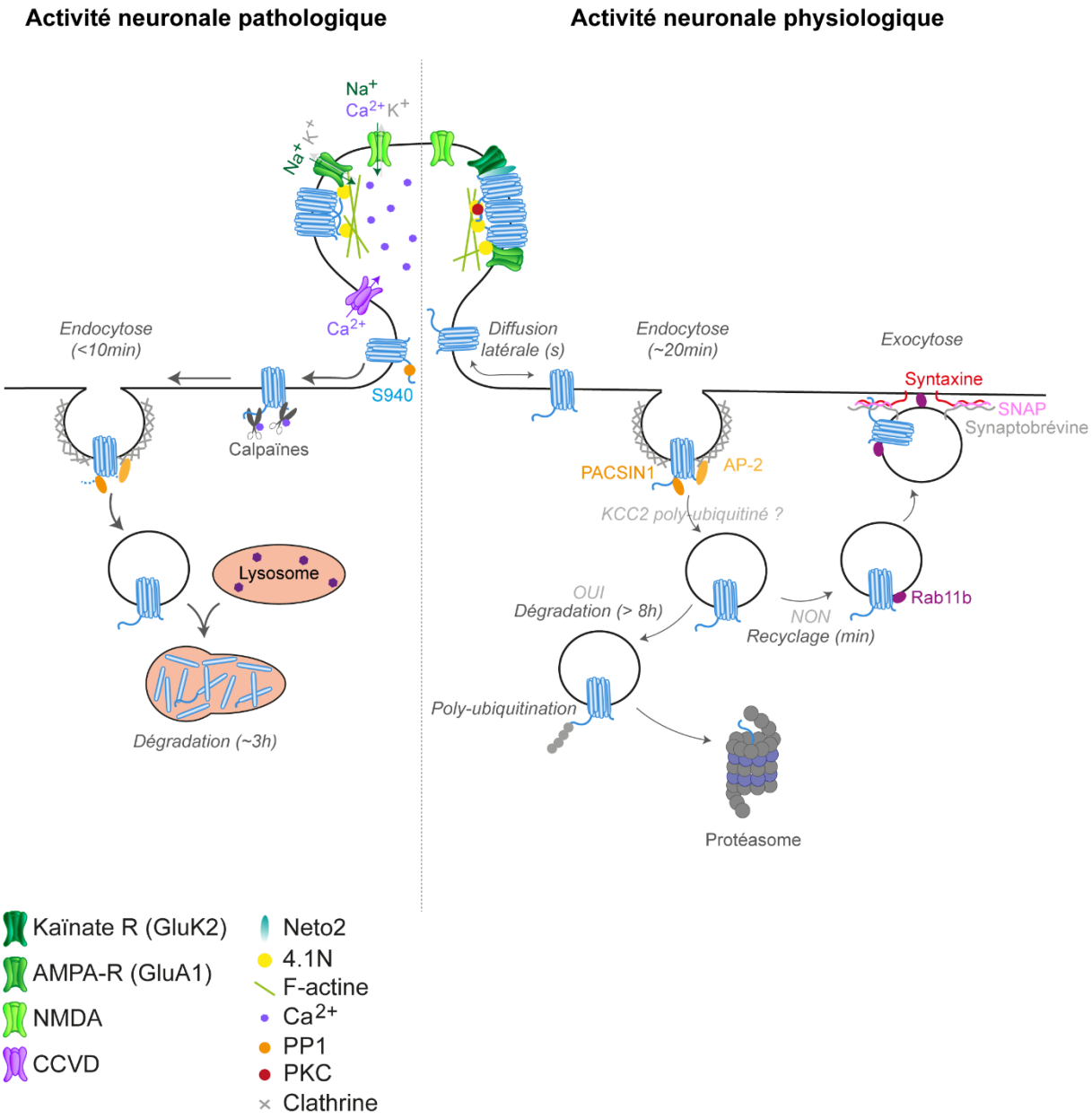


Figure 10. Régulation de la stabilité de KCC2 en fonction de l'activité neuronale.

Comparaison des mécanismes qui régulent l'expression protéique et la stabilité membranaire de KCC2 en conditions physiologiques ou lors d'une forte activité neuronale. CCVD : canaux calciques voltage-dépendants.

a. Dégradation par la voie lysosomale

La voie endosome-lysosome est la principale voie de dégradation des protéines extracellulaires et membranaires. Après leur séparation avec la membrane plasmique, les

vésicules d'endocytose fusionnent avec des endosomes dits précoces qui trient les protéines (Paudel et al., 2023). Ces derniers déterminent si les protéines doivent être adressées aux endosomes de recyclage, afin d'être réinsérées à la membrane, ou si elles doivent être dégradées (Paudel et al., 2023). Lorsque les protéines ne sont pas adressées à la voie de recyclage, elles restent dans les endosomes précoces, qui deviennent ensuite des endosomes tardifs et fusionnent avec les lysosomes (Paudel et al., 2023). Les lysosomes contiennent des enzymes hydrolytiques ainsi qu'un environnement acide qui dégradent les protéines (Paudel et al., 2023). Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'incubation de tranches d'hippocampe de rat ou de neurones en culture avec des composés augmentant l'activité neuronale (NMDA, 4-aminopyridine, solution dépourvue de magnésium) entraine une forte diminution de l'expression protéique de KCC2 (Chamma et al., 2013; Puskarjov et al., 2012; Rivera et al., 2004). Celle-ci est entièrement restaurée si les neurones sont pré-incubés avec de la leupeptine, qui est un bloqueur des lysosomes (Puskarjov et al., 2012). Cela démontre que KCC2 est majoritairement dégradé par la voie lysosomale en réponse à l'activité neuronale.

b. Clivage par les calpaïnes

Les calpaïnes sont des protéases à cystéine activées par le calcium (Baudry et al., 2013; Croall & DeMartino, 1991). Lorsqu'elles ne sont pas liées au calcium, elles présentent une conformation inactive caractérisée par la séparation de leurs deux domaines à activité de protéase (Baudry et al., 2013; Croall & DeMartino, 1991). La liaison du calcium à ces domaines provoque leur fusion, entrainant la formation d'un site catalytique actif et l'activation de l'enzyme (Baudry et al., 2013; Croall & DeMartino, 1991). Une fois les calpaïnes partiellement activées, leur activation peut être augmentée par leur activité auto-protéolytique (Baudry et al., 2013; Croall & DeMartino, 1991). Les calpaïnes activées se lient aux protéines au niveau de différents domaines facilement accessibles et les clivent (Baudry et al., 2013; Croall & DeMartino, 1991). Le clivage par les calpaïnes active certaines protéines tandis qu'il entraine pour d'autres un endommagement et/ou une perte de fonction (Baudry et al., 2013; Glantz et al., 2007). Les protéines endommagées par les calpaïnes sont dégradées par la voie lysosomale ou protéasomale (Goll et al., 2003; Tomita et al., 2020). Similairement à ce qui a été observé dans le cadre de la dégradation par le lysosome, l'inhibition des calpaïnes empêche la perte d'expression protéique de KCC2 à la suite d'une forte activité neuronale (Chamma et al., 2013; Puskarjov et al., 2012; H.-Y. Zhou et al., 2012). L'activité neuronale entraine une augmentation de la déphosphorylation de la sérine 940 de KCC2 (voir partie I.4.4.), diminue son expression membranaire ainsi que son confinement et altère sa fonction (Chamma et al., 2013; Fiumelli et al., 2005). La transfection de neurones en culture avec une

construction codant pour une protéine KCC2 S940D, dans laquelle la sérine 940 a été remplacée par un aspartate afin de mimer le maintien du résidu dans un état phosphorylé, est suffisante pour restaurer l'expression membranaire et le confinement du transporteur (Chamma et al., 2013). Cela suggère que la déphosphorylation de la sérine 940 en réponse à l'activité neuronale pourrait être le signal permettant la fixation des calpaïnes à KCC2. Les calpaïnes et les lysosomes agissent ensuite probablement de concert afin de cliver et dégrader le transporteur.

c. Dégradation par la voie ubiquitine/protéasome

La voie ubiquitine/protéasome dégrade majoritairement les protéines intracellulaires (Tai & Schuman, 2008). Néanmoins, les protéines membranaires peuvent aussi être dégradées par ce mécanisme, notamment lorsqu'elles présentent des défauts après leur repliement et leur oligomérisation dans le réticulum endoplasmique (Christianson et al., 2023; Kok et al., 2024). Les protéines dégradées par le protéasome sont initialement reconnues par une ubiquitine ligase (E3) (Tai & Schuman, 2008). Il existe de nombreuses ubiquitine ligases différentes qui reconnaissent et se lient chacune spécifiquement à certaines familles de protéines (Tai & Schuman, 2008). Chaque ubiquitine ligase recrute alors un type spécifique d'enzymes de conjugaison de l'ubiquitine (E2), qui ont précédemment été chargées en ubiquitine par l'enzyme d'activation de l'ubiquitine (E1), et transfèrent les ubiquitines sur la protéine cible (Tai & Schuman, 2008). Les protéines poly-ubiquitinées sont adressées au protéasome 26S, un complexe protéique géant qui reconnait les chaines de poly-ubiquitine et les détache des protéines (Tai & Schuman, 2008). Il déplie ensuite ces dernières et les clive en courts peptides qui seront recyclés (Tai & Schuman, 2008).

Il a récemment été démontré que l'administration de différentes substances anesthésiques chez la souris entraine une diminution transitoire de l'expression de KCC2 dans le thalamus, associée à une augmentation de la phosphorylation de sa thréonine 1007 (Hu et al., 2023). Cet effet est aboli si un inhibiteur des enzymes d'activation de l'ubiquitine E1 (PYR-41) ou un bloqueur du protéasome (MG132) est administré aux animaux, ce qui démontre que les anesthésiques entrainent la dégradation de KCC2 par la voie ubiquitine/protéasome (Hu et al., 2023). Par ailleurs, il a été observé que KCC2 interagit avec Fbxl4, une protéine qui fait partie du complexe d'ubiquitine ligase E3 SCF (Skp1-Cullin 1-F-box-protein) (P. Chen et al., 2025; Hu et al., 2023; Mason & Laman, 2020). Les substances anesthésiques favorisent l'interaction entre les deux protéines et cette interaction est nécessaire pour la perte d'expression de KCC2 lors de l'anesthésie (P. Chen et al., 2025; Hu et al., 2023). L'expression de la protéine mutante KCC2 T1007A (remplacement de la thréonine par une alanine pour mimer sa

déphosphorylation constitutive, voir I.4.4) dans des cellules HEK-293 empêche l'interaction entre Fbxl4 et KCC2 et réduit fortement la perte d'expression de KCC2 en réponse aux anesthésiques (Hu et al., 2023). Les anesthésiques entrainent donc la phosphorylation de la thréonine 1007 de KCC2, ce qui recrute Fbxl4 et entraine la poly-ubiquitination du transporteur, qui est ensuite dégradé par le protéasome. En conditions basales, le blocage du protéasome semble induire une faible (mais non significative) augmentation de l'expression de KCC2 après huit heures (Kok et al., 2024). Cet effet n'est pas visible lors du blocage des lysosomes (Kok et al., 2024). Cela pourrait suggérer que le protéasome est la voie de dégradation de KCC2 en conditions basales mais que la cinétique de dégradation constitutive du transporteur par cette voie est très lente.

4.4. Régulation post-traductionnelle

La stabilité protéique et membranaire de KCC2 sont régulées par différents types de modifications post-traductionnelles dont la phosphorylation, la N-glycosylation et la poly-ubiquitination. La poly-ubiquitination ayant déjà été détaillée dans la partie I.4.3, nous ne reviendrons donc pas dessus ici. KCC2 est glycosylé, à la fois dans les neurones matures et immatures, au niveau de six asparagines (N283, N291, N310, N328, N338, N339, positions chez l'Homme) localisées dans sa troisième boucle extracellulaire, entre ses domaines transmembranaires 5 et 6 (Agez et al., 2017; Blaesse et al., 2006). La N-glycosylation du transporteur a été relativement peu étudiée. Néanmoins, différentes mutations ponctuelles de KCC2, dont la mutation L311H localisée à côté de l'asparagine N310, entrainent une diminution de sa glycosylation associée à une altération de son expression membranaire (Stödberg et al., 2015). Il a aussi été démontré que la glycosylation de NCC, NKCC2 et KCC4 est importante pour leur expression de surface (A.-M. Hartmann & Nothwang, 2015). Cela suggère que cette modification post-traductionnelle joue potentiellement un rôle dans l'expression membranaire de KCC2, mais cela n'a pas été démontré directement.

De nombreux résidus de KCC2 (Ser25, Ser26, Ser31, Thr34, Ser932, Thr934, Ser937, Thr999, Thr1009, Ser1022, Ser1025, et Ser1026, position chez l'Homme et le rat) ont été décrits comme phosphorylables lors d'expériences de spectrométrie de masse (Cordshagen et al., 2018; Weber et al., 2014). Pour autant, les kinases responsables de ces phosphorylations n'ont pas encore été identifiées. Afin d'analyser l'effet de ces phosphorylations, différentes constructions ont été transfectées dans des cellules hétérologues. Ces constructions codent pour des protéines KCC2 mutantes dans lesquelles les acides aminés précédemment cités ont été remplacés par un résidu aspartate ou alanine, afin de mimer leur phosphorylation ou

leur déphosphorylation (Cordshagen et al., 2018; Weber et al., 2014). La mutation individuelle de la majorité des sérines et thréonines n'entraine pas de changements de fonction de KCC2 (Cordshagen et al., 2018; Weber et al., 2014). Cela suggère que leur (dé)phosphorylation n'est pas impliquée dans la régulation de l'activité du transporteur, ou qu'elles n'agissent qu'en synergie avec d'autres modifications post-traductionnelles. Néanmoins, le remplacement des sérines 932, 937 ou de la thréonine 934 par un aspartate entraine une augmentation de la fonction de KCC2, sans modifier son expression membranaire (Cordshagen et al., 2018; Weber et al., 2014). Le remplacement de ces mêmes résidus par une alanine ne modifie pas significativement l'activité du transporteur (Cordshagen et al., 2018; Weber et al., 2014). Le remplacement de la thréonine 1009 par une alanine provoque une augmentation de l'activité de KCC2 sans altérer son expression à la membrane plasmique (Cordshagen et al., 2018). Son remplacement par un aspartate ne provoque en revanche pas d'effet significatif (Cordshagen et al., 2018). Ces résultats démontrent que les sérines 932/937 et la thréonine 934 de KCC2 sont déphosphorylées à l'état basal dans des cellules HEK-293 et que leur phosphorylation augmente l'activité du transporteur. A l'inverse, la thréonine 1009 est phosphorylée à l'état basal et sa déphosphorylation augmente l'activité de KCC2 (Cordshagen et al., 2018; Weber et al., 2014). Dans la suite de cette partie, nous allons détailler les différentes voies de kinases qui phosphorylent et régulent KCC2 (Tableau 2).

Kinases	Phosphatases	Résidus (position chez la souris)
SPAK, OSR1	PP1, PP2A	Thréonines 6, 906 et 1006
PKC	PP1	Sérine 940
SFK	Non identifiées	Tyrosines 903 et 1086

Tableau 2. Voies de kinases responsables de la phosphorylation de KCC2.

a. Phosphorylation par la voie WNK-SPAK/OSR1

Comme nous l'avons précédemment détaillé dans les parties I.1.2 et I.1.4, l'activité de KCC2 est dynamiquement régulée par la (dé)phosphorylation de ses thréonines 906 et 1007 (1006 chez la souris) par les kinases WNK-SPAK/OSR1 et les phosphatases PP1/PP2A (A.-M. Hartmann & Nothwang, 2022; Kahle & Delpire, 2016). La voie WNK-SPAK/OSR1 régule l'activité de KCC2 en fonction de la concentration intracellulaire en chlorure selon une boucle de rétroaction : une faible concentration intracellulaire en chlorure est associée à l'auto-activation de WNK, qui phosphoryle et active ses kinases effectrices SPAK et OSR1, entrainant à leur tour la phosphorylation de KCC2 (Friedel et al., 2015; A.-M. Hartmann & Nothwang, 2022; Heubl et al., 2017). L'interaction de SPAK et OSR1 avec la protéine d'échafaudage MO25, responsable de l'augmentation de leur activité catalytique, est

nécessaire pour la phosphorylation des différents résidus de KCC2 (rétracté : de los Heros et al., 2014; Filippi et al., 2011). Tandis qu'il a été démontré que les thréonines 6 et 1007 sont phosphorylées par SPAK, ce n'est pas le cas de la thréonine 906 qui semble être la cible d'une kinase effectrice de WNK encore inconnue (rétracté : de los Heros et al., 2014). La phosphorylation du transporteur par cette voie provoque son inhibition et entraine une augmentation de la concentration intracellulaire en chlorure (Friedel et al., 2015; A.-M. Hartmann & Nothwang, 2022; Heubl et al., 2017). L'implication de WNK1 dans une maladie héréditaire entrainant la perte des nerfs sensoriels périphériques (Shekarabi et al., 2008) ainsi que sa prédominance dans le système nerveux ont entrainé un intérêt particulier pour cette protéine dans la régulation de la concentration intra-neuronale en chlorure (The Human Protein Atlas, Friedel et al., 2015; Heubl et al., 2017). Aujourd'hui, WNK1 est considérée comme la kinase WNK principalement impliquée dans l'inhibition de KCC2 dans le cerveau (Friedel et al., 2015; Heubl et al., 2017).

WNK3 est aussi mise en jeu dans la régulation du transporteur. L'utilisation d'ARNs interférents contre cette kinase entraine l'hyperpolarisation de E_{GABA} dans des neurones à 15 jours en culture (Lim et al., 2021). WNK3 est donc nécessaire pour assurer le maintien du potentiel d'inversion des courants GABAergiques autour d'une valeur physiologique, malgré la diminution de son expression au cours du développement (Lim et al., 2021). Ces résultats sont surprenants car il s'agit de la kinase WNK la moins sensible aux variations de chlorure intracellulaire (Kahle et al., 2005; Murillo-de-Ozores et al., 2020). En effet, WNK3 est active et inhibe KCC2 en conditions hypotoniques, tandis que les autres kinases WNKs sont inhibées dans de telles circonstances (Kahle et al., 2005). Il semblerait donc que dans les neurones matures WNK3 inhibe constitutivement KCC2 afin de permettre le maintien de E_{GABA} autour de sa valeur consigne, tandis que WNK1 ne régule KCC2 qu'en réponse à des variations de la concentration intra-neuronale en chlorure afin de ramener E_{GABA} à sa valeur basale après une perturbation.

La déphosphorylation des résidus 906 et 1007 de KCC2 a été beaucoup moins étudiée que leur phosphorylation. Il a été démontré que les phosphatases PP1 et PP2A déphosphorylent les résidus homologues aux thréonines 906 et 1007 chez KCC3 (Rinehart et al., 2009). De plus, la calyculine A, un inhibiteur des sérine/thréonine phosphatases PP1 et PP2A, entraine une augmentation de l'activité des KCCs (Kahle & Delpire, 2016). Il a donc été proposé que ces deux phosphatases sont à l'origine de la déphosphorylation des thréonines 906 et 1007 de KCC2.

L’inhibition de KCC2 par la voie WNK-SPAK/OSR1 repose potentiellement sur plusieurs mécanismes complémentaires. Comme nous l’avons détaillé précédemment, il a été proposé qu’au sein des dimères de KCC2, la phosphorylation des domaines C-terminaux de chaque monomère entraine leur interaction et participe à l’inactivation du transporteur (S. Zhang et al., 2021). La phosphorylation des Thr906 et 1007 pourrait participer à ce phénomène mais cela n’a pas encore été élucidé. De plus, la phosphorylation de ces thréonines affecte la dynamique membranaire du transporteur (Friedel et al., 2015; Heubl et al., 2017). Cela a notamment été découvert via l’utilisation de constructions codant pour des protéines KCC2 mutantes dans lesquelles les thréonines 906 et 1007 ont été remplacées par un glutamate ou par une alanine pour mimer leur phosphorylation ou leur déphosphorylation (KCC2 T906E/T1007E ou KCC2 T906A/T1007A) (Friedel et al., 2015; Heubl et al., 2017; Rinehart et al., 2009). La transfection de neurones en culture avec le plasmide codant pour KCC2 T906E/T1007E entraine une augmentation de la diffusion membranaire de la protéine et une diminution de son expression à la surface des neurones en comparaison de KCC2 WT (Friedel et al., 2015; Heubl et al., 2017). A l’inverse, KCC2 T906A/T1007A présente une expression membranaire plus élevée que KCC2 WT, sans effet apparent sur sa diffusion (Friedel et al., 2015; Heubl et al., 2017). L’inhibition des récepteurs GABA-A avec de la gabazine provoque l’activation de la voie WNK-SPAK/OSR1 et entraine une augmentation de la diffusion membranaire de KCC2, une diminution de son agrégation, notamment à proximité des synapses, ainsi qu’un accroissement de son internalisation (Heubl et al., 2017). L’ensemble de ces résultats nous permettent de supposer que la phosphorylation des Thr906 et 1007 favorise la diffusion membranaire de KCC2, ce qui entraine une dispersion de ses agrégats et favorise son endocytose. Dans un contexte d’anesthésie, la phosphorylation de la thréonine 1007 entraine sa dégradation par la voie ubiquitine/protéasome dans le thalamus (Hu et al., 2023). Ce résultat est surprenant car l’activation de la voie WNK-SPAK/OSR1 dans des cultures primaires de neurones hippocampiques ne provoque pas de variation de l’expression protéique de KCC2 (Heubl et al., 2017). Cette différence pourrait refléter l’utilisation de modèles différents ou à une régulation distincte en fonction de la région cérébrale et de l’origine de l’activation de la voie.

La phosphorylation des thréonines 906 et 1007 est régulée par diverses molécules secrétées dans le cerveau. Le TGF-β2 (voir partie I.4.1) entraine la diminution de la phosphorylation de la thréonine 1007 (mais pas de la Thr906) dans le tronc cérébral d’embryons de souris (Rigkou et al., 2022). Le mécanisme sous-jacent à cet effet n’a pas encore été élucidé mais repose probablement sur l’inhibition de la voie WNK-SPAK/OSR1 ou sur l’activation des phosphatases PP1 and PP2A. Comme nous le verrons par la suite, l'import de taurine dans les neurones active WNK1 et provoque aussi l’inhibition de KCC2 (Inoue et al., 2012).

L’activité la voie WNK-SPAK/OSR1 varie au cours du développement. WNK1 et SPAK sont fortement activées dans les neurones immatures, puis il y a une diminution progressive de leur phosphorylation lors de la maturation neuronale (Friedel et al., 2015). L'activation de la voie WNK-SPAK/OSR1 lors du développement, en dépit de la valeur élevée de $[Cl^-]_i$, est due à l’activation de WNK1 par la taurine dans le cerveau embryonnaire (Inoue et al., 2012). La taurine est un acide aminé particulièrement abondant dans le cerveau des Mammifères lors de la période périnatale dont la concentration diminue progressivement jusqu’à l’âge adulte (Tochitani, 2017). Il a été démontré que le traitement de neurones en culture avec de la taurine active WNK1 et dépolarise E_{GABA} selon un processus qui repose sur la phosphorylation de KCC2 (Inoue et al., 2012). En effet, la phosphorylation des thréonines 906 et 1007 varie aussi au cours de la maturation neuronale : elle est maximale après la naissance et diminue lors des premières semaines de vie chez la souris (Rinehart et al., 2009). La phosphorylation de ces résidus décroît aussi fortement entre la première et la deuxième semaine en culture (Friedel et al., 2015).

Ainsi, KCC2 est exprimé lors de la période périnatale mais son activité de transporteur est inhibée par la voie WNK-SPAK/OSR1 jusqu’à la seconde semaine après la naissance. La diminution de la phosphorylation de KCC2 est corrélée à l’hyperpolarisation de E_{GABA} (Friedel et al., 2015). La transfection de neurones en culture avec une construction codant pour une forme constitutivement active de WNK1 (WNK1 S382E, WNK1-CA) altère cette hyperpolarisation neurodéveloppementale de E_{GABA} (Friedel et al., 2015). La lignée murine doublement mutée pour KCC2 (T906E/T1007E) est aussi caractérisée par le maintien d’une force motrice du chlorure positive jusqu’à P30, tandis qu’elle devient négative à partir de P14 chez les souris WT (Pisella et al., 2019). A l’inverse, les neurones de la lignée murine double mutante T906A/T1007A sont caractérisés par une hyperpolarisation plus rapide de E_{GABA} que ceux des souris WT, et donc par un *GABA shift* précoce (Moore et al., 2019). Cela illustre que la diminution progressive de la phosphorylation de KCC2 par la voie WNK-SPAK/OSR1 est essentielle afin de permettre la transition d’un GABA dépolarisant à hyperpolarisant dans une fenêtre temporelle précise. Nous pouvons supposer que le délai entre l’expression de KCC2 et le *GABA shift*, assuré par l’activation de WNK1, permet la régulation de divers processus neurodéveloppementaux par les fonctions non-canoniques de KCC2, tout en maintenant une réponse dépolarisante au GABA qui est essentielle lors du développement (voir partie II).

b. Phosphorylation par les protéine-kinases C (PKC)

Les protéine-kinases C constituent une famille de sérine/thréonine kinases fortement exprimées et actives dans le cerveau (Callender & Newton, 2017). A l'état basal, l'ensemble des PKCs sont maintenues dans un état auto-inhibé (Callender & Newton, 2017). Cette inhibition est levée par l'interaction de chacune des sous-familles de PKC avec un second messager qui lui est propre : le calcium et le diacylglycérol pour les PKCs conventionnelles (α, β, γ), le diacylglycérol seul pour les nouvelles PKCs (δ, ε, θ, η) ou des protéines d'échafaudage pour les PKCs atypiques (Callender & Newton, 2017). Les PKCs conventionnelles sont largement prédominantes dans le système nerveux (Saito & Shirai, 2002), nous allons donc uniquement détailler la régulation de cette sous-famille. L'auto-inhibition des PKCs conventionnelles est levée à la suite de l'activation d'un récepteur membranaire capable d'activer les phospholipases C, tel que TrkB ou les récepteurs couplés aux protéines G (récepteurs métabotropiques du glutamate, récepteurs sérotoninergiques, adrénergiques, de l'ocytocine, etc.) (Callender & Newton, 2017). L'activation des phospholipases C résulte en une synthèse de diacylglycérol et en une élévation de la concentration intracellulaire en calcium (Callender & Newton, 2017; Huang & Reichardt, 2003 ; voir partie I.4.1). Le calcium et le diacylglycérol se lient alors séquentiellement aux PKCs et entrainent la libération de leur pseudo-substrat inhibiteur, provoquant leur activation (Callender & Newton, 2017). Une fois activées, les PKCs régulent un grand nombre de phénomènes dans les neurones dont l'expression membranaire et l'activation de différents canaux calciques voltage-dépendants, l'activité des récepteurs AMPA et NMDA ou encore l'internalisation/sécrétion du calcium par le réticulum endoplasmique (Callender & Newton, 2017; Gada & Logothetis, 2022; Y. Lin et al., 2006; Usachev et al., 2006). Cela fait de ces kinases senseurs de calcium des régulateurs clés de la concentration intracellulaire du calcium. Par ailleurs, l'activation des récepteurs NMDA entraine une entrée de calcium dans le neurone post-synaptique et en promeut la production et la libération de BDNF (Brigadski & Leßmann, 2020). Le BDNF active à son tour le récepteur TrkB et provoque ainsi l'activation des PKCs (Eboli et al., 1994; Vaccarino et al., 1991).

Le seul résidu de KCC2 qui ait été démontré comme étant phosphorylé par les PKCs est la sérine 940 (H. H. C. Lee et al., 2007). La phosphorylation de KCC2 Ser940 par les protéine-kinases C stabilise son expression membranaire (H. H. C. Lee et al., 2007). L'effet de la phosphorylation de ce résidu a initialement été testé dans des cellules HEK-293 surexprimant KCC2 WT ou la forme déphosphomimétique de la protéine (S940A) (H. H. C. Lee et al., 2007). Dans ces cellules, l'activation des PKCs entraine diminution de la vitesse d'endocytose de KCC2 WT et une augmentation de son activité de transporteur (H. H. C. Lee et al., 2007). Cet effet est aboli lorsque les cellules surexpriment la forme déphosphomimétique de la protéine

(S940A) (H. H. C. Lee et al., 2007). L'activation des PKCs dans les neurones pyramidaux de CA3 entraine aussi une augmentation de l'export de chlorure par KCC2 (Banke & Gegelashvili, 2008). Ces résultats démontrent que la phosphorylation de la protéine par les PKCs stabilise son expression membranaire en inhibant son endocytose et lui permet d'assurer sa fonction de transporteur. Par ailleurs, l'inhibition des PKCs dans des neurones en culture diminue le niveau de phosphorylation basal de KCC2 et la protéine mutante S940D présente une dynamique membranaire comparable à KCC2 WT (Chamma et al., 2013; H. H. C. Lee et al., 2007). Le transporteur est donc constitutivement phosphorylé par les PKCs à l'état basal en culture. Ces résultats sont contradictoires avec ceux obtenus dans la lignée murine KCC2 S940A chez laquelle la mutation ne semble pas affecter l'expression membranaire et la fonction de KCC2 (Silayeva et al., 2015). Cette discordance peut être due à une différence de régulation de la protéine par les PKCs en culture et *in vivo* ou à la mise en place de mécanismes de compensation *in vivo*.

Le traitement de neurones en culture avec différents inhibiteurs de phosphatases a permis de démontrer que la sérine 940 de KCC2 est activement déphosphorylée par la phosphatase PP1 (H. H. C. Lee et al., 2011). En effet, le traitement des neurones avec de l'acide okadaïque (inhibiteur de PP1 et PP2A) augmente la phosphorylation de KCC2 Ser940 tandis que leur incubation avec de la cyclosporine A (inhibiteur de la calcineurine/PP2B) n'a pas d'effet sur la phosphorylation du résidu, écartant une implication de PP2B (H. H. C. Lee et al., 2011). De plus, l'acide okadaïque n'augmente la phosphorylation de la sérine qu'avec une concentration supérieure à 100 nM (H. H. C. Lee et al., 2011). La concentration inhibitrice médiane (IC_{50}) de l'acide okadaïque étant de 15-50 nM pour PP1 et de 0.1-0.3 nM pour PP2A, cela démontre que la sérine 940 est spécifiquement déphosphorylée par PP1 (H. H. C. Lee et al., 2011).

La transmission synaptique excitatrice est à l'origine d'une régulation bidirectionnelle de l'activité de KCC2 qui dépend du type de récepteur glutamatergique activé (Banke & Gegelashvili, 2008; Chamma et al., 2013). Dans un contexte physiologique, l'activation combinée de deux récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR1 et mGluR5) dans les neurones pyramidaux de CA3 provoque une hyperpolarisation de E_{GABA} (Banke & Gegelashvili, 2008). Cet effet est aboli lorsque les tranches d'hippocampe sont incubées de façon continue avec un inhibiteur des PKCs (Banke & Gegelashvili, 2008). Réciproquement, la dépolarisation de E_{GABA} provoquée par l'inhibition des récepteurs mGluR1 et 5 est abolie lorsque KCC2 est inhibé (Banke & Gegelashvili, 2008). Ces résultats démontrent que la stimulation des récepteurs métabotropiques 1 et 5 du glutamate entraine l'activation des protéine-kinases C, qui phosphorylent la sérine 940 de KCC2 et augmentent son activité de transporteur (Banke & Gegelashvili, 2008). A l'inverse, une forte activation des récepteurs

NMDA dans des neurones en culture entraine une augmentation de la diffusion de KCC2 à la membrane plasmique, une diminution de son expression membranaire et une diminution de son activité (Chamma et al., 2013; Lee et al., 2011). Cet effet est corrélé à une diminution de la phosphorylation de la sérine 940 (Lee et al., 2011) et est aboli lorsque les neurones expriment le mutant phosphomimétique KCC2 S940D (Chamma et al., 2013). L'activation des récepteurs NMDA entraine donc la déphosphorylation de KCC2. Il a été démontré que cette activation favorise la localisation de PP1 au niveau de la membrane post-synaptique et facilite la déphosphorylation de protéines synaptiques par PP1 (Morishita et al., 2001). Nous pouvons donc supposer que la stimulation de ces récepteurs ionotropiques entraine la déphosphorylation de KCC2 par PP1. De plus, l'inhibition des calpaïnes abolit l'effet de l'activation des récepteurs sur la diffusion membranaire de KCC2 (Chamma et al., 2013). Ainsi, il est probable que l'activation des récepteurs NMDA entraine la déphosphorylation de KCC2 par PP1 ainsi que l'activation des calpaïnes qui se lient à KCC2 (potentiellement grâce à sa déphosphorylation) et le clive. Ces processus convergent pour provoquer l'endocytose ainsi que la dégradation de KCC2 et diminuer l'export de chlorure des neurones en réponse à une forte activité neuronale. Cela contribue probablement à d'autant plus augmenter l'activité des neurones.

De façon intéressante, il a été observé que la potentialisation synaptique à long terme est associée à une diminution de l'expression de KCC2, et que l'inhibition du transporteur augmente la capacité des PPSEs à générer des potentiels d'action (W. Wang et al., 2006). La diminution de l'expression de KCC2 semble donc jouer un rôle important dans la plasticité synaptique. Nous pouvons ainsi supposer que la dégradation de KCC2 en réponse à l'activité neuronale augmente d'autant plus cette activité et favorise la potentialisation synaptique à long terme.

La phosphorylation de la sérine 940 semble aussi évoluer au cours du développement. En effet, elle est maximale dans les neurones immatures puis diminue entre 5 et 10 jours en culture, avant de se stabiliser (Moore et al., 2019). Les neurones issus de la lignée murine KCC2 S940A ont une valeur de E_{GABA} plus dépolarisée que des neurones WT à différents stades de maturation (4-6 et 14-19 jours en culture) mais ne semblent pas présenter d'altération temporelle de leur *GABA shift* (Moore et al., 2019). Cela suggère que la sérine 940 ne joue pas un rôle aussi important que les thréonines 906 et 1007 dans la régulation développementale de KCC2.

c. Phosphorylation par les kinases de la famille des Src (SFK)

Les kinases de la famille des Src sont des tyrosine-kinases cytosoliques qui phosphorylent un grand nombre de récepteurs dans le système nerveux (Ohnishi et al., 2011). Leur activation est notamment contrôlée par l'autophosphorylation de leur tyrosine 416, localisée dans leur boucle d'activation, qui permet un changement de conformation de la protéine et l'activation de son domaine catalytique (Ohnishi et al., 2011). Il a récemment été démontré que l'activité des SFKs est différentiellement régulée par les récepteurs muscariniques de l'acétylcholine (L.-M. Mao et al., 2024). Tandis que la stimulation du récepteur M1 couplé aux protéines G_q entraine l'activation de ces tyrosine-kinases, la stimulation du récepteur M4 couplé aux protéines $G_{i/o}$ provoque leur inhibition (L.-M. Mao et al., 2024).

KCC2 est phosphorylé par les SFKs au niveau de ses tyrosines 903 et 1087 (1086 chez la souris) (H. H. C. Lee et al., 2010; Watanabe et al., 2009). Des cellules HEK-293 surexprimant le transporteur déphosphomimétique KCC2 Y903F ou KCC2 Y1087F et traitées avec un inhibiteur de tyrosine-phosphatases présentent une diminution globale de la phosphorylation de KCC2 en comparaison de cellule exprimant KCC2 WT (Lee et al., 2010). Cela démontre que KCC2 WT peut être phosphorylé sur ces résidus lorsqu'il est surexprimé dans un système hétérologue. Ces résidus sont déphosphorylés par des tyrosine-phosphatases mais les enzymes responsables de leur déphosphorylation n'ont pas été identifiées (H. H. C. Lee et al., 2010; Watanabe et al., 2009). Les études initiales sur le sujet s'accordaient pour dire que la phosphorylation des tyrosines de KCC2 entraine sa stabilisation à la membrane et favorise son activité (Kelsch et al., 2001; Wake et al., 2007; Watanabe et al., 2009). En effet, l'incubation de neurones en culture avec de la génistéine, un inhibiteur des tyrosine-kinases, diminue la formation d'agrégats par KCC2 ainsi que son activité de transporteur (Kelsch et al., 2001; Watanabe et al., 2009). A l'inverse, l'inhibition des tyrosine-phosphatases par du vanadate de sodium entraine une augmentation de la proportion de molécules KCC2 localisés dans les radeaux lipidiques, dans lesquels elles seraient stabilisées selon cette étude (Watanabe et al., 2009). Cela suggère que la phosphorylation des tyrosines de KCC2 favorise son agrégation dans les radeaux lipidiques, ce qui stabilise son expression membranaire et augmente sa fonction de transporteur.

Néanmoins, deux articles vont à l'encontre de ce modèle et proposent que la déphosphorylation des tyrosines de KCC2 est en fait associée à son oligomérisation et au maintien de sa stabilité membranaire (Liabeuf et al., 2026) tandis que leur phosphorylation provoque son endocytose et sa dégradation par les lysosomes, altérant sa fonction de transporteur (Lee et al., 2010). Étonnamment, l'une des études qui propose que la phosphorylation des tyrosines du transporteur stabilise son expression membranaire a aussi

démontré que la surexpression de KCC2 Y1087D, qui mime *a priori* la phosphorylation constitutive du résidu et non sa déphosphorylation comme cela est suggéré dans l'article, dans des neurones en culture ou dans un système hétérologue entraine sa désagrégation et une dépolarisation de E_{GABA} (Watanabe et al., 2009, Figures 3, 4, 6). Cela va à l'encontre de leur hypothèse initiale et suggère qu'il y a une diminution de la fonction du transporteur lorsque ses tyrosines sont phosphorylées. L'effet de la phosphorylation des tyrosines de KCC2 sur sa stabilité et sa fonction est donc débattu. Il dépend potentiellement du modèle d'étude ainsi que du niveau d'activation basal des SFKs et des tyrosine-phosphatases dans ce modèle. De même, si une augmentation de la phosphorylation des tyrosines de KCC2 lors du développement post-natal a été initialement suggérée (Vale et al., 2005), de nouveaux résultats semblent plutôt indiquer que la maturation neuronale est associée à une déphosphorylation du transporteur (Liabeuf et al., 2026). L'implication directe de ces (dé)phosphorylations sur l'acquisition de sa fonction de transporteur et sur le *GABA shift* n'a pas été étudiée.

Pour conclure, KCC2 est un co-transporteur cation-chlorure neuronal dont la fonction et la régulation ont été extensivement étudiées. Il joue un rôle essentiel dans l'inhibition synaptique rapide ainsi que dans un ensemble d'autres processus reposant sur sa fonction de transporteur. Il interagit structurellement avec différentes protéines ce qui lui permet de réguler leur stabilité et/ou leur expression membranaire. KCC2 est additionnellement associé à un ensemble de fonctions essentielles pour la régulation de processus neurodéveloppementaux, que nous allons détailler dans la partie suivante.
Néanmoins, l'écrasante majorité des études portant sur KCC2 se sont concentrées sur le rôle spécifique de KCC2b ou n'ont pas fait de distinction entre les isoformes du transporteur. Cela laisse la fonction de KCC2a globalement irrésolue dans le télencéphale. Au cours de ma thèse, j'ai donc étudié l'expression, la localisation et la fonction de cette isoforme au sein des neurones néocorticaux et hippocampiques.

II. Fonctions spécifiques associées à KCC2 lors du développement

1. Rôles du *GABA shift* et de la réponse dépolarisante au GABA

Comme nous l'avons détaillé précédemment (partie I.3.1), la prédominance de l'expression de NKCC1b sur celle de KCC2 dans les neurones immatures est responsable de la dépolarisation de leur potentiel de membrane en réponse à l'activation des récepteurs GABA-A. Cet effet est

maintenu jusqu'à la deuxième semaine post-natale chez la souris. Dans cette partie, nous allons détailler le rôle de la réponse dépolarisante au GABA dans divers processus neurodéveloppementaux dont la prolifération des progéniteurs neuronaux, la migration neuronale et la mise en place de synapses fonctionnelles. Mais avant cela, intéressons-nous à la temporalité de la mise en place des synapses GABAergiques et glutamatergiques lors du développement.

1.1. La séquence GABA-Glutamate

a. Chronologie de l'expression des sous-unités des différents récepteurs synaptiques

La dépolarisation du potentiel de membrane des neurones en réponse au GABA joue un rôle fondamental lors du développement car les signalisations GABAergique et glutamatergique sont mises en place différentiellement lors de la maturation neuronale (Ben-Ari, 2002; Ben-Ari et al., 2007). Ainsi, nous allons d'abord détailler la chronologie de l'établissement de ces signalisations. La mise en place de la transmission synaptique requiert l'expression de différentes protéines (récepteurs, transporteurs, enzymes, protéines d'échafaudage) ainsi que l'acquisition de leur fonction, notamment via des interactions protéiques et via leur adressage aux compartiments membranaires adaptés. L'initiation de l'expression des différentes sous-unités qui composent les récepteurs GABA-A, NMDA et AMPA varie en fonction de la région du système nerveux et de la sous-unité considérée. Elle a néanmoins lieu relativement tôt lors du développement (Figure 11). Dans le cortex de rat, l'ARNm des sous-unités β1, β3 et γ2 du récepteur GABA-A est déjà fortement exprimé à partir de E13 (Araki et al., 1992) tandis que celui des sous-unités α2, α3, α5 et β2 commence à être détecté à partir de E14 (Laurie et al., 1992). La sous-unité γ2 est généralement associée aux récepteurs GABA-A synaptiques tandis que α5 présente une expression majoritairement extra-synaptique (Caraiscos et al., 2004; Essrich et al., 1998). Cela suggère que les récepteurs GABA-A synaptiques et extra-synaptiques commencent à être synthétisés en même temps lors du développement. Les récepteurs NMDA sont des tétramères constitués de deux sous-unités GluN1 associées à deux sous-unités GluN2 ou GluN3, ou à une de chaque (Traynelis et al., 2010). Les sous-unités GluN1, GluN2B et GluN2D commencent à s'exprimer à E14 chez le rat, contre E15 pour GluN3A (Ewald & Cline, 2009). Enfin, les récepteurs AMPA sont aussi des tétramères constitués de différentes combinaisons des sous-unités GluA1-4, généralement sous la forme d'hétéromères (Traynelis et al., 2010). Similairement aux sous-unités des récepteurs GABA-A et NMDA, les premières sous-unités des récepteurs AMPA (GluA1 et 2) sont détectées à partir de E15 dans le striatum (Lilliu et al., 2001). Ainsi, l'expression des sous-unités précoces des récepteurs GABA-A, NMDA et AMPA est initiée quasiment en même temps dans le

télencéphale. Pourtant, ces différents récepteurs ne deviennent pas fonctionnels au même moment lors développement.

b. Mise en place de synapses fonctionnelles

Les courants post-synaptiques spontanés enregistrés dans les neurones corticaux entre P2 et P5 sont entièrement abolis par application de bicuculline, un antagoniste des récepteurs GABA-A, tandis que l'application d'antagonistes des récepteurs AMPA et NMDA (respectivement DNQX et AP-5) n'a aucun effet sur ces courants (Owens et al., 1999). Une très large majorité des neurones hippocampiques pyramidaux de rat sont silencieux et ne présentent pas de courant post-synaptiques spontanés ou évoqués à P0 (Tyzio et al., 1999). L'analyse des neurones déjà capables de générer des courants post-synaptiques à cet âge révèle que la moitié d'entre eux présente uniquement des courants médiés par l'activation des récepteurs GABA-A tandis que l'autre moitié présente des courants d'origine GABAergique et glutamatergique et est constituée de neurones avec une morphologie plus mature (Tyzio et al., 1999). L'ensemble de ces éléments démontre que la mise en place de la transmission GABAergique précède celle de la transmission glutamatergique.

L'existence d'une transmission GABAergique excitatrice lors du développement a été et reste globalement débattue. Après la découverte de ce phénomène *in vitro*, il a été proposé que l'observation d'un effet excitateur du GABA pourrait être un artéfact dû aux conditions expérimentales et notamment au traumatisme infligé aux neurones lors de la préparation des tranches (Bregestovski & Bernard, 2012; Zilberter, 2016). Néanmoins, une étude récente a démontré que les interneurones GABAergiques hippocampiques sont excitateurs jusqu'à P3 *in vivo* chez la souris (Murata & Colonnese, 2020). Cela semble confirmer que ce neurotransmetteur est probablement excitateur jusqu'à quelques jours après la naissance (Figure 11). Si tel est le cas, le GABA est alors le neurotransmetteur excitateur principal lors de la période néonatale, tandis que la transmission glutamatergique n'est pas encore établie. L'établissement de synapses fonctionnelles avec des interneurones pour cibles post-synaptiques a lieu selon la même séquence que pour les neurones pyramidaux mais de façon plus précoce (Hennou et al., 2002). Les interneurones étant les premières cellules à établir des synapses, les réseaux neuronaux embryonnaires sont très majoritairement constitués de ce type de neurones (Hennou et al., 2002).

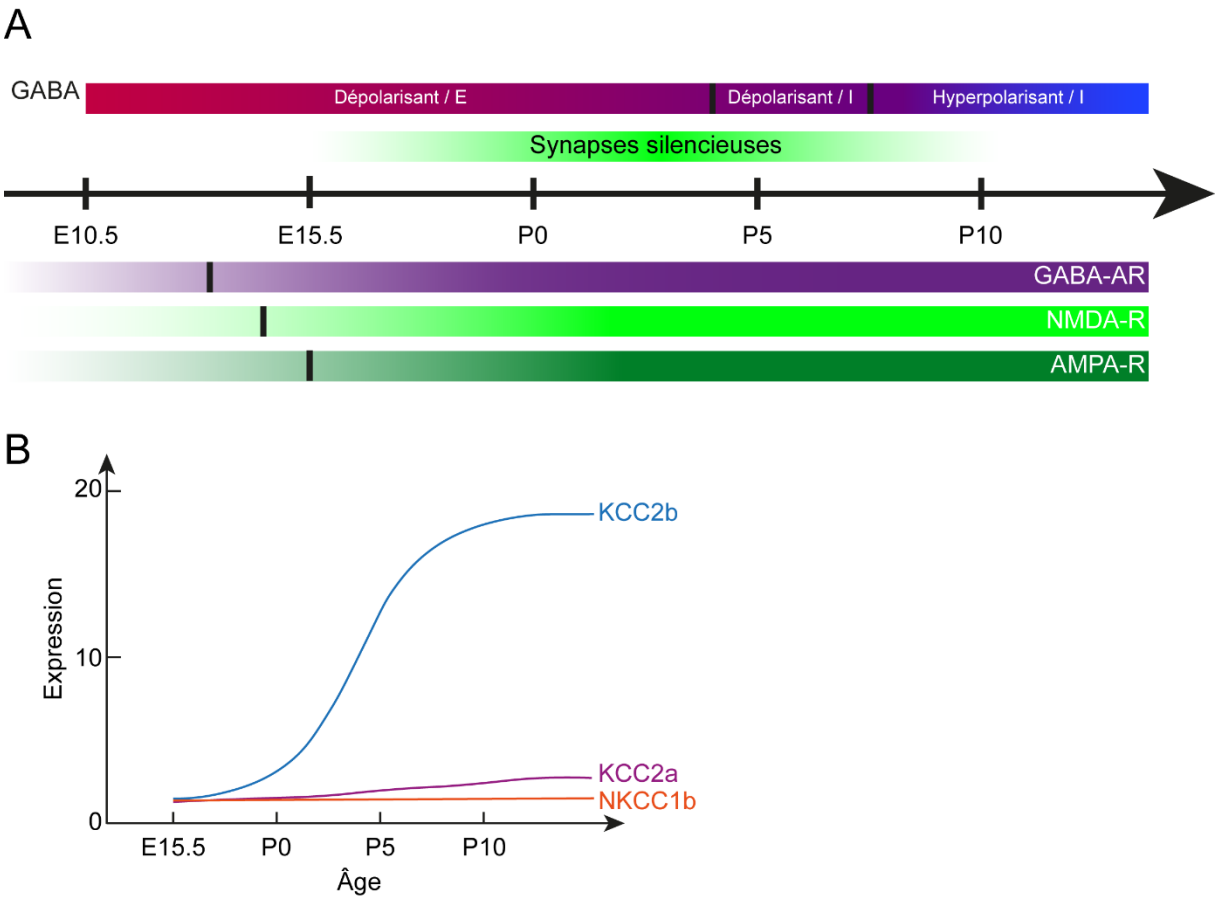


Figure 11. La séquence GABA-Glutamate.

A, Chronologie illustrant : l'évolution de l'effet de l'activation des récepteurs GABA-A, l'apparition transitoire des synapses glutamatergiques silencieuses et l'expression progressive des sous-unités des récepteurs GABA-A, NMDA et AMPA dans le néocortex de rongeurs. Les lignes noires représentent l'âge auquel les premières sous-unités du récepteur en question ont été observées ou l'âge le plus précoce auquel un effet donné du GABA a été rapporté. E : excitateur, I : inhibiteur. **B**, Evolution développementale de l'expression de KCC2a, KCC2b, NKCC1b chez la souris. L'expression est donnée en unités arbitraires et est normalisée par sa valeur initiale pour chaque protéine. Réalisé à partir de Uvarov et al., 2007 et Kurki et al., 2023.

Il existe aussi un délai dans l'acquisition de la fonctionnalité des récepteurs AMPA et NMDA. Lors d'expériences de patch-clamp, des courants post-synaptiques excitateurs (CPSEs) ont été évoqués par la stimulation des afférents de neurones maintenus à différents potentiels afin d'isoler les courants dus à l'activation des différents récepteurs glutamatergiques (Durand et al., 1996). Entre P0 et P2, la stimulation évoque des CPSEs lorsque les neurones sont maintenus à un potentiel particulièrement dépolarisé (40 mV) qui permet l'activation des récepteurs NMDA (Durand et al., 1996). Elle n'évoque en revanche pas de courants si les neurones sont maintenus à un potentiel proche de leur potentiel de repos (-60 mV), autour duquel les récepteurs AMPA peuvent être activés (Durand et al., 1996). Par ailleurs, la majorité des courants évoqués par la stimulation sont abolis par l'application d'AP-5 tandis que

l'application de CNQX n'a généralement pas d'effet (Durand et al., 1996). Cela démontre que lors de la période périnatale, les neurones forment majoritairement des synapses silencieuses, caractérisées par la présence de récepteurs NMDA fonctionnels et l'absence de récepteurs AMPA opérationnels (Isaac et al., 1995). Similairement, lors du développement du xénope, la stimulation des neurones du chiasme optique entraine une réponse évoquée dans les neurones du tectum optique qui repose initialement intégralement sur les récepteurs NMDA (G.-Y. Wu et al., 1996). Il y a ensuite une augmentation progressive du ratio des réponses AMPA/NMDA au cours de la première semaine post-natale chez le rat, associée à une augmentation progressive de l'expression synaptique des récepteurs AMPA après la naissance (Durand et al., 1996; Petralia et al., 1999). En effet, 80% des synapses présentent une réponse qui dépend intégralement des récepteurs NMDA à P2 contre seulement 30% au-delà de P7 (Durand et al., 1996).

c. Activation précoce des récepteurs GABA-A extra-synaptiques

Bien que la majorité des neurones soient silencieux à P0, l'application de GABA exogène sur les progéniteurs neuronaux de la zone ventriculaire de rat à E15-16 entraine un courant sortant de chlorure ainsi que la dépolarisation du potentiel de membrane de ces cellules (LoTurco et al., 1995; Owens et al., 1999). L'application de glutamate à E15 sur ces mêmes cellules entraine aussi leur dépolarisation bien que moins de cellules répondent au glutamate qu'au GABA (LoTurco et al., 1995). Les progéniteurs neuronaux expriment donc des récepteurs GABA-A fonctionnels dès E15-16 mais, comme nous l'avons vu précédemment, ces derniers ne sont pas activés spontanément au niveau des synapses. En absence de stimulation, l'inhibition des récepteurs GABA-A de neurones immatures par de la bicuculline entraine un courant sortant d'ion (Demarque et al., 2002). Cela démontre qu'il existe des récepteurs GABA-A toniquement activés chez les progéniteurs neuronaux et les neurones immatures. Les synapses n'étant pas fonctionnelles à E15, ces récepteurs GABA-A sont donc probablement extra-synaptiques.

Les données cellulaires et moléculaires sont en accord avec cette idée. En effet, le transporteur permettant le chargement du GABA dans les vésicules pré-synaptiques (VGAT) ne commence à s'exprimer à large échelle dans le cortex de rat qu'à partir de P5, et la présence de synapses inhibitrices avec une morphologie mature n'est détectable qu'à partir de P5-10 (Micheva & Beaulieu, 1996; Minelli et al., 2003). Les courants post-synaptiques dépolarisants observés dès E15-16 lors de l'application de GABA exogène ne peuvent donc pas provenir de synapses inhibitrices fonctionnelles. Pourtant, plusieurs types cellulaires commencent à produire du GABA particulièrement tôt lors du développement. Les cellules

neuroépithéliales produisent le neurotransmetteur dès E10 (Haydar et al., 2000). Par la suite, les interneurones commencent aussi à produire du GABA. La majorité des interneurones corticaux sont produits au niveau des éminences ganglionnaires (médiale, caudale, latérale), des structures transitoires du cerveau embryonnaire qui sont formées à E11.5 lors du développement murin (Kelsom & Lu, 2013; Wonders & Anderson, 2006). Les interneurones issus de l'éminence ganglionnaire médiale se différencient puis entament leur migration tangentielle vers le cortex à environ E12.5 (Myers et al., 2014). Ces neurones expriment le GABA ainsi que l'une des enzymes permettant sa synthèse, la glutamate-décarboxylase (GAD67), à partir de E17, tandis qu'ils sont encore en train de migrer au travers des zones transitionnelle et sous-ventriculaire (Ma & Barker, 1995). A P0, de nombreux interneurones présents dans différentes strates du néocortex somatosensoriel produisent aussi du GABA (Takayama & Inoue, 2010). Cela suggère qu'entre E10 et P5, différents types de neurones présentent une libération paracrine de GABA, qui se lie à des récepteurs GABA-A extra-synaptiques. L'existence de récepteurs GABA-A extra-synaptiques au début du développement cérébral est appuyée par l'expression précoce de la sous-unité α5 du récepteur, qui présente une expression majoritairement extra-synaptique et médie une inhibition tonique des neurones (Caraiscos et al., 2004; Laurie et al., 1992). Ainsi, lors du développement, la transmission GABAergique précède la formation des synapses inhibitrices et excitatrices et repose sur un processus paracrine. Comme nous allons le voir par la suite, la mise en place précoce d'une transmission GABAergique paracrine dépolarisante est essentielle pour divers processus neurodéveloppementaux.

d. Le GABA dépolarisant entraine l'activation des canaux calciques voltage-dépendants

Lors de la période périnatale, l'application de GABA ou de muscimol (agoniste des récepteurs GABA-A) sur des tranches de cortex de rat ou des cultures de neurones corticaux entraine une augmentation transitoire de la concentration intracellulaire en calcium des neurones (Berninger et al., 1995; Brady et al., 2018; M.-H. Lin et al., 1994; Yuste & Katz, 1991). Cet effet diminue lors des deux premières semaines après la naissance et est aboli après P15, suggérant qu'il dépend du caractère dépolarisant du GABA (M.-H. Lin et al., 1994). Par ailleurs, l'application de nickel, qui bloque les canaux calciques voltage-dépendants, ou d'un bloqueur des canaux calciques voltage-dépendants de type L dans la solution d'enregistrement abolit l'augmentation de $[Ca^{2+}]$ intra-neuronale en réponse au GABA ou au muscimol (Brady et al., 2018; M.-H. Lin et al., 1994). Ces résultats démontrent que lors de la période périnatale, la dépolarisation du potentiel de membrane des neurones engendrée par l'activation des récepteurs GABA-A provoque l'activation de canaux calciques voltage-dépendants,

notamment de type L. C'est essentiellement par le biais de l'élévation de la concentration intracellulaire de calcium, qui active de nombreuses voies de signalisation dans les neurones, que le GABA régule divers aspects du neurodéveloppement.

1.2. Rôle du GABA dépolarisant dans la prolifération, la migration et la maturation neuronale

La majorité des cellules produites lors du développement du néocortex (neurones pyramidaux, astrocytes, oligodendrocytes) proviennent de deux structures localisées à proximité des ventricules : la zone ventriculaire (ZV) et la zone sous-ventriculaire (ZSV) (Tramontin, 2003). La zone ventriculaire est majoritairement constituée des noyaux de cellules gliales radiales apicales (CGRa), des cellules souches qui se divisent par un mécanisme d'oscillation de leur noyau appelé migration nucléaire inter-cinétique et sont à l'origine de la majorité des cellules du néocortex (Beattie & Hippenmeyer, 2017; Götz & Huttner, 2005; Viola et al., 2024). La zone sous-ventriculaire est constituée des noyaux de cellules gliales radiales basales (CGRb) ainsi que de progéniteurs intermédiaires (Götz & Huttner, 2005; Viola et al., 2024). Les CGRa se divisent initialement de façon symétrique, générant de nouvelles CGRa, puis leur division devient asymétrique. Elles produisent alors une CGRa associée à une CGRb, à un progéniteur intermédiaire ou encore à un neurone (Beattie & Hippenmeyer, 2017; Götz & Huttner, 2005). Les progéniteurs intermédiaires présentent généralement une division symétrique formant deux nouveaux progéniteurs intermédiaires ou deux neurones (Pontious et al., 2008). Les premiers neurones formés par ce mécanisme constituent la pré-plaque, qui se subdivise à E13.5 en la sous-plaque et la zone marginale (Viola et al., 2024). A la suite de ce processus, les neurones formés par les CGRs et par les progéniteurs intermédiaires migrent le long des CGRs selon un processus appelé migration radiaire (Viola et al., 2024). Ils atteignent alors la plaque corticale où ils s'organisent selon un modèle "*inside-out*" : les neurones les plus récemment synthétisés constituent les strates les plus superficielles du néocortex tandis que les plus anciens forment les strates les plus profondes (Viola et al., 2024).

Comme nous l'avons détaillé précédemment (Partie II.1.1), la majorité des interneurones corticaux sont produits au niveau des éminences ganglionnaires et migrent tangentiellement vers le cortex (Kelsom & Lu, 2013; Myers et al., 2014; Wonders & Anderson, 2006). Après la naissance, les cellules de la zone ventriculaire épuisent progressivement leur caractère prolifératif, entrainant la disparition de la ZV qui est progressivement remplacée par des cellules épendymaires tandis que la zone sous-ventriculaire est maintenue et constitue une région de neurogénèse adulte (Tramontin, 2003).

La vitesse de prolifération des cellules souches et des progéniteurs neuronaux peut être mesurée en incubant des tranches ou des cellules dans un milieu contant de la thymidine tritiée (^{3}H-thymidine), une forme radioactive du nucléoside, ou un analogue synthétique de la thymidine tel que la bromodésoxyuridine (BrdU) (Martí-Clúa, 2023). Ces deux nucléosides sont incorporés dans l'ADN des cellules se trouvant en phase S lors de leur présence dans le milieu et permettent, selon les paramètres expérimentaux, de déterminer la fraction des cellules en prolifération lors de l'incubation, la durée du cycle cellulaire, la durée de la phase S, etc. (Martí-Clúa, 2023).

a. Effet du GABA sur la prolifération des progéniteurs neuronaux

Il a initialement été observé que l'application de bicuculline sur des tranches de cortex d'embryon (E19) de rat entraine une augmentation de l'incorporation de la thymidine tritiée dans l'ADN des progéniteurs de la zone ventriculaire (LoTurco et al., 1995). Cela suggère qu'il y a une inhibition constitutive de la réplication de l'ADN dans la ZV par le GABA lors de la phase tardive du développement embryonnaire (LoTurco et al., 1995). Réciproquement, des tranches de cortex incubées dans du GABA pendant 12h présentent une quantité de cellules de la ZV ayant incorporé de la BrdU très inférieure aux tranches non traitées (LoTurco et al., 1995). Le GABA diminue donc la proportion des cellules en mitose dans la zone ventriculaire, ce qui peut avoir différentes causes telles qu'une augmentation de la durée des cycles cellulaires ou une différenciation plus précoce des neurones. Cet effet est aboli lorsque les tranches sont traitées avec du furosémide, un inhibiteur de KCC2 et NKCC1 qui provoque une hyperpolarisation du potentiel d'inversion des courants au travers des récepteurs GABA-A dans les neurones immatures (LoTurco et al., 1995). L'effet du GABA sur la prolifération des progéniteurs de la zone ventriculaire dépendrait donc de son effet dépolarisant. Or, ces résultats ont été contestés par la suite. En effet, il a été démontré peu de temps après cette étude initiale que le GABA augmente la prolifération des progéniteurs de la zone ventriculaire en raccourcissant leur cycle cellulaire tandis qu'il diminue la prolifération cellulaire dans la zone sous-ventriculaire (Haydar et al., 2000; X. Liu et al., 2005; Figure 12). Les résultats contradictoires obtenus dans l'étude de LoTurco *et al*. seraient dus à une absence de distinction entre les progéniteurs de la ZV et ZSV lors des analyses, entrainant le mélange de l'effet du GABA sur ces deux zones (Haydar et al., 2000; LoTurco et al., 1995).

L'effet du GABA sur la prolifération des progéniteurs de cellules en grain du cervelet semble dépendre des conditions expérimentales. Lorsque ces cellules sont maintenues dans une solution concentrée en potassium chlorure (entrainant une dépolarisation de leur potentiel de

membrane), l'application de GABA augmente l'incorporation de la thymidine tritiée dans leur ADN (Fiszman et al., 1999). La dépolarisation du potentiel de membrane des cellules en grain via leur incubation dans une solution concentrée en potassium chlorure pendant moins de 24h est aussi suffisante pour augmenter leur prolifération, même en absence d'application de GABA (Borodinsky & Fiszman, 1998). Cet effet est aboli en présence de bloqueurs des canaux calciques voltage-dépendants ou de l'inhibiteur des kinases MEK (PD98059) (Fiszman et al., 1999). Il repose donc sur l'activation des canaux calciques voltage-dépendants à la suite de la réponse dépolarisante au GABA, qui provoque une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ responsable de l'activation de la voie MEK/ERK. Néanmoins, l'incubation de progéniteurs de cellules en grain dans une solution de KCl pendant plus de 24h provoque à l'inverse une diminution de leur prolifération (Borodinsky & Fiszman, 1998; Cui & Bulleit, 1998). Cette discordance sur l'effet de la dépolarisation du potentiel de membrane s'explique probablement par la différence de temps pendant lequel la membrane des cellules reste dépolarisée, qui pourrait résulter en l'activation de voies différentes.

b. Effet du GABA sur la migration radiale et tangentielle

Le GABA présente un effet complexe sur la migration neuronale qui semble dépendre de la structure du cerveau, du type neuronal, du stade de développement et du récepteur au GABA considéré. Si lors de la migration des neurones pyramidaux du néocortex, l'activation des récepteurs GABA-B et GABA-C (récepteur GABA-A contenant la sous-unité ρ) semble favoriser la motilité des neurones et permettre la chemo-attraction de ces derniers vers le GABA (T. Behar et al., 1996; T. N. Behar et al., 1998), l'effet de l'activation du récepteur GABA-A est plus débattu.

La majorité des études portant sur la migration des neurones corticaux pyramidaux à des stades de développement tardifs indiquent que l'activation des récepteurs GABA-A atténue ou arrête la migration de ces neurones (T. N. Behar, 2000; T. N. Behar et al., 1998; Heck et al., 2006). En effet, tandis que l'incubation de neurones corticaux en culture avec un analogue synthétique du GABA qui permet l'activation quasi-spécifique des récepteurs GABA-C entraine une augmentation de la motilité des neurones, l'ajout de muscimol dans le milieu inhibe la migration induite par cet analogue (T. N. Behar et al., 1998). Dans une autre étude, des tranches de cortex de rat (E18) ont été incubées avec de la BrdU afin de marquer les cellules de la ZV lors de leur dernière division avant leur migration (T. N. Behar, 2000). Les tranches ont ensuite été incubées 48h dans un milieu contrôle ou contenant de la bicuculline (T. N. Behar, 2000). Il a été observé que l'inhibition des récepteurs GABA-A entraine une augmentation de la quantité de cellules marquées ayant atteint la plaque corticale à 48h,

suggérant que l'activation des récepteurs GABA-A est importante pour l'arrêt de la migration des neurones pyramidaux (T. N. Behar, 2000). L'implantation de rats nouveau-nés avec un dispositif permettant une libération continue de bicuculline dans le néocortex entraine la formation d'une hétérotopie à P7, ce qui indique que les neurones ont migré au-delà de la surface piale et n'ont pas reçu de signal d'arrêt de la migration (Heck et al., 2006). Il a par ailleurs été démontré que la dépolarisation du potentiel de membrane des neurones, via leur incubation dans une solution concentrée en potassium, inhibe la migration induite par l'activation des récepteurs GABA-C, au même titre que le muscicol (T. N. Behar et al., 1998). De plus, la bicuculline abolit les courants calciques transitoires ayant lieu à P0 (Heck et al., 2006). La dépolarisation du potentiel de membrane, subséquente à l'activation des récepteurs GABA-A, active les canaux calciques voltages-dépendants et entraine des influx de calcium dans les neurones. Ces influx activent probablement des voies de signalisation responsables de l'arrêt de la migration des neurones. Il est toutefois important de noter qu'une étude portant sur des cultures corticales issues d'embryons de rat plus précoces (E15-17) ainsi qu'un article reposant sur des cultures hippocampiques de rat (E17-18) ont obtenus des résultats opposés à ceux précédemment discutés (T. Behar et al., 1996; Manent et al., 2005). Dans ces deux études, l'activation des récepteurs GABA-A favorise la migration neuronale (T. Behar et al., 1996; Manent et al., 2005). Cette différence pourrait provenir de la maturité moins importante des neurones étudiés, soit parce qu'ils proviennent d'embryons plus précoces, soit parce qu'ils ont une origine hippocampique et maturent légèrement plus lentement.

L'effet de l'activation des récepteurs GABA-A sur la migration tangentielle des interneurones issus de l'éminence ganglionnaire médiale (EGM) dépend de leur maturité et notamment de leur niveau d'expression de KCC2 (Bortone & Polleux, 2009; Cuzon et al., 2006, Figure 12). Il existe une forte hétérogénéité de l'expression du transporteur parmi les interneurones lors du développement (Bortone & Polleux, 2009). Il a été démontré que la migration des interneurones présentant une faible expression endogène de KCC2 dans des explants d'EGM de souris n'est pas ou peu influencée par le GABA (Bortone & Polleux, 2009). A l'inverse, la migration des interneurones qui ont une plus forte expression du transporteur est sensible au GABA (Bortone & Polleux, 2009). Le neurotransmetteur augmente notamment la fréquence des pauses migratoires de ces neurones (Bortone & Polleux, 2009).

L'électroporation d'implants d'EGM avec un ARN interférent contre KCC2 augmente la quantité d'interneurones qui sont encore en migration après sept jours en culture lorsqu'ils sont incubés dans un milieu contrôle (Bortone & Polleux, 2009). A l'inverse, le maintien d'une faible expression de KCC2 augmente la fréquence des pauses migratoires lorsque les explants sont incubés avec de la bicuculline (Bortone & Polleux, 2009). Ces résultats illustrent qu'une faible

expression du transporteur dans les interneurones favorise leur migration selon un mécanisme qui dépend de l'activation tonique des récepteurs GABA-A. Une autre étude a démontré que le GABA dépolarisant favorise le passage de la jonction entre le striatum et le néocortex par les interneurones lors de leur migration, sans pour autant affecter leur vitesse de déplacement (Cuzon et al., 2006). Les neurones exprimant l'ARN interférent contre KCC2 présentent par ailleurs plus de transitoires calciques que les interneurones avec une forte expression du transporteur (Bortone & Polleux, 2009). L'abolition de ces transitoires via un chélateur de calcium ou un bloqueur des canaux calciques voltage-dépendants diminue la quantité d'interneurones en migration (Bortone & Polleux, 2009). Ainsi, lorsque les interneurones ont une faible expression de KCC2, la dépolarisation due à l'activation tonique des récepteurs GABA-A agit en synergie avec l'activation des récepteurs AMPA et NMDA et promeut la production de transitoires calciques qui favorisent la migration des neurones.

Les interneurones qui surexpriment une protéine KCC2 exogène, présentent une augmentation de leurs pauses migratoires lorsqu'ils sont incubés dans du muscimol et une diminution de ces dernières lorsqu'ils sont soumis à de la bicuculline (Bortone & Polleux, 2009). La surexpression de KCC2 diminue aussi la quantité d'interneurones encore en migration après sept jours en culture (Bortone & Polleux, 2009). L'expression du transporteur favorise donc l'arrêt de la migration tangentielle. Par ailleurs, la co-expression de l'ARN interférent contre KCC2 et du canal potassique à rectification entrante Kir2.1, responsable de l'hyperpolarisation du potentiel de membrane des neurones, augmente la fréquence des pauses migratoires des interneurones en comparaison de ceux exprimant uniquement l'ARN interférent (Bortone & Polleux, 2009). L'ensemble de ces résultats démontrent que la migration tangentielle des interneurones est contrôlée par leur niveau d'expression de KCC2. Dans les interneurones immatures exprimant faiblement le transporteur, la dépolarisation constitutive du potentiel de membrane en réponse au GABA ambiant favorise la migration neuronale. Dans les neurones plus matures avec une plus forte expression de KCC2, l'hyperpolarisation du potentiel de membrane en réponse au GABA représente un signal d'arrêt de la migration.

c. Effet du GABA sur la morphogénèse des neurones

Lors de leur migration, les neurones sont déjà polarisés et présentent généralement une structure bipolaire (Hatanaka et al., 2016). Ils possèdent un prolongement guide, localisé à l'avant du corps cellulaire, qui est constitué d'un cône de croissance permettant au neurone de s'orienter en fonction des molécules de guidage, ainsi qu'un prolongement caudal, qui forme par la suite l'axone chez certains types neuronaux (Hatanaka et al., 2016). C'est cependant après leur migration que les neurones commencent à acquérir une morphologie

plus complexe en développant leur arborisation dendritique ainsi que leur axone (Hatanaka et al., 2016). Plusieurs études ont rapporté que le blocage de la transmission GABAergique altère fortement la morphogénèse neuronale en culture et *in vivo* (Barbin et al., 1993; Cancedda et al., 2007; Maric et al., 2001). L'incubation de neurones avec de la bicuculline ou avec un inhibiteur des glutamate-décarboxylases lors des premiers jours après leur mise en culture entraine une forte diminution de leur nombre de neurites primaires et d'embranchements entre les neurites *vivo* (Barbin et al., 1993; Maric et al., 2001). L'altération de la morphogénèse des neurones par la bicuculline est abolie si ces derniers sont incubés dans une solution concentrée en potassium entrainant la dépolarisation de leur potentiel de membrane (Maric et al., 2001). A l'inverse, la perte d'expression de KCC2 n'affecte pas la morphogénèse des neurones immatures en culture, démontrant que celle-ci repose sur la signalisation GABAergique dépolarisante (Kontou et al., 2021). L'effet dépolarisant du GABA semble donc essentiel pour la morphogénèse des neurones en culture.

La surexpression précoce (E17-18) de KCC2 dans des neurones pyramidaux *in vivo* semble entrainer une diminution de la quantité et de la longueur de leurs dendrites à P6 et P14 (Cancedda et al., 2007, mais absence d'effet dans Fiumelli et al., 2013). Cet effet serait dû à l'avancement temporel du *GABA shift* induit par la surexpression du transporteur puisqu'il peut être reproduit en éléctroporant les neurones avec une construction codant pour le canal potassique à rectification entrante Kir2.1 (Cancedda et al., 2007). Ces résultats suggèrent que l'effet dépolarisant du GABA sur les neurones immatures est important pour la synthèse de leurs neurites et la mise en place de leur arborisation dendritique. Tandis que l'incubation de cellules en grain dans un milieu contenant du GABA augmente la complexité de leur arborisation dendritique, cet effet est aboli lorsque les neurones sont co-incubés avec des bloqueurs de l'influx de calcium ou des inhibiteurs des kinases MEK1 et CaMKII (Borodinsky et al., 2003). Ce phénomène repose sur un effet direct de l'influx de calcium sur ces kinases puisque l'application de GABA sur les cellules en grain entraine une augmentation de la phosphorylation des kinases Erk1, Erk2 et CaMKII au bout de cinq minutes d'incubation (Borodinsky et al., 2003). Ainsi, similairement à ce que nous avons précédemment détaillé concernant la prolifération des cellules en grain, la signalisation GABAergique dépolarisante contrôle la morphogénèse de ces mêmes neurones via la voie MEK/ERK, activée par l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium.

Comme nous l'avons vu dans la partie I.4.1, l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium active la transcription et la libération du BDNF par certains types de neurones (Brigadski & Leßmann, 2020). Or le BDNF est un facteur neurotrophique fondamental pour l'acquisition de la morphologie des neurones (Kuczewski et al., 2009). La signalisation

GABAergique dépolarisante étant associée à une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium, son effet sur la production de BDNF a fait l'objet de plusieurs études (Figure 12). Il a notamment été observé que l'incubation de neurones hippocampiques en culture avec du GABA ou du muscimol pendant cinq jours provoque une augmentation de l'expression du BDNF due l'activation des canaux calciques voltage-dépendants (Berninger et al., 1995). Cela entraine un accroissement de la taille du soma des neurones GABAergiques et une augmentation de la quantité de neurones exprimant le neuropeptide Y (Marty et al., 1996). L'augmentation de la taille du soma des neurones est un signe caractéristique de leur maturation. L'accélération de la maturation et de la différenciation des interneurones par le muscimol est abolie lorsqu'il est appliqué sur des neurones issus de souris délétées pour le gène codant pour le BDNF (Marty et al., 1996). La stimulation des récepteurs GABA-A des neurones immatures entraine donc l'activation de la transcription du BDNF qui, une fois synthétisé, favorise la maturation des interneurones (Berninger et al., 1995; Marty et al., 1996). Après le *GABA shift*, l'application de muscimol inhibe la transcription du BDNF et provoque une diminution progressive de la taille du soma et du nombre de dendrites primaires des neurones GABAergiques (Berninger et al., 1995; Marty et al., 1996). Le muscimol diminue aussi le nombre de neurones exprimant le neuropeptide Y (Marty et al., 1996). Ainsi, une fois le GABA devenu hyperpolarisant, il inhibe la transcription du BDNF ainsi que la maturation des interneurones. Ce changement d'effet du GABA permet potentiellement d'arrêter le processus de maturation neuronale une fois que les neurones ont atteint un certain niveau de maturité, et de mettre fin à la production de certains types de neuronaux une fois qu'ils ont été produits en quantité suffisante.

L'ensemble de ces résultats démontrent que le *GABA shift*, joue un rôle essentiel dans la coordination de nombreux phénomènes neurodéveloppementaux. La signalisation GABAergique dépolarisante permet l'initiation et le maintien de différents processus tels que la migration et la maturation des neurones tandis que la signalisation GABAergique hyperpolarisante représente un signal d'arrêt de ces mêmes processus une fois qu'ils ne sont plus nécessaires.

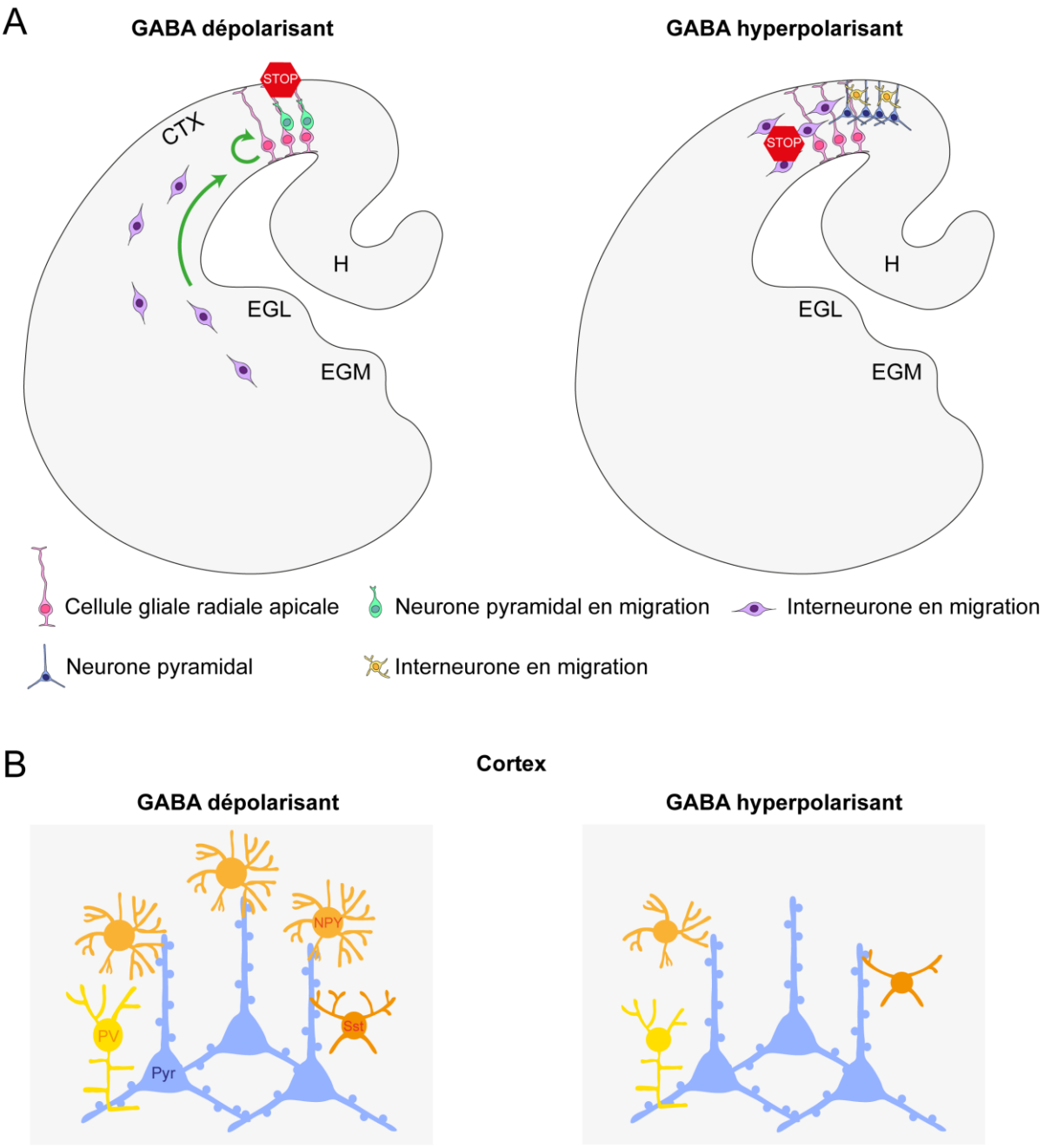


Figure 12. Effet différentiel du GABA pendant le neurodéveloppement.

A, Comparaison de l'effet dépolarisant et hyperpolarisant de la signalisation GABAergique sur la prolifération et la migration des neurones corticaux. **B**, Comparaison de l'effet dépolarisant et hyperpolarisant du GABA sur la maturation des interneurones corticaux. NPY : interneurones à neuropeptide Y, PV : interneurone à parvalbumine, Pyr : neurone pyramidal, Sst : interneurone à somatostatine.

1.3. Rôle du GABA dépolarisant dans la mise en place des réseaux neuronaux

a. Activation précoce des récepteurs NMDA et mise en place des synapses excitatrices

Comme nous l'avons vu dans la partie II.1.1, lors de la période périnatale, les neurones ont majoritairement des synapses silencieuses, caractérisées par la présence de récepteurs NMDA fonctionnels et l'absence de récepteurs AMPA pouvant être activés (Isaac et al., 1995). L'activation des récepteurs NMDA est un mécanisme qui requiert la liaison du glutamate et de son co-agoniste, la glycine, au récepteur ainsi que la dépolarisation du potentiel de membrane, qui est nécessaire pour déloger les ions magnésium qui bloquent le pore de son canal (Traynelis et al., 2010). Il a été démontré que l'activation des canaux calciques voltage-dépendants à la suite de la transmission GABAergique dépolarisante est responsable de l'activation des récepteurs NMDA lors de la période périnatale, tandis que la majorité des synapses sont silencieuses (Leinekugel et al., 1997; D. D. Wang & Kriegstein, 2008). En effet, l'application de l'agoniste des récepteurs GABA-A, l'isoguvacine, sur des tranches d'hippocampe à P2-5 entraine une diminution de l'affinité du magnésium pour les récepteurs NMDA et une augmentation du flux de calcium au travers de ces récepteurs (Leinekugel et al., 1997). De plus, l'électroporation *in utero* d'une construction codant pour un ARN interférent contre NKCC1 à E15 entraine une hyperpolarisation de E_{GABA} et diminue la fréquence des courant post-synaptiques excitateurs entre la deuxième et la quatrième semaine après la naissance (D. D. Wang & Kriegstein, 2008). Cet effet est aboli si une sous-unité GluN2A mutée, dont l'activation ne dépend pas ou peu de la dépolarisation du potentiel de membrane, est coexprimée avec l'ARN interférent contre NKCC1 (D. D. Wang & Kriegstein, 2008). Par ailleurs, l'absence de réponse dépolarisante au GABA lors de la période périnatale entraine une diminution de la densité et de la maturation des épines dendritiques (Cancedda et al., 2007; D. D. Wang & Kriegstein, 2008). A l'inverse, l'application prolongée et focale de GABA sur des dendrites de neurones immatures appartenant à des tranches organotypiques est suffisante pour provoquer la formation d'épines dendritiques (Oh et al., 2016).

Cela démontre que l'effet dépolarisant du GABA est essentiel pour permettre une activation initiale des récepteurs NMDA dans les synapses silencieuses ainsi que pour la mise en place des épines dendritiques. L'action du GABA dépolarisant sur les synapses glutamatergiques semble s'étendre sur plusieurs semaines après la naissance, nous pouvons donc supposer qu'elle met en jeu les récepteurs GABA-A extra-synaptiques et synaptiques. Réciproquement, l'activation des récepteurs NMDA lors du développement est essentielle pour la maturation des synapses GABAergiques (Warm et al., 2022). Il y a donc une régulation croisée de la

maturation des synapses excitatrices et inhibitrices lors du développement, médiée par une boucle de régulation entre les récepteurs GABA-A et NMDA.

b. Formation et plasticité des synapses GABAergiques

L'effet dépolarisant du GABA dans les neurones immatures joue un rôle fondamental dans la mise en place de la signalisation GABAergique inhibitrice. D'une part, l'application prolongée et focale de GABA sur des dendrites de neurones immatures, en plus d'induire la formation d'épines dendritiques, entraine l'apparition d'agrégats de géphyrine avec une probabilité proche de 50% (Oh et al., 2016). La géphyrine est la protéine d'échafaudage post-synaptique principale des synapses inhibitrices, son agrégation est nécessaire afin de permettre leur formation ainsi que leur maturation (Choii & Ko, 2015). Ainsi, la réception de GABA au niveau des dendrites semble suffisante pour amorcer la formation de synapses inhibitrices.

D'autre part, la perte d'expression de NKCC1 dans les neurones pyramidaux du néocortex de souris entraine une hyperpolarisation précoce de E_{GABA} qui est responsable de l'abolition des courants post-synaptiques inhibiteurs spontanés (CPSIs) lors de la première semaine après la naissance et d'une diminution de leur fréquence lors de la deuxième semaine postnatale (D. D. Wang & Kriegstein, 2008). Il n'y a néanmoins plus de différences entre les CPSIs des souris WT et des animaux délétées pour NKCC1 après la deuxième semaine de vie (D. D. Wang & Kriegstein, 2008). L'effet dépolarisant du GABA semble donc important mais pas indispensable pour l'acquisition et le raffinement de la fonctionnalité des synapses GABAergiques. Lors des deux premières semaines après la naissance chez le rat, il existe une plasticité transitoire de la transmission GABAergique qui dépend de l'effet dépolarisant du GABA et qui permet la maturation des synapses inhibitrices (Gubellini et al., 2001). Cette plasticité synaptique induite par le GABA dépolarisant peut prendre deux formes opposées selon le contexte : la potentialisation à long terme (PLT) lors de laquelle il y a une augmentation de l'efficacité de la transmission GABAergique, et la dépression à long terme (DLT) lors de laquelle il y a une diminution de l'efficacité de cette transmission (Caillard, Ben-Ari, et al., 1999 a; Caillard, Ben-Ari, et al., 1999 b).

La dépolarisation répétée de neurones pyramidaux de rat à P3-6 entraine une augmentation de l'amplitude et de la pente des courants post-synaptiques générés par l'activation des récepteurs GABA-A, qui sont des phénomènes caractéristiques d'une PLT (Caillard, Ben-Ari, et al., 1999 a). Cet effet est aboli lorsque les canaux calciques voltage-dépendants sont bloqués par l'application de nickel et semble provenir d'une augmentation de la probabilité de libération du GABA par les vésicules pré-synaptiques (Caillard, Ben-Ari, et al., 1999 a). Par

ailleurs, l'application prolongée de GABA sur des neurones hypothalamiques immatures de cinq jours en culture provoque une augmentation de $[Ca2^{+}]_i$ qui entraine l'activation de la voie MAPK (Obrietan et al., 2002). Cette voie phosphoryle et active le facteur de transcription CREB, ce qui entraine une augmentation de l'expression du BDNF et provoque un accroissement durable de la fréquence des courants post-synaptiques spontanés au travers des récepteurs GABA-A (Obrietan et al., 2002). Les résultats de ces deux études suggèrent que l'effet dépolarisant du GABA renforce structurellement et fonctionnellement les synapses GABAergiques selon des mécanismes reposant sur l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium et l'activation de voies de signalisations permettant des modifications synaptiques moléculaires. Il est intéressant de noter qu'à des stades de maturation plus tardifs (DIV13-15) lors desquels la majorité des synapses sont déjà formées et la réponse dépolarisante au GABA est clairement inhibitrice, l'activation de la voie MAPK par la dépolarisation provoque une diminution de l'amplitude des CPSIs et une augmentation de l'activité GABAergique tonique extra-synaptique (Brady et al., 2018). Cela est dû à une diminution de l'expression synaptique de la sous-unité γ2 du récepteur GABA-A et une perte de l'agrégation de la géphyrine (Brady et al., 2018). Ainsi, une fois les synapses inhibitrices établies, le GABA dépolarisant change d'effet et favorise le démantèlement des synapses. Ce phénomène permet probablement de contrôler la quantité de synapses synthétisées lors du développement.

La stimulation tétanique simultanée des fibres GABAergiques et glutamatergiques projetant sur les neurones pyramidaux de CA3 à P2-4 chez le rat provoque une diminution de l'amplitude et de la pente des courants générés par l'activation des récepteurs GABA-A, un phénomène caractéristique de la DLT (Caillard, Ben-Ari, et al., 1999 b). Cet effet requiert le couplage de la dépolarisation du potentiel de membrane des neurones en réponse au GABA avec l'activation des récepteurs NMDA (Caillard, Ben-Ari, et al., 1999 b). Ces deux phénomènes provoquent une diminution de la quantité de vésicules GABAergiques relâchées par les neurones présynaptiques (Caillard, Ben-Ari, et al., 1999 b). L'activation de la voie MAPK étant associée à une diminution de l'efficacité des synapses GABAergiques chez des neurones relativement matures (Brady et al., 2018), nous pouvons supposer qu'elle est aussi mise en jeu dans ce processus de DLT.

Ainsi, les récepteurs GABA-A auto-régulent la plasticité des synapses dans lesquelles ils sont impliqués via l'activation des canaux calciques voltage-dépendants. Lorsque leur activation n'est pas couplée à celle des récepteurs NMDA, elle est responsable de la potentialisation des synapses GABAergiques tandis que lorsqu'elle est couplée à celle des récepteurs NMDA, elle entraine la dépression de ces mêmes synapses (Caillard, Ben-Ari, et al., 1999 b; Caillard, Ben-

Ari, et al., 1999 a; Gubellini et al., 2001). Il est important de noter que les récepteurs NMDA sont exprimés au niveau des synapses glutamatergiques et GABAergiques lors du développement et chez l'adulte (Cserép et al., 2012; Szabadits et al., 2011). Néanmoins, l'enrichissement de ces récepteurs dans les synapses glutamatergiques par rapport aux synapses GABAergiques est d'un facteur 1.6 lors de la première semaine après la naissance chez la souris et de 5 chez l'adulte (Cserép et al., 2012; Szabadits et al., 2011). Il y a donc une diminution de l'enrichissement relatif des récepteurs NMDA au niveau des synapses GABAergiques lors du développement. Nous pouvons ainsi supposer que l'activation des récepteurs GABA-A lors de la période périnatale renforce les synapses où ils ne sont pas coexprimés avec les récepteurs NMDA et favorise l'élimination des synapses mixtes GABA-A/NMDA.

Pendant plusieurs années, il y a eu une controverse quant à l'effet du GABA dépolarisant sur l'initiation du *GABA shift*. Plusieurs études initiales ont proposé que la transmission GABAergique dépolarisante serait nécessaire pour l'augmentation de l'expression de KCC2 et la mise en place d'une réponse hyperpolarisante au GABA au cours de la maturation neuronale (Ganguly et al., 2001; Leitch et al., 2005). Toutefois, ces résultats ont été contestés et il est aujourd'hui admis que l'augmentation développementale de l'expression de KCC2 et le *GABA shift* ne sont pas causés par la transmission GABAergique dépolarisante lors du développement (Baltz, 2010; Ludwig et al., 2003; Titz et al., 2003).

c. Potentiels géants dépolarisants

Lors de la première semaine après la naissance chez le rat, les neurones de l'hippocampe présentent une activité spécifique observée *ex vivo* et caractérisée par une large dépolarisation de leur potentiel de membrane couplée à des potentiels d'action rapides (Ben-Ari, 2002; Ben-Ari et al., 1989). Ces potentiels géants dépolarisants (PGDs) sont caractérisés par une dépolarisation allant de 15 à 50 mV selon les conditions expérimentales, qui dure 300-500 ms et dont la fréquence est comprise entre 0.005 et 0.2 Hz (Ben-Ari et al., 1989). Ils sont suivis d'une hyperpolarisation du potentiel de membrane des neurones (Ben-Ari, 2002; Ben-Ari et al., 1989). Ces potentiels sont synchronisés entre les neurones et représentent la première activité synchronisée des réseaux hippocampiques observable *ex vivo* lors du développement (Ben-Ari, 2002; Ben-Ari et al., 1989). Des potentiels relativement similaires sont présents dans diverses régions du système nerveux immature (Ben-Ari, 2002).

Cette activité n'est plus détectée dans des tranches d'hippocampe de rat après la seconde semaine post-natale (Ben-Ari, 2002; Ben-Ari et al., 1989). Elle est donc fortement corrélée

avec la réponse dépolarisante des neurones au GABA. L'incubation de tranches d'hippocampe avec de la bicuculline ou avec un antagoniste des récepteurs NMDA abolit ou diminue fortement la quantité de potentiel géants dépolarisants générés, démontrant que les PGDs sont dus à l'activation des récepteurs GABA-A et NMDA (Ben-Ari et al., 1989). Il a été observé que ce phénomène électrophysiologique est couplé à des transitoires calciques causés par l'activation des canaux calciques voltage-dépendants (Leinekugel et al., 1997). Ces canaux sont activés à la suite de l'activation des récepteurs GABA-A et indépendamment de celle des récepteurs NMDA (Leinekugel et al., 1997). De plus, une étude a démontré qu'une lignée murine délétée pour NKCC1 caractérisée par une hyperpolarisation précoce de la réponse au GABA, présente diminution de la quantité et de la synchronisation des transitoires calciques ainsi que de la fréquence et de l'amplitude des potentiels géants dépolarisants (Pfeffer et al., 2009; mais voir résultats opposés dans Sipilä et al., 2009). Ces résultats suggèrent que les PGDs sont initiés par l'activation des récepteurs GABA-A, qui engendre l'activation des récepteurs NMDA selon le processus que nous avons détaillé dans les paragraphes précédents. Par ailleurs, l'application de l'antagoniste des récepteurs AMPA (CNQX) sur des tranches d'hippocampe immature est suffisante pour abolir les potentiels géants dépolarisants (Bolea et al., 1999; Khalilov et al., 2015). Cette activité repose donc aussi sur l'activation des récepteurs AMPA. Le modèle actuel proposé pour expliquer l'implication de ces différents récepteurs sur les potentiels géants dépolarisants est le suivant. Les PGDs sont initiés par une dépolarisation initiale engendrée par l'activation des récepteurs GABA-A. Cette dépolarisation entraine ensuite l'activation des récepteurs NMDA et AMPA. Lorsque la dépolarisation atteint son amplitude maximale, l'augmentation du potentiel de membrane au-delà du potentiel d'inversion des courants GABA-A entraine un *GABA shift* transitoire et provoque une hyperpolarisation du potentiel de membrane en réponse à l'activation des récepteurs GABA-A (Khalilov et al., 2015). Les transitoires calciques associés aux potentiels géants dépolarisants augmentent l'efficacité des synapses glutamatergiques et GABAergiques en activant des voies de signalisation similaires à celles activées par l'effet dépolarisant du GABA dans des neurones individuels (Kasyanov et al., 2004; Mohajerani et al., 2007 ; voir paragraphes précédents). Cela permet de remodeler les connexions au sein des réseaux hippocampiques (Griguoli & Cherubini, 2017).

Une activité relativement semblable à celle des potentiels géants dépolarisants a été enregistrée dans l'hippocampe *in vivo* et a été nommée Early Sharp Waves (Leinekugel et al., 2002). Les Early Sharp Waves sont aussi caractérisées par une activité synchronisée de quelques dizaines ou centaines de millisecondes, avec une fréquence de 0.03 à 0.1 hertz (Leinekugel et al., 2002). Il a donc initialement été proposé que les PGDs observés *in vitro* et les Early Sharp Waves correspondaient au même phénomène électrophysiologique

(Leinekugel et al., 2002). Néanmoins, plusieurs études récentes suggèrent l'existence d'importantes différences entre ces deux types d'activités (Juzekaeva et al., 2024; Shipkov et al., 2026). Tandis que les potentiels géants dépolarisants sont initiés uniquement dans CA3, les Early Sharp Waves sont initiées dans CA3 et dans le cortex entorhinal (Juzekaeva et al., 2024). L'activation des récepteurs GABA-A ne semble par ailleurs pas jouer un rôle majeur dans la formation des Early Sharp Waves (Shipkov et al., 2026). Il est donc possible que ces deux types d'activités correspondent à des phénomènes différents et par conséquent, que les potentiels géants dépolarisants tels que nous les avons décrits ici soient une activité qui n'existe pas *in vivo*.

Pour conclure, la variation de l'expression de KCC2b au cours du développement est associée à une évolution de sa fonction ainsi que de celle de la transmission GABAergique. Plusieurs phénomènes neurodéveloppementaux sont régulés ou médiés par la réponse dépolarisante des neurones au GABA, due à la faible expression initiale du transporteur. D'autres processus reposent, à l'inverse, sur la mise en place de l'effet hyperpolarisant du GABA dans les neurones, médié par l'augmentation progressive de l'expression de KCC2b. Toutefois, le rôle fonctionnel de KCC2a dans le cerveau en développement demeure indéterminé. L'étude de la fonction de cette isoforme lors du neurodéveloppement a fait l'objet d'une partie importante du travail expérimental de ma thèse, que je détaillerai par la suite.

2. Rôles de l'interaction entre KCC2 et le cytosquelette dans le développement

2.1. KCC2 est essentiel à la formation des épines dendritiques

Comme nous l'avons détaillé dans la partie I.3.3, KCC2 contrôle la stabilité du cytosquelette d'actine dans les épines dendritiques en régulant la voie β-PIX/Rac1/cofiline (Chevy et al., 2015; H. Li et al., 2007; Llano et al., 2015). Or, la formation de filopodes ainsi que la maturation de ces derniers en des épines dendritiques matures repose sur différents mécanismes impliquant le cytosquelette d'actine (Hotulainen & Hoogenraad, 2010). De même, les changements de forme des épines, qui sont notamment mis en jeu lors de la plasticité synaptique, sont fortement contrôlés par la dynamique de l'actine (Fischer et al., 1998). Tandis que lors d'un processus de dépression synaptique à long terme, l'activation de la cofiline entraine un rétrécissement des épines dendritiques, le blocage de la dépolymérisation de l'actine empêche ce rétrécissement (Cho et al., 2013).

De nombreuses études se sont donc intéressées au rôle de KCC2 dans la formation et dans l'acquisition de la morphologie des épines dendritiques (Awad et al., 2018; Fiumelli et al., 2013; H. Li et al., 2007; Llano et al., 2015). Il a été observé que la délétion de KCC2 dans des neurones en culture entraine une forte altération de la labilité de l'actine localisée dans les épines (Llano et al., 2015). Cela provoque aussi une diminution de la densité de ces dernières qui est associée à une réduction de la quantité de synapses glutamatergiques et à une diminution de la fréquence des courants post-synaptiques excitateurs (Kesaf et al., 2020; H. Li et al., 2007; Llano et al., 2015). A l'inverse, une surexpression de KCC2 *in vivo* par de l'électroporation *in utero* entraine une augmentation de la densité des épines et de la transmission glutamatergique dans le néocortex (Awad et al., 2018; Fiumelli et al., 2013). L'expression du transporteur est donc nécessaire à la formation des épines dendritiques ainsi que pour réguler la mise en place de ce processus dans le temps. La transfection de neurones avec une protéine β-PIX mutée inactive (β-PIX S516A) provoque une diminution de la densité des épines dendritiques et des synapses excitatrices à un niveau similaire à celui obtenu par la perte de KCC2 (Llano et al., 2015). La co-expression de β-PIX S516A et de l'ARN interférent contre KCC2 ne modifie pas la densité des synapses par rapport aux neurones n'ayant subi qu'une perte d'expression du transporteur (Llano et al., 2015). Cela démontre que KCC2 régule la formation des épines dendritiques en modulant la voie β-PIX/Rac1/cofiline.

De plus, la perte d'expression de KCC2 diminue de 25% la motilité protrusive des épines dendritiques (Llano et al., 2015). La motilité protrusive est un phénomène consistant en l'élongation et la rétractation des épines, ce qui est essentiel pour la synaptogénèse. L'altération de l'expression du transporteur entraine aussi une modification de la morphologie des épines dendritiques. La perte d'expression de KCC2 dans des neurones en culture est associée à une augmentation de la longueur des épines, formant notamment des structures immatures de type filopode (Li et al., 2007). Cela entraine additionnellement l'augmentation de la quantité d'un autre type de longues épines qui, contrairement aux filopodes, présentent une tête (Li et al., 2007; Llano et al., 2015). Ainsi, KCC2 ne participe pas uniquement à la formation des épines mais assure aussi le maintien de leur morphologie.

Une étude basée sur la surexpression précoce de KCC2 par de l'électroporation *in utero* suggère que la protéine régulerait la formation et la morphologie des épines dendritiques différentiellement selon la structure du cerveau considérée (Awad et al., 2018). L'article rapporte ainsi que la surexpression de KCC2 provoque une diminution de la densité des épines dans l'hippocampe tandis qu'elle est à l'origine d'une augmentation de leur longueur et de leur densité dans le néocortex (Awad et al., 2018). Cet effet est corrélé avec une plus forte expression du BDNF dans l'hippocampe que dans le néocortex (Awad et al., 2018). Tandis

qu'en absence de traitement au BDNF, les neurones corticaux surexprimant KCC2 présentent une densité d'épines plus élevée que les neurones contrôles, cet effet est aboli si les cellules sont traitées avec du BDNF (Awad et al., 2018). Ainsi, le modèle proposé est que la forte diffusion de BDNF dans l'hippocampe augmente l'expression membranaire de KCC2 et favorise sa fonction de transporteur, au détriment de son rôle non-canonique. Il est aussi suggéré que la régulation de la formation des épines dans l'hippocampe dépendrait de la fonction de transporteur de KCC2 (Awad et al., 2018). Bien que cette étude présente des résultats intéressants, elle est intégralement basée sur la surexpression du transporteur et est donc peu informative quant à la fonction physiologique de la protéine. Par ailleurs, elle apporte peu d'éléments impliquant la fonction de transporteur de KCC2 dans la formation des épines dans l'hippocampe.

Enfin, il a été observé *in vivo* que la perte d'expression de la sous-unité GluK2 du récepteur kaïnate est à l'origine d'un phénotype similaire à celui de la perte d'expression de KCC2, incluant une augmentation de la longueur des épines dendritiques ainsi qu'une diminution de la signalisation synaptique glutamatergique (Kesaf et al., 2020). GluK2 étant un partenaire protéique impliqué dans l'expression membranaire de KCC2 (Kesaf et al., 2020; Mahadevan et al., 2014), cela suggère que cette sous-unité pourrait agir en amont du transporteur dans la régulation de la formation des épines dendritiques. La perte d'expression de GluK2 induit une diminution de l'expression de 4.1N et de la cofiline dans les neurones (Kesaf et al., 2020). Par ailleurs, la surexpression de KCC2 est suffisante pour restaurer une quantité physiologique d'épines dendritiques à la suite de la perte de GluK2 (Kesaf et al., 2020). L'ensemble de ces résultats suggèrent que GluK2 agit effectivement en amont de KCC2 dans la régulation de la formation des épines dendritiques. Il a précédemment été proposé que GluK2, KCC2 et 4.1N formeraient un complexe protéique (Mahadevan et al., 2014). Nous pouvons donc supposer que GluK2 favorise l'interaction de KCC2 avec 4.1N et par conséquent, favorise la formation d'un complexe protéique permettant au transporteur de réguler la polymérisation de l'actine par le biais de la voie β-PIX/Rac1/cofiline.

2.2. KCC2 régule l'apoptose développementale des neurones de projection du néocortex

a. Vagues d'apoptose neurodéveloppementales

Lors de son développement, le système nerveux produit de nombreux neurones surnuméraires qui sont physiologiquement éliminés lors de deux vagues d'apoptose successives, dont nous allons détailler les caractéristiques chez la souris (Wong & Marín,

2019). La première vague apoptotique a lieu lors du développement embryonnaire et affecte majoritairement les progéniteurs neuronaux ainsi que les neurones immatures nouvellement formés (Blaschke et al., 1998; Wong & Marín, 2019). Elle débute dès E10.5 dans le pallium, atteint son maximum à E14.5 dans le néocortex et est particulièrement importante pour l'organisation corticale (Wong & Marín, 2019). La quantité de cellules éliminées lors de cette vague reste très débattue et dépend de la région étudiée, elle est estimée à 20-70% (Thomaidou et al., 1997; Wong & Marín, 2019). De même, la voie apoptotique empruntée semble dépendre de la structure cérébrale (White et al., 1998; Wong & Marín, 2019).

La seconde vague apoptotique a lieu entre la première et la deuxième semaine après la naissance chez la souris et permet le raffinement des connexions entre les neurones au moment où les réseaux neuronaux commencent à s'établir (Wong & Marín, 2019). Lors de cette vague, 13% des neurones pyramidaux sont éliminés entre P2 et P5 dans le néocortex tandis que 30% des interneurones corticaux meurent entre P5 et P10 (Wong & Marín, 2019). Dans les deux cas, il s'agit majoritairement d'une forme d'apoptose intrinsèque impliquant la voie Bax/Bcl-2 (Bcl-2–associated X protein/B-cell lymphoma 2) et régulée par l'activité neuronale (Wong & Marín, 2019). En effet, l'activité neuronale est un élément déterminant dans la survie des neurones lors de la seconde vague d'apoptose. Le néocortex somatosensoriel présente une activité spontanée relativement plus élevée que le néocortex moteur lors du développement post-natal, ce qui est corrélé à une quantité de neurones apoptotiques plus faible (Blanquie et al., 2017). De plus, l'incubation de tranches de cortex avec un inhibiteur des récepteurs GABA-A augmente l'activité neuronale et diminue le nombre de neurones apoptotiques (Blanquie et al., 2017). A l'inverse, l'incubation de cultures de neurones ou de tranches de cortex avec un agoniste des récepteurs GABA ou avec de la tétrodotoxine (bloqueur des canaux sodiques voltage-dépendants qui inhibe l'activité spontanée) diminue la viabilité des neurones (Blanquie et al., 2016; Honegger et al., 1998). L'ensemble de ces éléments démontrent que l'activité électrique favorise la survie des neurones corticaux lors de la période post-natale tandis que leur inactivité entraine leur élimination. Bien que le mécanisme sous-jacent n'ait pas encore été élucidé, il semblerait que l'activité neuronale régule l'activation des protéines pro/anti-apoptotiques Bax/Bcl-2, mises en jeu dans l'apoptose intrinsèque. Le blocage de l'activité spontanée provoque en effet une augmentation de l'expression transcriptionnelle du facteur pro-apoptotique Bax tandis que l'augmentation de l'activité neuronale entraine un accroissement de l'expression protéique du facteur anti-apoptotique Bcl-2 (Schroer et al., 2023).

Les cellules expriment des facteurs pro- et anti-apoptotiques dans des quantités variables selon le type cellulaire et le stade de développement considéré (Singh et al., 2019). Le ratio

entre la quantité de facteurs pro- et anti-apoptotiques exprimés par une cellule détermine la susceptibilité de cette dernière à entrer en apoptose par la voie intrinsèque en réponse à un stimulus pro-apoptotique (Singh et al., 2019). En conditions physiologiques, les protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-X_L, etc.) séquestrent la protéine pro-apoptotique Bax dans le cytosol et l'empêchent de déclencher l'apoptose (Singh et al., 2019). La voie intrinsèque est activée par différents stimuli internes à la cellule : endommagement de son ADN ou de ses organites, dysfonctionnement lors du cycle cellulaire, etc. (Singh et al., 2019). Cela entraine l'activation des protéines pro-apoptotiques (BIM, BAD, BID, etc.) qui inhibent les facteurs anti-apoptotiques, et dont certaines activent additionnellement Bax et Bak (Bcl-2–antagonist/killer 1) (Singh et al., 2019). L'activation de Bax provoque son changement de conformation, ce qui lui permet de se lier à la membrane externe de la mitochondrie et de former des dimères (Singh et al., 2019). Bax et Bak interagissent et forment des pores dans la membrane mitochondriale, entrainant la libération de cytochrome C et de la protéine Smac/DIABLO (Fulda & Debatin, 2006; Singh et al., 2019). Smac/DIABLO inhibe alors les protéines inhibitrices de l'apoptose (Inhibitor of Apoptosis Proteins, IAPs) tandis que le cytochrome C s'associe avec la protéine Apaf-1 et forme l'apoptosome (Fulda & Debatin, 2006; Singh et al., 2019). L'apoptosome recrute et active la caspase-9, résultant en l'activation de la voie des caspases (Fulda & Debatin, 2006; Singh et al., 2019).

b. KCC2 inhibe l'apoptose des neurones corticaux de projection

La fonction de transporteur de chlorure de KCC2 contribue à protéger les neurones matures de l'apoptose en conditions physiologiques ainsi que lors de chocs excito-toxiques (voir partie I.3.2). Or, KCC2 contribue aussi à réguler la vague apoptotique embryonnaire chez une sous-population de neurones corticaux. Ce phénomène a été découvert par l'équipe de K. Kaila, grâce à une méthode permettant de contrôler la délétion de KCC2 dans le temps et dans un type neuronal spécifique (Mavrovic et al., 2020). Pour cela, les auteurs ont utilisé de l'électroporation *in utero* afin d'exprimer la Cre-recombinase dans les neurones d'embryons d'une lignée de souris dont l'exon 5 du gène *Slc12a5* est floxé (Mavrovic et al., 2020). Cela permet une ablation génétique efficace de KCC2 (Mavrovic et al., 2020). Cette méthode, appliquée lors de la première vague apoptotique, permet d'analyser l'effet de la perte d'expression de KCC2 dans les neurones de projection des strates II-IV du néocortex (Mavrovic et al., 2020). L'abolition de l'expression de KCC2 entraine une augmentation de l'apoptose des futurs neurones des strates II et III du néocortex à E18.5, tandis qu'ils sont encore en train de migrer (Mavrovic et al., 2020). La perte de ces neurones est abolie lorsqu'ils sont additionnellement électroporés avec une construction codant pour une protéine KCC2 WT, KCC2-ΔNTD ou KCC2-CTD (peptide uniquement constitué du domaine C-terminal de la protéine) (Mavrovic et al., 2020). Les protéines KCC2-ΔNTD et KCC2-CTD n'ont pas la

capacité de transporter le chlorure, par conséquent KCC2 protège les neurones corticaux des strates II et III de la mort cellulaire selon un processus qui ne dépend pas de sa fonction canonique.

La surexpression d'une forme déphosphomimétique constitutivement activée de la cofiline (cofiline S3A) est suffisante pour abolir l'apoptose des neurones entrainée par la perte de KCC2 (Mavrovic et al., 2020). Cela peut paraître surprenant car la déphosphorylation de la cofiline a précédemment été associée à la voie intrinsèque de l'apoptose (Chua et al., 2003; G. Li et al., 2013). La cofiline déphosphorylée se lie en effet aux monomères d'actine et interagit avec la mitochondrie (probablement en se liant à sa membrane externe) entrainant la libération de cytochrome C et l'activation de la voie des caspases (Chua et al., 2003; G. Li et al., 2013; Rehklau et al., 2012). Par ailleurs, l'expression du mutant phosphomimétique de la cofiline (cofiline S3D) dans des cellules HL60 traitées à la staurosporine (un facteur déclencheur de l'apoptose) est suffisante pour inhiber l'apoptose de ces cellules (Chua et al., 2003). La discordance entre ces résultats peut s'expliquer de deux façons. Il existe potentiellement une régulation différente de l'apoptose par la cofiline en fonction des conditions expérimentales (type cellulaire, méthode d'activation de la cofiline, etc.). Alternativement, la capacité de la cofiline à déclencher l'apoptose pourrait dépendre de sa conversion dynamique en un état actif, et non de son activité en tant que telle. Dans ce cas, ce serait l'impossibilité de convertir la cofiline S3A dans un état actif, car elle est déjà constitutivement activée, qui inhiberait l'apoptose dans l'étude de Mavrovic *et al* (Mavrovic et al., 2020). Dans les deux cas, nous pouvons supposer que KCC2 protège les neurones corticaux de projection de l'apoptose en séquestrant β-PIX et inhibant ainsi la cascade de kinases initiée par Rac1. Cela résulte probablement en l'activation de la cofiline, ce qui empêche sa translocation dans les mitochondries et inhibe l'apoptose (voir partie I.3.3). Une suppression plus tardive de KCC2 dans des neurones immatures en culture n'affecte pas la survie des neurones corticaux (Kontou et al., 2021). Cela démontre que KCC2 régule l'apoptose d'une population neuronale précise, spécifiquement lors de la première vague apoptotique neurodéveloppementale, ce qui dépend potentiellement de son niveau d'expression dans ces neurones.

3. Une exception notoire à l'augmentation développementale de l'expression de KCC2 : le cas des neurones Cajal-Retzius

3.1. Fonction des neurones Cajal-Retzius lors du développement

Les neurones Cajal-Retzius (CRs) constituent un type neuronal localisé dans la couche la plus superficielle du néocortex (L1) ainsi qu'autour de la fissure hippocampique, dans le *stratum*

lacunosum-moleculare de la corne d'Ammon et le *stratum moleculare* externe du feuillet supra- et infrapyramidal du gyrus denté, du cerveau post-natal (Causeret et al., 2021; Del Río et al., 1995; Figure 13).

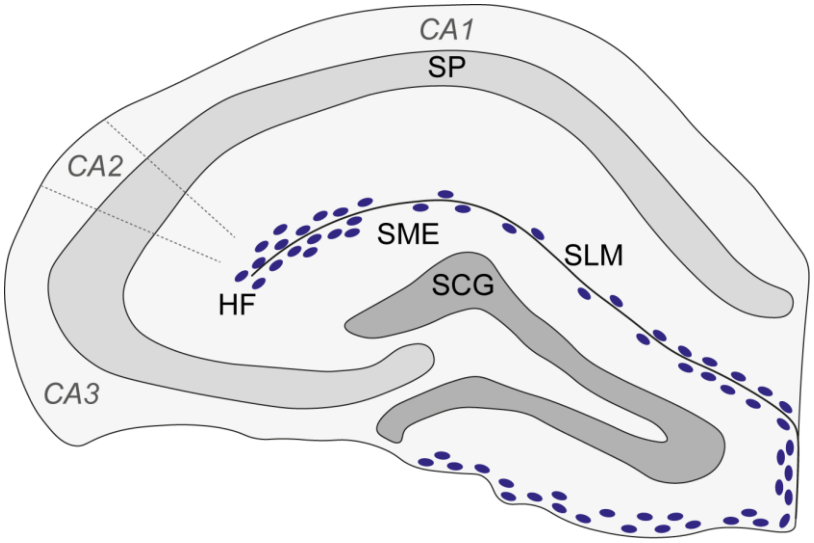


Figure 13. Localisation des neurones Cajal-Retzius dans la formation hippocampique de souris adulte.

Les cellules Cajal-Retzius sont représentées en bleu. Les couches SP et SLM font partie de l'hippocampe propre tandis que les couches SME et SCG font partie du gyrus denté. CA : Corne d'Ammon, SP : strate pyramidale, SLM : strate lacuneuse moléculaire, FH : fissure hippocampique, SME : strate moléculaire externe, SCG : strate des cellules en grain.

Les CRs sont des neurones glutamatergiques caractérisés par un petit soma allongé et par une morphologie bipolaire due à la présence d'une unique dendrite primaire localisée de façon opposée à leur axone (Causeret et al., 2021; Radnikow et al., 2002). Ces neurones produisent et sécrètent de la reeline, une glycoprotéine essentielle pour la mise en place de nombreuses structures du SNC lors du développement dont le néocortex, l'hippocampe et le cervelet (Causeret et al., 2021). La reeline régule aussi la formation des dendrites des neurones pyramidaux du néocortex (Causeret et al., 2021). La perte de fonction des deux allèles du gène *Reln*, codant pour la reeline, est à l'origine du phénotype *reeler* chez la souris (D'Arcangelo, 2005; D'Arcangelo et al., 1995). Celui-ci est caractérisé par une désorganisation et une inversion de l'ordre des strates du néocortex due à l'incapacité des neurones nouvellement formés à traverser les couches corticales lors de la migration radiaire (D'Arcangelo, 2005 ; voir partie II.1.2). Les animaux *reeler* présentent aussi une désorganisation des neurones pyramidaux de la corne d'Ammon et des cellules en grain du gyrus denté qui sont décondensés et désorientés (D'Arcangelo, 2005). Ce phénotype est associé à des défauts de développement d'autres structures du SNC donc le cervelet, le tronc cérébral et la moelle épinière (D'Arcangelo, 2005). Étonnamment, l'ablation génétique de la

majorité des CRs via l'expression du fragment A de la toxine diphtérique dans ces derniers n'entraine pas d'altération majeure de l'organisation du néocortex et de l'hippocampe à P0 (Tissir et al., 2009). De même, la délétion du gène *Reln* dans les neurones exprimant la calrétinine (qui sont majoritairement des CRs) provoque des problèmes de migration des neurones pyramidaux du néocortex et des cellules en grain du gyrus denté à des niveaux bien plus faibles que ceux observés chez les souris *reeler* (Vílchez-Acosta et al., 2022). La différence de sévérité entre le phénotype des animaux *reeler* et celui des souris où seuls les CRs sont dysfonctionnels est due à la production de reeline par certaines populations d'interneurones du néocortex et de l'hippocampe (Pesold et al., 1998; Vílchez-Acosta et al., 2022).

Comme nous le verrons par la suite, les cellules Cajal-Retzius présentent une neurogénèse précoce et commencent à être observées dans la pré-plaque à partir de E10.5 puis dans la zone marginale à E12.5-13.5, après sa formation (Hevner et al., 2003; Viola et al., 2024). Ces neurones libèrent de la reeline dans la zone marginale, ce qui favorise la migration radiale en modulant l'expression de molécules d'adhésion et en stabilisant le cytosquelette de microtubule des neurones en migration (Chai & Frotscher, 2016). Une fois les neurones arrivés à proximité de la zone marginale, la glycoprotéine empêche son invasion en agissant comme un signal d'arrêt de la migration (Chai & Frotscher, 2016). La reeline contrôle ces différents aspects de la migration neuronale par le biais du mécanisme moléculaire suivant. Une fois libérée dans la matrice extracellulaire, la protéine se lie au récepteur VLDLR (very low density lipoprotein receptor) ou ApoER2 (apolipoprotein-E receptor type 2), ce qui provoque le recrutement de la protéine adaptatrice Dab1 à la membrane plasmique (Chai & Frotscher, 2016; D'Arcangelo et al., 1999). Dab1 est phosphorylée par les kinases SFKs et active plusieurs voies de signalisation mises en jeu dans la régulation de la migration neuronale (Chai & Frotscher, 2016; D'Arcangelo et al., 1999). Il est aujourd'hui supposé que le changement d'effet de la reeline au fur et à mesure de la migration des neurones pyramidaux, et notamment à l'approche de la zone marginale, repose sur une expression différentielle des récepteurs VLDLR et ApoER2 par les neurones (Chai & Frotscher, 2016; Hirota et al., 2015).

3.2. Origine et lignage des neurones Cajal-Retzius

Les cellules Cajal-Retzius sont parmi les premiers neurones à se différencier lors du développement. Des expériences basées sur l'injection de femelles gestantes avec de la thymidine tritiée ou de la BrdU à différents stades de gestation ont permis de dater la dernière division des progéniteurs de CRs avant leur différenciation. Ces expériences ont démontré

que la large majorité des neurones Cajal-Retzius murins se différencient entre E10.5 et E11.5 (Hevner et al., 2003) tandis qu'ils sont formés entre E11 et E15 chez le rat (Raedler & Raedler, 1978). L'utilisation d'une technique de traçage génétique sur ces mêmes neurones confirme qu'ils se différencient à partir de E10.5 et que leur neurogénèse s'étend jusqu'à au moins E13.5 chez la souris (X. Gu et al., 2011). Les CRs sont aussi les premiers neurones à migrer et à peupler la pré-plaque. Des cellules exprimant la reeline sont en effet détectées dans cette structure dès E10.5 et leur quantité augmente jusqu'à E12.5 (Hevner et al., 2003). Il ne peut ici pas s'agir d'interneurones positifs pour la reeline car, comme nous l'avons vu précédemment, la migration des interneurones débute environ à E12.5 (Myers et al., 2014).

Les cellules Cajal-Retzius ne constituent pas un groupe homogène de neurones et peuvent être subdivisées en quatre sous-populations selon leur origine dans le cerveau embryonnaire (Causeret et al., 2021). Ces lignages de CRs sont formés dans diverses régions palliales (ou adjacentes au pallium) et expriment différents marqueurs cellulaires (Causeret et al., 2021; tableau 3). Ainsi, nous pouvons distinguer les neurones Cajal-Retzius issus de l'hème cortical, du septum, de l'éminence thalamique ainsi que du pallium ventral (Causeret et al., 2021; tableau 3).

Lignage	Marqueurs	Localisation post-natale
Hème cortical	ΔNp73, Wnt3a	Pallium caudomédial / dorsal
Septum	ΔNp73, Dbx1	Pallium rostromédial
Eminence thalamique	ΔNp73, Dbx1	Télencéphale caudal / ventral Cortex piriforme prospectif
Pallium ventral	Dbx1	Pallium rostrolatéral

Tableau 3. Différents lignages de neurones Cajal-Retzius.

Adapté à partir de Causeret et al., 2021.

Les CRs issus des différentes structures du cerveau embryonnaire migrent tangentiellement vers le néocortex se répartissent à la surface de ce dernier en fonction de leur lignage (Causeret et al., 2021; tableau 3). L'hème cortical est considéré comme la région dont proviennent la majorité des neurones Cajal-Retzius (Causeret et al., 2021; Ledonne et al., 2016). Les CRs issus de cette structure expriment les marqueurs ΔNp73 et Wnt3a et peuplent majoritairement l'hippocampe dans le cerveau post-natal (X. Gu et al., 2011; Tissir et al., 2009).

Le gène *Trp73* (Gene ID NCBI : 22062) est un paralogue des gènes suppresseurs de tumeur *Trp53* et *Trp63* (Belyi et al., 2010). Il code pour deux isoformes principales formés par l'utilisation de promoteurs et d'exons alternatifs (Ramadan et al., 2005; Tissir et al., 2009). Chacune de ces deux catégories d'isoformes inclut plusieurs sous-isoformes qui se distinguent

par la longueur de leur domaine C-terminal (Ramadan et al., 2005; Tissir et al., 2009). Les protéines TAp73 sont les isoformes les plus longues et sont codées à partir du promoteur localisé en amont du premier exon de *Trp73* (Ramadan et al., 2005). Ce sont des facteurs de transcription favorisant l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose tels que Bax (Ramadan et al., 2005). Les isoformes ΔNp73 sont codées à partir d'un promoteur localisé entre l'exon 3 (spécifique à TAp73) et l'exon 3' (spécifique à ΔNp73) du gène (Ramadan et al., 2005). Elles présentent une délétion du domaine N-terminal de la forme TAp73, qui est la région protéique responsable de l'activation de la transcription des gènes pro-apoptotiques (Ozaki et al., 2010). Les protéines ΔNp73 ont la capacité d'inhiber l'action des TAp73, probablement en s'oligomérisant avec elles ou en se fixant à leur place au promoteur des gènes qu'elles régulent (Ozaki et al., 2010). Une perte d'expression des isoformes ΔNp73 (ci-après rassemblées sous la dénomination ΔNp73) entraine l'apoptose de nombreux neurones corticaux à partir de la deuxième semaine après la naissance (Pozniak et al., 2002). Cela démontre que ΔNp73 joue un rôle majeur dans la survie neuronale (Pozniak et al., 2002).

L'étude de la lignée murine ΔNp73-Cre-IRES-EGFP a permis de mettre en évidence que ΔNp73 est exprimée par 73% des neurones Cajal-Retzius à P0, dont ceux issus de l'hème cortical, du septum et de l'éminence thalamique (Tissir et al., 2009). Cette isoforme est aussi exprimée par les cellules épithéliales des plexus choroïdes ainsi que par quelques autres populations neuronales telles que les neurones à GnRH ou les neurones sensoriels voméronasaux (Causeret et al., 2021; Tissir et al., 2009). ΔNp73 est aussi sporadiquement exprimée par les cellules en grain matures du gyrus denté à partir de la troisième semaine après la naissance chez la souris (van Bruggen et al., 2023). La quantité de cellules en grain qui expriment cette isoforme varie entre les animaux et même entre les hémisphères d'un même animal selon un mécanisme encore inconnu (van Bruggen et al., 2023).

3.3. Mécanismes régulant l'apoptose des neurones Cajal-Retzius

a. Les cellules Cajal-Retzius sont des neurones transitoires

Les neurones Cajal-Retzius sont transitoires : tandis qu'ils sont présents dans le néocortex et l'hippocampe lors du développement, leur population diminue fortement après la naissance par un phénomène de mort cellulaire qui coïncide avec la seconde vague apoptotique développementale (Del Río et al., 1995; Derer & Derer, 1990; Ledonne et al., 2016; Riva et al., 2019; Figure 14). La densité des neurones Cajal-Retzius corticaux qui expriment ΔNp73 diminue drastiquement lors des trois premières semaines après la naissance chez la souris (Ledonne et al., 2016; Riva et al., 2019). En effet, seulement 2% des cellules présentes lors

de la période périnatale survivent jusqu'à P21 (Ledonne et al., 2016). De même, la densité des cellules Cajal-Retzius exprimant Dbx1 diminue fortement lors des trois premières semaines post-natales (Ledonne et al., 2016). 6% des cellules corticales positives pour Dbx1 présentes à P1 sont maintenues à P21 (Ledonne et al., 2016). Une étude portant sur l'ensemble des lignages de neurones Cajal-Retzius a récemment confirmé que la densité de ces cellules diminue d'environ 80 à 90% lors des deux premières semaines après la naissance selon la région néocorticale étudiée et en excluant le cortex entorhinal (Moan et al., 2025). Ainsi, les neurones Cajal-Retzius corticaux subissent une mort cellulaire massive lors de la seconde vague apoptotique développementale. Cela résulte en l'élimination de près de 95% de leur population une fois les souris devenues adultes.

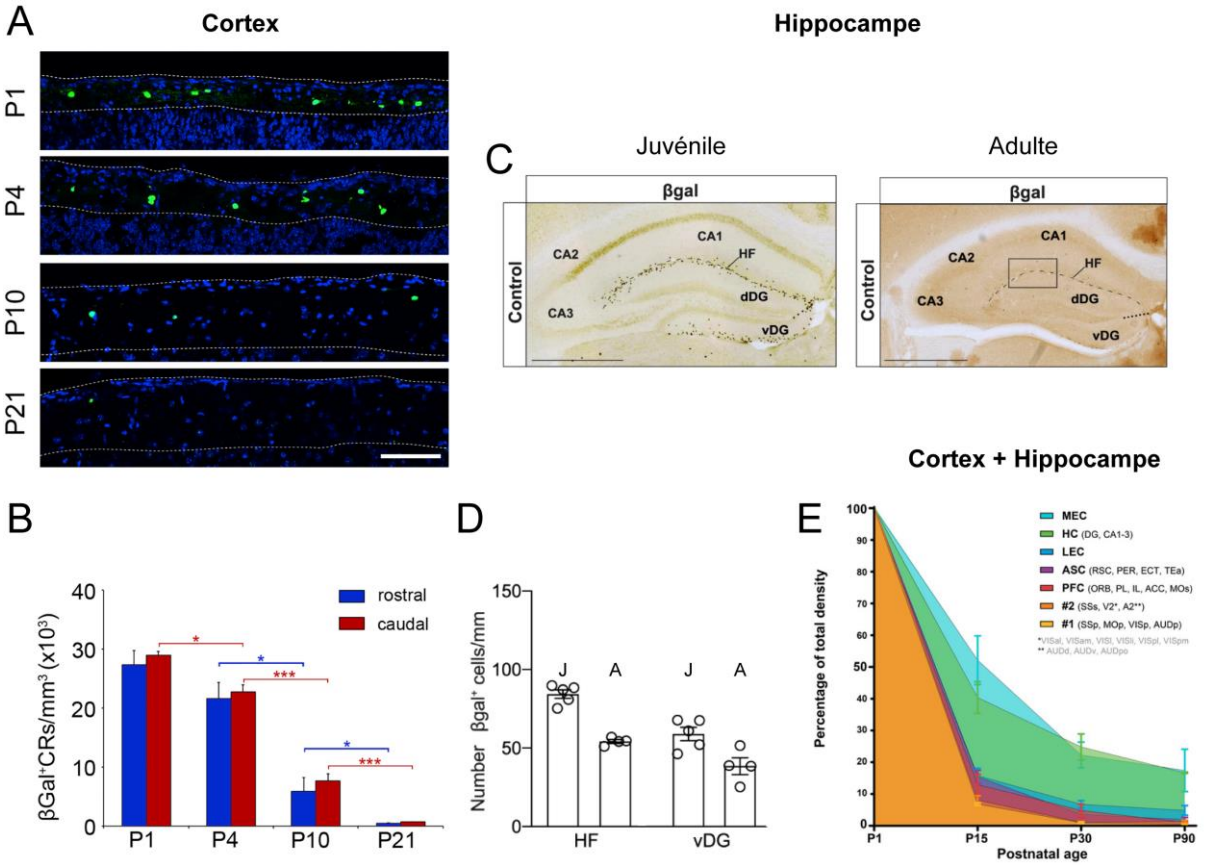


Figure 14. Apoptose développementale des neurones Cajal-Retzius corticaux et hippocampiques.

A, Images représentatives de sections coronales de cortex de souris ΔNp73-Cre x Tau^{nlsLacZ} à différents stades de développement, immuno-marquées pour la β-galactosidase (en vert). Barre d'échelle : 20 µm. **B**, Graphique montrant la densité de cellules positives pour la β-galactosidase (CRs exprimant ΔNp73) par unité de volume de néocortex en fonction du stade développemental et du type de néocortex étudié. **C**, Images représentatives de sections coronales d'hippocampes de souris ΔNp73-Cre x Tau^{nlsLacZ} à différents stades de développement, marquées pour la β-galactosidase (en noir). Barre d'échelle : 500µm. **D**, Graphique (modifié à partir de Riva et al., 2023) montrant la densité des cellules

positives pour la β-galactosidase en fonction du stade développemental (J : P24, A : adulte) et de la région hippocampique étudiée. **E**, Graphique montrant l'évolution de la densité des CRs dans la lignée murine PDE1c-Cre x NDNF-flox-FlpO x Ai65 (exprimant la tdTomato dans les CRs) en fonction de l'âge et de la structure cérébrale étudiée. MEC : cortex entorhinal médian, HC : hippocampe, LEC : cortex entorhinal latéral, ASC : cortex associatif, PFC : cortex préfrontal, #2 : cortex sensoriel secondaire, #1 : cortex sensoriel primaire. Adapté à partir de Ledonne et al., 2016 (A, B), Riva et al., 2023 (C, D), Moan et al., 2025 (E).

Dans l'hippocampe et le cortex entorhinal médian, la mort cellulaire des CRs est légèrement plus modérée et tardive. La densité des cellules Cajal-Retzius hippocampiques diminue de 60% lors des deux premières semaines post-natales puis d'environ 20% supplémentaire entre P15 et P90 (Moan et al., 2025). Ainsi, environ 20% des neurones Cajal-Retzius hippocampiques survivent jusqu'à à l'âge adulte (Moan et al., 2025). Ces cellules Cajal-Retzius présentent une survie variable en fonction de leur localisation au sein de l'hippocampe (Riva et al., 2023). Tandis que les neurones situés dans la couche lacuneuse moléculaire de la corne d'Ammon et dans la strate moléculaire suprapyramidale du gyrus denté subissent une mort cellulaire importante entre P24 et l'âge adulte, une forte proportion des CRs localisés dans la strate moléculaire infra-pyramidale du gyrus denté survit lors de cette période (Riva et al., 2023).

b. L'apoptose des neurones Cajal-Retzius dépend de Bax et de l'activité neuronale

Les facteurs qui influencent la mort des neurones Cajal-Retzius ont été étudiés en utilisant des lignées murines exprimant la Cre-recombinase sous le contrôle du promoteur de différents marqueurs des CRs (Ledonne et al., 2016; Riva et al., 2019, 2023). Ces souris ont été croisées avec d'autres lignées, ce qui a permis l'expression ou la délétion de gènes spécifiques dans les différentes populations de cellules Cajal-Retzius (Ledonne et al., 2016; Riva et al., 2019, 2023). La délétion du gène Bax dans les CRs corticaux qui expriment ΔNp73 multiplie par cinq la densité de ces cellules dans le néocortex à P24 (Ledonne et al., 2016). En revanche, la délétion du gène pro-apoptotique dans les cellules Cajal-Retzius exprimant spécifiquement Wnt3a n'a pas d'influence sur la survie des neurones (Ledonne et al., 2016). Cela démontre que les CRs corticaux issus du septum et de l'éminence thalamique meurent selon un processus d'apoptose mettant en jeu la protéine Bax tandis que ce n'est pas le cas des CRs corticaux issus de l'hème. De façon surprenante, la délétion du gène Bax dans les neurones Cajal-Retzius hippocampiques exprimant ΔNp73 (majoritairement issus de l'hème cortical) augmente la survie de ces cellules dans la couche lacuneuse moléculaire de la corne

d'Ammon et dans la strate moléculaire supra-pyramidale du gyrus denté de souris juvéniles et adultes (Riva et al., 2023). La protéine Bax régule donc l'apoptose des CRs néocorticaux issus du septum et de l'éminence thalamique ainsi que des CRs hippocampiques dérivés de l'hème cortical. Cela suggère que la mort des neurones Cajal-Retzius est contrôlée à la fois par des mécanismes cellule-autonomes (lignage) et par leur environnement (localisation post-natale).

Comme nous l'avons détaillé précédemment, l'inhibition de l'activité spontanée des neurones immatures provoque une diminution de leur viabilité et une augmentation de leur apoptose (Blanquie et al., 2016; voir partie II.2.2). Néanmoins, l'application de tétrodotoxine sur des neurones corticaux en culture semble à l'inverse entrainer une augmentation de la survie des cellules Cajal-Retzius (Blanquie et al., 2016). *In vivo*, l'expression du canal potassique à rectification entrante Kir2.1 dans les CRs corticaux ΔNp73+ provoque l'hyperpolarisation de leur potentiel de membrane et augmente leur survie à P15 et P25 (Riva et al., 2019). Cela démontre que l'apoptose des neurones Cajal-Retzius corticaux issus du septum et de l'éminence thalamique dépend de leur activité. Ainsi, contrairement à ce qui a été observé pour la majorité des neurones corticaux, c'est la présence d'une activité spontanée lors du développement du néocortex qui est à l'origine de l'apoptose des CRs. Cela soulève la question du mécanisme selon lequel l'activité neuronale est à l'origine de la mort de ces neurones.

c. Les cellules Cajal-Retzius ne présentent pas de *GABA shift*

Les neurones Cajal-Retzius ne présentent pas d'augmentation développementale de l'expression de KCC2 après la naissance (Pozas et al., 2008; Riva et al., 2019; Szrinivasan et al., 2025; voir parties I.2.2 et I.2.4). Cela traduit une expression particulièrement faible, voire une absence complète, du transporteur dans les CRs qui survivent dans le néocortex et l'hippocampe adulte (Szrinivasan et al., 2025; Allen Brain Atlas10x genomics 2020 with 10x-SMART-seq taxonomy 2021). Les causes de ce phénomène remarquable ne sont pas encore connues. L'évolution de l'expression de NKCC1 dans ces neurones est plus débattue. Une étude a démontré que la délétion de *Slc12a2* et l'inhibition de NKCC1 ont toutes les deux un effet sur la survie des cellules Cajal-Retzius (Blanquie et al., 2016). Par ailleurs, l'ARNm du transporteur a été détecté dans ces neurones à P0 (Achilles et al., 2007). Néanmoins, il n'existe pas de preuve de l'expression protéique de NKCC1 dans les CRs après la naissance. Le Allen Brain Atlas rapporte par ailleurs une expression transcriptionnelle nulle de NKCC1 dans les neurones Cajal-Retzius de l'hippocampe et du néocortex de souris adultes (Allen Brain Atlas10x genomics 2020 with 10x-SMART-seq taxonomy 2021). L'effet de la perte d'expression de NKCC1 sur la survie des CRs rapporté par Blanquie *et al*. (Blanquie et al.,

2016) pourrait donc potentiellement provenir d'un mécanisme qui ne serait pas cellule-autonome et qui serait initié par les cellules gliales.

Les neurones Cajal-Retzius expriment des récepteurs AMPA et NMDA fonctionnels, qui peuvent être activés pharmacologiquement (Lu et al., 2001; Marchionni et al., 2010). Néanmoins, leurs potentiels post-synaptiques spontanés sont entièrement abolis lorsque des tranches d'hippocampe ou de néocortex sont incubées avec de la gabazine (Kilb & Luhmann, 2001; Marchionni et al., 2010). Il semble donc il y avoir une absence de transmission synaptique spontanée impliquant les récepteurs AMPA et NMDA chez les cellules Cajal-Retzius, dont l'activité est exclusivement régulée par les récepteurs GABA-A au niveau des synapses.

Tandis que l''application de GABA sur des interneurones de la strate lacuneuse moléculaire de souris juvéniles (P12-24) entraine leur inhibition, l'application de ce même neurotransmetteur sur les cellules Cajal-Retzius provoque leur excitation (Marchionni et al., 2010). Il a plus précisément été démontré que l'activation des récepteurs GABA-A des CRs de souris juvéniles entraine, selon le contexte, leur excitation ou leur inhibition par le biais un phénomène de bloc de dépolarisation (Marchionni et al., 2010; Quattrocolo & Maccaferri, 2013). Cela illustre que l'absence d'expression de KCC2, et la potentielle expression de NKCC1, dans les neurones Cajal-Retzius est à l'origine de leur dépolarisation en réponse à l'activation de leurs récepteurs GABA-A. Cette réponse GABAergique dépolarisante semble être mise en jeu dans leur apoptose. En effet, l'activation chronique des récepteurs GABA-A dans des tranches organotypiques de cortex murin immature via du muscimol résulte en une diminution de la survie des CRs à onze jours *in vitro* (Blanquie et al., 2016). Cet effet est entièrement aboli lorsque les tranches sont additionnellement incubées avec du bumétanide, un inhibiteur de NKCC1 qui entraine une hyperpolarisation de E_{GABA} (Blanquie et al., 2016; D. D. Wang & Kriegstein, 2011). L'activation chronique de la signalisation GABAergique dépolarisante est donc toxique pour les neurones Cajal-Retzius.

L'incubation de neurones corticaux en culture avec du bumétanide seul pendant leur maturation (de deux à neuf jours *in vitro*) est par ailleurs suffisante pour entrainer une forte augmentation de la survie des cellules Cajal-Retzius (Blanquie et al., 2016). L'apoptose physiologique de ces neurones est donc provoquée, au moins en partie, par leur réponse dépolarisante au GABA lors d'une période où la majorité des neurones développent une signalisation GABAergique hyperpolarisante (Blanquie et al., 2016; Ganguly et al., 2001). L'absence d'augmentation de l'expression de KCC2 au cours du développement pourrait donc être un facteur déterminant dans la mort cellulaire physiologique des CRs. Néanmoins,

l'implication de l'absence du transporteur dans l'apoptose des cellules Cajal-Retzius n'a à ce jour pas été démontrée, et a été l'objet d'une partie du travail expérimental décrit plus loin dans ma thèse (voir Résultats additionnels).

Le mécanisme par le biais duquel l'effet dépolarisant du GABA induit l'apoptose des CRs n'est pas encore résolu mais il pourrait reposer sur l'expression du récepteur de neurotrophines $p75^{NTR}$ (Figure 15). En effet, les neurones Cajal-Retzius ont un niveau d'expression de $p75^{NTR}$ (voir parties I.3.2 et I.4.1) deux fois supérieur à celui des autres types neuronaux au sein d'une même culture (Blanquie et al., 2016). L'inhibition de NKCC1 provoque une diminution d'environ 10% de l'expression de $p75^{NTR}$ dans les CRs tandis qu'elle n'a pas d'effet dans les autres types de neurones (Blanquie et al., 2016). Par ailleurs, il a été démontré que la mise en place d'une signalisation GABAergique dépolarisante dans les neurones corticaux à la suite d'un traumatisme est aussi associée à une augmentation de l'expression de $p75^{NTR}$ (Khirug et al., 2021). Il est donc possible que la signalisation GABAergique dépolarisante favorise la mort cellulaire des cellules Cajal-Retzius par la voie extrinsèque de l'apoptose en favorisant l'expression du récepteur de mort cellulaire. L'expression de $p75^{NTR}$ est aussi régulée par le facteur de transcription TAp73, dont la fonction est inhibée par ΔNp73 (Niklison-Chirou et al., 2013; Ozaki et al., 2010). Ainsi, il serait aussi possible qu'il y ait une diminution de l'expression de ΔNp73 chez les neurones Cajal-Retzius lors du développement, entrainant l'augmentation de l'expression de $p75^{NTR}$ et de Bax par le biais de TAp73. Cela favoriserait l'activation des voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose, indépendamment de l'effet dépolarisant du GABA.

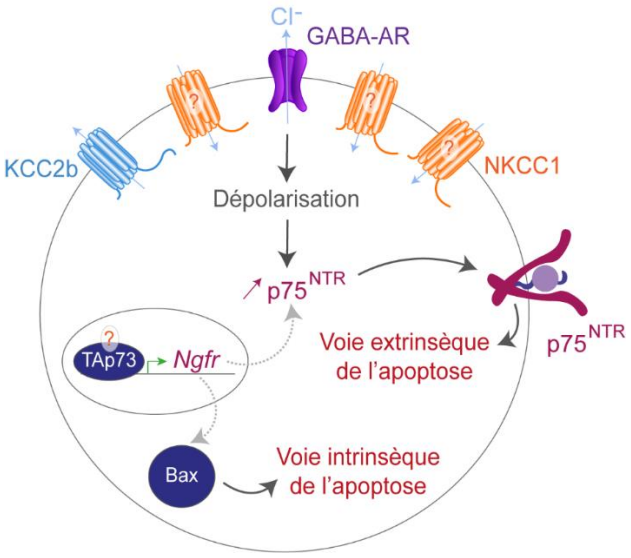


Figure 15. Voies potentielles mises en jeu dans l'apoptose physiologique des neurones Cajal-Retzius.

Les CRs présentent une faible expression de KCC2. Par conséquent, la transmission GABAergique est dépolarisante chez ces neurones et entraine une augmentation de l'expression du récepteur $p75^{NTR}$,

mis en jeu dans l'apoptose des cellules. Il est aussi connu que TAp73 favorise l'expression de $p75^{NTR}$ et de Bax, deux protéines mises en jeu dans des voies apoptotiques distinctes. Néanmoins, nous ne savons pas à ce jour si les CRs présentent une forte expression de TAp73 ou une diminution de l'expression de son inhibiteur ΔNp73 au cours du développement.

Ainsi, les cellules Cajal-Retzius ne présentent pas d'augmentation de l'expression de KCC2b au cours de leur maturation et maintiennent une réponse dépolarisante au GABA. Ces neurones sont aussi caractérisés par une élimination massive qui dépend de leur activité lors de la seconde vague apoptotique. Néanmoins, nous ne savons actuellement pas si l'absence d'augmentation de l'expression de KCC2 est à l'origine de l'apoptose des CRs. J'ai donc tenté, au cours de ma thèse, de répondre à cette question. Les expériences que j'ai menées dans le cadre de ce projet seront présentées dans les résultats complémentaires.

III. Rationnel et objectifs

L'inhibition synaptique rapide joue un rôle essentiel dans le fonctionnement du système nerveux, notamment en régulant l'équilibre entre l'excitation et l'inhibition neuronale. Dans le néocortex et l'hippocampe, cette dernière repose majoritairement sur l'activation des récepteurs ionotropiques GABA-A, qui entraine un influx de chlorure dans les neurones (Aickin et al., 1984; Farrant & Nusser, 2005). Le co-transporteur potassium-chlorure KCC2 exporte spécifiquement le chlorure de ces cellules et détermine ainsi la polarité de la transmission GABAergique (Acton et al., 2012; Blaesse et al., 2006; Rivera et al., 1999). De par son rôle central dans l'homéostasie du chlorure, l'altération de la fonction de KCC2 est associée à diverses maladies neurologiques, dont l'épilepsie (Huberfeld et al., 2007; Saitsu et al., 2016; Stödberg et al., 2015). Le gène codant pour KCC2 (*SLC12A5*) subit une augmentation de son expression lors de la maturation neuronale, entrainant la transition entre une réponse dépolarisante et une réponse hyperpolarisante au GABA, un phénomène appelé *GABA shift* (Ben-Ari, 2002; Rivera et al., 2005). Cette réponse différentielle des neurones au GABA au cours du développement est essentielle pour leur fonctionnement. En effet, plusieurs processus neurodéveloppementaux tels que la prolifération, la migration et la différenciation des neurones ainsi que la formation de synapses et la mise en place de circuits neuronaux reposent sur la transmission GABAergique dépolarisante (Bortone & Polleux, 2009; Cancedda et al., 2007; Gubellini et al., 2001; Haydar et al., 2000). Par la suite, la mise en place d'une transmission GABAergique hyperpolarisante est nécessaire pour assurer l'inhibition neuronale et contrôler l'excitabilité de ces cellules. Au cours de ma thèse, j'ai étudié deux exceptions ne présentant pas d'augmentation développementale de l'expression de KCC2 : l'une des isoformes du transporteur et un type neuronal spécifique.

Le gène *SLC12A5* code pour deux isoformes distinctes, appelées KCC2a et KCC2b (Uvarov et al., 2007). Ces protéines ne diffèrent que par leur domaine N-terminal (Uvarov et al., 2007). Celui de KCC2a est constitué d'un domaine de fixation de SPAK, une kinase qui régule l'expression membranaire du transporteur, qui est absent de la séquence de KCC2b (Friedel et al., 2015; Uvarov et al., 2007). Lors du développement, seule l'expression de KCC2b augmente tandis que celle de KCC2a varie relativement peu (Uvarov et al., 2007, 2009). Cela fait de KCC2a l'isoforme largement minoritaire dans la majorité des structures du cerveau adulte, telles que l'hippocampe et le néocortex dans lesquels elle ne représente que 8-10% de l'expression protéique du transporteur (Uvarov et al., 2009). Il a précédemment été démontré que KCC2a agit comme un transporteur de chlorure et forme des dimères avec KCC2b (Markkanen et al., 2017; Uvarov et al., 2009). KCC2a présente aussi la capacité d'interagir avec la kinase SPAK au sein de systèmes hétérologues, une propriété que ne

possède pas KCC2b (Markkanen et al., 2017; Uvarov et al., 2009). Pour autant, peu d'études se sont intéressées au rôle de KCC2a, et sa fonction dans les neurones du télencéphale n'a pas été élucidée. Certains éléments indiquent pourtant que l'isoforme pourrait avoir une fonction importante dans cette structure. En effet, des patientes atteintes du syndrome de Rett, notamment caractérisé par une déficience intellectuelle sévère, présentent une altération de l'expression transcriptionnelle de KCC2a, mais pas de KCC2b, dans le cortex (Hinz et al., 2019).

Dans ce contexte, l'objectif principal de ma thèse était de déterminer si KCC2a possède une fonction spécifique dans les neurones du néocortex et de l'hippocampe. J'ai notamment voulu définir si cette isoforme joue un rôle dans la régulation de KCC2b. J'ai observé que KCC2a module différentiellement l'expression et la stabilité de KCC2b en fonction de la maturité des neurones. J'ai ensuite analysé les mécanismes moléculaires à l'origine de cette régulation en utilisant diverses méthodes de biologie moléculaire, de biochimie, d'immunomarquages ainsi que de l'électrophysiologie *in vitro*. En parallèle, j'ai travaillé sur un autre projet visant à restaurer la fonction de KCC2 dans un contexte d'épilepsie par le biais de potentialisateurs du transporteur. Au cours de ce projet, nous avons élucidé le mécanisme moléculaire par lequel ces molécules favorisent le transport de chlorure par KCC2 et avons démontré leur efficacité pour prévenir l'apparition des crises dans un modèle murin d'épilepsie chronique (Donneger et al., 2026).

Les neurones Cajal-Retzius, constituent un type neuronal qui ne présente pas d'augmentation développementale de l'expression de KCC2 (Pozas et al., 2008). Ils sont par ailleurs caractérisés par une apoptose activité-dépendante massive lors de la période post-natale (Riva et al., 2019). Bien que l'absence d'expression du transporteur n'ait pas été directement mise en cause dans leur mort cellulaire, nous pouvons supposer qu'elle y contribue certainement. Ainsi, lors de ma thèse, j'ai étudié l'implication de l'absence d'augmentation de l'expression de KCC2b sur l'apoptose développementale des neurones Cajal-Reztius. En dépit de plusieurs problèmes techniques rencontrés sur ce projet, il m'a permis de développer différentes méthodes d'infection virale *in utero* afin de surexprimer KCC2 dans les cellules Cajal-Retzius au cours du développement.

Matériel et méthodes

Je vais présenter ici les différentes méthodes que j'ai utilisées au cours de ma thèse. Les protocoles que j'ai affinés au cours de ma thèse et qui sont ici discutés en détail sont identifiés avec un titre souligné. Les méthodes relatives à l'étude de la fonction de KCC2a sont présentées plus en détail (notamment avec les références des produits) dans la section *Material and methods* de l'article principal.

MM.1 - Méthodes relatives à l'étude de la fonction de KCC2a

Cultures primaires de neurones hippocampiques

Les cultures primaires de neurones hippocampiques sont préparées à partir d'hippocampes d'embryons (E18.5) de rats Sprague Dawley, comme décrit précédemment (Al Awabdh et al., 2022; Gauvain et al., 2011). Les hippocampes sont dissociés à l'aide de trypsine (0.25%), puis triturés mécaniquement dans un mélange de HBSS et d'HEPES froid. Les neurones sont ensuite ensemencés sur des lamelles préalablement enduites de poly-D,L-ornithine (50 µg/ml) avec une densité de 1.5×10^5 cellules/lamelle. Le milieu d'ensemencement est constitué d'un milieu minimal essentiel (MEM) complété par 10% de sérum de cheval, 2 mM de L-glutamine et 1 mM de pyruvate de sodium. Après une période d'adhésion de trois à quatre heures, le milieu de culture initial est remplacé par un milieu de culture composé de milieu Neurobasal enrichi en B27, L-glutamine et en antibiotiques. Les neurones sont maintenus dans un incubateur à 37°C avec 5% de CO_2 pendant une durée maximale de quatre semaines, un tiers du milieu étant renouvelé chaque semaine.

Constructions plasmidiques

La construction KCC2b-Flag a été générée en insérant une séquence codant pour un tag 3xFlag (DYKDHDGDYKDHHIDYKDDDD) dans la deuxième boucle extracellulaire de KCC2 (Chamma et al., 2013). La construction KCC2a-Flag a été sous-clonée à partir de la construction précédente en remplaçant la séquence codante N-terminale de KCC2b par un fragment synthétique de 120 pb codant pour l'extrémité N-terminale de KCC2a.

Les expériences d'interférence ARN contre KCC2a ont été réalisées à l'aide de deux shARNs (short hairpin RNA) distincts, chacun cloné dans une structure de micro-ARN miR-30. Les séquences cibles de ces shARN sont : CTCCCGAGGGAAGACGTCAAA (shKCC2a_1), ACCCAGAGTCCCGCCGGCATTCGGT (shKCC2a_3). Un shARN n'ayant pas de cible dans

le transcriptome de rat a été utilisé comme contrôle : ACCTAAGGTTAAGTCGCCCTCG (shNT).
La construction WNK1-CA code pour un mutant ponctuel (S382E) de la protéine WNK1, qui est phosphomimétique et constitutivement actif. Le gène codant pour WNK1-CA est cloné dans une structure de type TetOn. Ainsi, l'expression de WNK1-CA et de la GFP est contrôlée par un promoteur de type TRE qui est activé en réponse à la doxycycline. La doxycycline permet en effet la liaison du facteur de transcription rtTA (enhancer) et empêche celle de tTS (silencer) au promoteur, activant l'expression des gènes en aval (WNK1-CA et la GFP).

Transfection

Les neurones hippocampiques sont transfectés deux semaines après leur mise en culture en utilisant de la TransFectin. Les différentes combinaisons de plasmides (voir Article principal) sont mélangées dans un milieu de culture complet afin d'obtenir 1 µg de mélange de plasmides par puits. La TransFectin est ensuite mélangée au milieu à raison de 3 µl de TransFectin par microgramme de plasmide. Les milieux contenant respectivement les plasmides et la TransFectin sont mélangés, et les neurones sont incubés dans ce mélange pendant 45 min à 37°C. Le milieu de transfection est ensuite remplacé par un mélange de milieu de culture complet conditionné (2/3) et frais (1/3).
Les cellules HEK-293 ayant atteint 70% de confluence sont transfectées à l'aide de polyéthylèneimine (PEI) selon un protocole similaire à celui utilisé pour la transfection neuronale. Les cellules sont incubées dans le mélange plasmide/PEI pendant 48 h avant la fixation.

<u>Traitements pharmacologiques</u>

L'endocytose est inhibée en incubant les neurones dans du milieu de culture complet contenant un peptide inhibiteur de la dynamine myristoylé (DiP, 50 µM) pendant 40 min à 37°C. L'effet de ce peptide étant réversible, le marquage membranaire de KCC2 sur des neurones non-fixés est réalisé en présence de DiP (20 min).
Le système ubiquitine-protéasome est bloqué en incubant les neurones dans du milieu de culture complet contenant soit l'inhibiteur de l'enzyme d'activation de l'ubiquitine (E1), PYR-41 (50 µM), soit le bloqueur de protéasome, MG132 (2.5 µM), pendant 2 h à 37°C. Le MG132 est un inhibiteur connu de la calpaïne (IC_{50} = 1.2 µM), ce traitement a donc également inhibé la dégradation de KCC2 par ces protéases.

L'expression de WNK1-CA est induite en incubant les neurones dans du milieu de culture complet contenant de l'hyclate de doxycycline (2 µg/ml) pendant 24 h à 37°C.

Les expériences reposant sur l'induction de l'expression de WNK1-CA et de la GFP avec de la doxycycline ont été particulièrement difficiles à mettre en place. En effet, très peu de neurones exprimaient la GFP après le traitement, ce qui m'a menée à réaliser de nombreux réplicats. Cela peut provenir d'un faible taux de transfection des neurones dû à la large taille du plasmide (13.7 kb) (Kreiss, 1999). Cela peut aussi être dû à la position du gène codant pour la GFP en aval d'une séquence T2A (voir Discussion III.1.2). En effet, il semblerait que les gènes en aval de séquences de type 2A aient une expression protéique faible en comparaison des gènes situés en amont (Z. Liu et al., 2017). Par ailleurs, lors des expériences pendant lesquelles le plasmide WNK1-CA a été co-transfecté avec les plasmides shARNs, je n'ai pas pu utiliser la GFP pour détecter les neurones exprimant WNK1-CA car les plasmides shARNs codent aussi pour cette protéine fluorescente. Pour augmenter la probabilité que les neurones choisis pour l'analyse expriment WNK1-CA, j'ai donc mis ce plasmide en majorité dans les mélanges plasmidiques et j'ai imagé de nombreux neurones (voir Article principal).

Immunocytochimie

Les tissus issus des souris appartenant à la lignée murine KCC2a-KO (Markkanen et al., 2014) utilisés dans ce projet nous ont aimablement été fournis par l'équipe du Dr. Muriel Thoby-Brisson (Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine). Afin d'augmenter la spécificité de l'anticorps anti-KCC2a développé par Pavel Uvarov *et al.* (Uvarov et al., 2009), ce dernier a été pré-adsorbé sur des tranches de tronc cérébral de jeunes souris (P9) délétées pour KCC2a ($KCC2a^{-/-}$). Après dissection, les troncs cérébraux sont immédiatement congelés dans de la glace carbonique. Ils sont fixés dans de la paraformaldéhyde (PFA) pendant une nuit à 4°C. Ils sont ensuite coupés en tranches de 50 µm. Une quarantaine de tranches sont perméabilisées avec du Triton X-100 à 0.25% puis incubées dans 1 ml d'anticorps primaire de lapin anti-KCC2a (1:750) dilué dans du sérum de chèvre inactivé à 3% et du PBS 1X pendant 3 jours, à 4°C, sous agitation. La solution d'anticorps obtenue est ensuite utilisée pour les expériences d'immunocytochimie.

Afin de marquer les protéines KCC2a et KCC2 endogènes, les cellules sont fixées dans une solution de PFA-sucrose à 4% pendant 15 min. Les neurones sont ensuite perméabilisés avec du Triton X-100 à 0.25% et bloqués pendant 30 min dans du sérum de chèvre inactivé à 10%. Un protocole de marquage en deux étapes est ensuite appliqué. Les lamelles sont d'abord incubées une heure à température ambiante avec un anticorps primaire de lapin anti-KCC2a (1:750) dilué dans du sérum de chèvre inactivé à 3% et du PBS 1X. Après leur lavage avec du PBS 1X, les cellules sont incubées dans une solution d'anticorps secondaire d'âne anti-lapin Cy3 pendant 45 min à température ambiante. Le processus est ensuite répété en utilisant un anticorps de lapin anti-panKCC2 et un anticorps secondaire d'âne anti-lapin A647.

Afin de quantifier l'expression membranaire des isoformes recombinantes de KCC2, un protocole d'immunomarquage sur neurones non-fixés est réalisé. Les neurones non-fixés sont incubés à 13°C pendant 20 min avec l'anticorps primaire de souris anti-Flag M2 dilué dans du MEM, complété par du D-glucose (33 mM), du pyruvate de sodium (1 mM), de l'HEPES (20 mM), de la glutamine (2 mM) et du B27 (1X). Cela m'a permis de marquer les protéines KCC2-Flag membranaires. Les cellules sont ensuite fixées, perméabilisées et bloquées. Après un lavage avec du PBS 1X, les cellules sont successivement incubées avec : un anticorps d'âne anti-souris Cy3, un mélange contenant des anticorps primaires de souris anti-Flag M2 et de poulet anti-GFP, puis un mélange contenant des anticorps secondaires d'âne anti-souris A647 et d'âne anti-poulet A488. Les lamelles sont ensuite lavées, colorées au DAPI et montées.

Acquisition et analyse des images

Les images standard destinées à la quantification ont été acquises à l'aide d'un microscope à épifluorescence. Le logiciel ImageJ est utilisé pour quantifier le rapport entre la fluorescence de surface et la fluorescence totale des isoformes recombinantes de KCC2. Une région d'intérêt (ROI) est délimitée autour d'une dendrite primaire située dans le plan focal. L'intensité moyenne de fluorescence est ensuite mesurée successivement pour le marquage de surface (Cy3) et le marquage total (Alexa647). L'intensité moyenne du bruit de fond est mesurée séparément pour chaque fluorophore et soustraite de l'intensité du signal correspondant afin d'obtenir l'intensité de fluorescence corrigée.

Les images correspondant à l'expression endogène de KCC2a et KCC2 total ainsi qu'à l'expression de KCC2b-Flag et KCC2 total en fonction de divers traitements ont été réalisées à l'aide d'un microscope confocal. Elles ont été acquises avec un zoom de 5. Pour chaque neurone, une série d'images en Z (Z-stack) est acquise le long d'une dendrite primaire (pas de 0.5 µm). Lors de l'analyse, une projection somme des images en Z correspondant à chaque dendrite est créée sur ImageJ. Une ROI est tracée autour de la dendrite d'intérêt. Pour déterminer l'expression protéique totale, l'intensité moyenne du bruit de fond est soustraite à l'intensité moyenne du signal A647. Pour tenir compte de l'épaisseur de la dendrite, la valeur obtenue est normalisée par l'épaisseur de la dendrite, calculée comme suit : [nombre d'images dans la série en Z − 1] × 0.5 µm. L'expression membranaire relative est calculée comme le rapport entre l'intensité de surface corrigée et l'intensité totale corrigée.

J'ai analysé la répartition de KCC2 total et de KCC2a le long de l'axe somato-dendritique à l'aide de projections sommes en Z. Le nombre de plans utilisés pour l'analyse a été ajusté selon que je quantifie l'expression somatique ou dendritique. L'intensité du bruit de fond est mesurée indépendamment pour la projection somatique et dendritique afin de garantir une soustraction précise. La normalisation par l'épaisseur du neurone ([nombre d'images dans la série en Z – 1] × 0.5 µm) est effectuée indépendamment au niveau du soma et de la dendrite.

J’ai analysé les propriétés des agrégats de KCC2 total et KCC2b-Flag à l'aide d'une routine Metamorph précédemment développée dans l’équipe (Al Awabdh et al., 2022). Une ROI correspondant à une dendrite primaire est sélectionnée, puis l’image est aplatie et filtrée numériquement. Les signaux dépassant un seuil d’intensité défini par l'utilisateur et d'une surface supérieure à 0.031 μm^2 sont définis comme des agrégats. Les agrégats sont superposés aux images brutes afin de calculer leur densité moyenne, leur surface et l’intégrale de leur intensité.

Le logiciel IMARIS a été utilisé pour quantifier l'enrichissement de KCC2 total et KCC2a dans les agrégats du transporteur. Les segments dendritiques sont visualisés en 3D et isolés du bruit de fond. Les signaux présentant un diamètre supérieur à 0.7 µm et une intensité de fluorescence dépassant un seuil défini par l'utilisateur sont classés comme des agrégats et modélisés sous forme de sphères de 1 µm. Le nombre d’agrégats, l’intensité de la fluorescence au sein de ces derniers et l’intensité de la fluorescence au sein de la dendrite sont mesurés pour KCC2a et KCC2 total, et les valeurs de bruit de fond correspondantes sont soustraites.

Le logiciel IMARIS a aussi été utilisé pour quantifier le type et la densité des épines dendritiques. Les segments dendritiques sont visualisés en 3D et isolés du bruit de fond. La dendrite isolée est définie comme un filament et les épines (diamètre > 0.3 µm, longueur < 5 µm) sont identifiées à partir de ce filament à l’aide d’une méthode de seuil basée sur l’algorithme « *Shortest Distance from Distance Map* ». Les épines sont classées à l’aide de l’extension IMARIS « Classify Spines XTension ».

Extraction d’ARN

L'ARN de cortex et d’hippocampe de rat est extrait avec du TRIzol. Après dissection, les tissus sont immédiatement congelés dans de la glace carbonique, puis conservés à −80°C. Les tissus sont lysés par immersion dans 1 ml de TRIzol, puis homogénéisés à l'aide d'un broyeur de Potter. 200 µl de chloroforme sont ajoutés au lysat, puis le mélange est centrifugé pour séparer la phase aqueuse contenant l’ARN du reste. L’ARN est ensuite précipité par l’ajout de 500 µl d’isopropanol et 10 min de centrifugation. Le culot contenant l’ARN est lavé avec de l’éthanol à 75%, séché à l’air pendant 10 min, puis re-suspendu dans 50 µl d’eau sans RNase. L’ARN des neurones en culture est extrait à l’aide du kit RNAqueous-Micro. Les neurones sont ensemencés dans des plaques de 6 puits avec une densité de 3.5×10^5 cellules/puits. Pour chaque temps analysé (7, 10 et 24 jours en culture), les neurones de deux puits sont récoltés et regroupés. Les cellules sont détachées par dissociation mécanique, puis centrifugées. Elles sont ensuite lysées à l’aide du kit, et 50 µl d’éthanol absolu sont ajoutés au lysat. Le mélange lysat/éthanol est chargé sur une colonne fournie dans le kit, puis une série d’étapes de lavage

et de centrifugation est effectuée. L'ARN est élué dans 20 µl de tampon d'élution. L'ADN génomique résiduel est éliminé par traitement à la DNase I.

Transcription inverse et PCR quantitative

L'ARN obtenu après l'extraction est rétrotranscrit à l'aide de la transcriptase inverse SuperScript II. Le mélange réactionnel contient 1 µg d'ARN, 100 ng d'amorces aléatoires et 1 µl d'un mélange de dNTPs à 10 mM ; il est complété à 13 µl avec de l'eau stérile. L'ARN est initialement dénaturé à 65°C pendant 5 min. Du DTT est ensuite ajouté au mélange et incubé 2 min à température ambiante, puis 1 µl de transcriptase inverse SuperScript est ajouté. La transcription inverse est réalisée en plaçant le mélange 10 min à 25°C puis 50 min à 42°C. La réaction est ensuite inactivée par une incubation de 15 min à 70°C.

Les PCR quantitatives sont réalisées à l'aide du mélange ABsolute Blue QPCR Mix, SYBR Green, ROX. L'amplification de chaque cible (KCC2a, KCC2b et le gène de référence Ywhaz) est effectuée en trois réplicats dans une plaque de qPCR à 384 puits. Pour chaque cible, des contrôles dans lesquels l'ADNc est remplacé par l'ARN correspondant (sans transcription inverse) ou par de l'eau sont réalisés. Chaque réaction de 10 µl contient : 5 µl de Tp2X Sybr, 4 µl d'ADNc matrice (C = 10 ng/µl), 0.2 µl d'un mélange d'amorces sens et antisens (10 µM) et 0.8 µl d'eau. Les qPCR sont réalisées avec un appareil QuantStudio5 selon le programme suivant : dénaturation initiale à 95°C pendant 10 min, suivie de 40 cycles alternant 95°C pendant 30 s, 58°C pendant 30 s, 72°C pendant 20 s, et d'une étape finale de dénaturation à 95°C pendant 15 s permettant d'obtenir la courbe de fusion.

Western blot

Les hémisphère (adultes) ou cerveau entiers (P9), dont le tronc cérébral a été retiré, provenant des souris KCC2a$^{-/-}$ C57BL6/J et de leurs congénères WT sont lysés dans un tampon RIPA modifié contenant (en mM) : 50 Tris-HCl (pH 7.4), 150 NaCl, 1 % de Nonidet P-40, 1 % de Triton X-100, 0.5% de DOC, 0.1% de SDS, 50 NaF, 1 EDTA, complété par des inhibiteurs de protéases et des inhibiteurs de phosphatases. La lyse est réalisée par homogénéisation de 1 mg de tissu pour 10 µl de RIPA dans un broyeur de Potter. Les échantillons sont centrifugés, puis le surnageant contenant le lysat protéique est recueilli. La concentration en protéines est déterminée à l'aide du kit Pierce™ BCA Protein Assay.

Les Western blots contre KCC2 et SPAK sont réalisés comme suit. Les extraits protéiques sont dénaturés par une incubation dans un mélange d'agent réducteur et de LDS pendant 1 h à 37°C (concentration protéique finale de 3 µg/µl). Le mélange (10 µl) est chargé dans un gel de polyacrylamide Bis-Tris 4-12%. Après leur migration, les protéines sont transférées sur une

membrane de nitrocellulose pendant 3 h à 100 V à 4°C. Les membranes sont lavées (3 × 10 min) avec du TBS-Tween (TBST) et bloquées avec du lait écrémé à 5% (p/v). Les membranes sont incubées toute la nuit à 4°C dans une solution d'anticorps primaires contenant l'un des anticorps suivants : anticorps de lapin anti-KCC2 (1:1000), de lapin anti-KCC2pT1007 (1:1000), de mouton anti-SPAK (1:50), de mouton anti-SPAKpS373 (1:50) ; ainsi que l'anticorps de lapin anti-GAPDH (1:2000), le tout dilué dans du lait écrémé à 5% (p/v). Les membranes sont lavées (3 × 10 min dans du TBST) puis incubées pendant 1 h à température ambiante avec des anticorps secondaires de chèvre anti-lapin DyLight 800 (1:5000) et d'âne anti-mouton 800 (1:1000, Rockland) dilués dans du lait écrémé à 1% (p/v). Les images sont acquises à l'aide du système d'imagerie infrarouge Odyssey. L'intensité intégrée du signal des différentes bandes est mesurée à l'aide du logiciel ImageJ.
Les Western blots contre WNK1 sont réalisés comme suit. Les extraits protéiques sont dénaturés pendant 10 min à 70°C. Le mélange (10 µl) est chargé dans un gel de polyacrylamide Tris-acétate 3-8%. Les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose pendant 2.5 h à 65 V et à 4°C. L'immunomarquage est réalisé à l'aide d'anticorps primaires de mouton anti-WNK1 (1:50) ou de mouton anti-WNK1pS382 (1:50), suivis d'un anticorps secondaire d'âne anti-mouton 800 (1:1000).

Je souhaitais aussi démontrer que KCC2a est requise pour l'interaction entre KCC2b et SPAK. Pour cela j'ai réalisé des expériences de co-immunoprécipitation entre KCC2b et SPAK sur des extraits protéiques issus des cerveaux de souris KCC2a$^{-/-}$ et WT (P9 et adultes). J'ai donc précipité SPAK et marqué KCC2b en utilisant l'anticorps de poulet anti-KCC2b (Uvarov et al., 2009). La précipitation a été efficace sur les extraits issus de jeunes souris mais l'anticorps anti-KCC2b était très peu spécifique et de nombreuses bandes étaient visibles quand il était appliqué sur les extraits protéiques non précipités. A l'inverse, l'anticorps était spécifique lorsqu'il était appliqué sur les extraits issus de souris adultes, mais je n'ai pas obtenu de signal KCC2a ou KCC2b en précipitant SPAK. Cela est discuté plus en détail dans la Discussion (Discussion partie I.2).

Électrophysiologie

Les enregistrements en configuration cellule entière sont réalisés sur des neurones hippocampiques à 21-24 jours en culture, perfusés à un débit de 2 ml/min avec une solution de liquide cérébrospinal artificiel (aCSF) composée (en mM) de : 2 $CaCl_2$, 2 KCl, 3 $MgCl_2$, 10 HEPES, 20 D-glucose, 120 NaCl à 34°C. Les enregistrements sont réalisés à l'aide de pipettes en verre borosilicaté de 5 MOhm remplies d'une solution intracellulaire composée de (en mM) : 104 K-gluconate, 25.4 KCl, 10 HEPES, 10 EGTA, 2 MgATP, 0.4 Na_3GTP, 1.8 $MgCl_2$. Le potentiel de jonction liquide (14.9 mV) est corrigé a *posteriori*. Les signaux sont acquis à l'aide

d’un amplificateur Multiclamp 700B, filtrés par un filtre passe-bas à 2 kHz et numérisés à 20 kHz à l’aide du logiciel Clampex 11. Les courants médiés par les récepteurs GABA-A sont isolés en bloquant les autres types de courants à l’aide des substances suivantes (en µM) : 1 TTX, 50 D-AP5, 10 NBQX et 100 CGP54626. Une fois la configuration en cellule entière établie, une pipette remplie d’isoguvacine (100 µM) est positionnée près du soma. Des paliers de potentiels allant de −80 mV à 0 mV (par paliers de 10 mV) sont appliqués, et les courants médiés par les récepteurs GABA-A sont évoqués par la libération d’isoguvacine à chaque palier.

La pipette contenant l’isoguvacine est ensuite repositionnée au-dessus d’une dendrite primaire, à une distance de 50 à 100 µm du soma, et le même protocole de paliers de potentiels, associés à la libération d’isoguvacine, est appliqué. Les courants sont mesurés à chaque palier de potentiel. Les potentiels sont corrigés afin de prendre en compte la chute de potentiel liée à la résistance d'accès et le potentiel de jonction liquide. Les courbes courant-potentiel (I-V) sont tracées à l’aide du logiciel Clampfit 11 afin d’estimer le potentiel d’inversion du courant au travers des récepteurs GABA-A au niveau du soma ($EGABA_{soma}$) et de la dendrite ($EGABA_{dendrite}$). La différence ($\Delta E_{GABA} = EGABA_{dendrite} - EGABA_{soma)}$ est calculée, puis normalisée par la distance entre les deux sites d’application de l’isoguvacine afin d'estimer le gradient d’E_{GABA}.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l’aide du logiciel SigmaPlot 13, le seuil de significativité étant fixé à $p < 0.05$. Pour chaque analyse, le test a été déterminé en évaluant la normalité des données (test de Shapiro-Wilk) et, pour les comparaisons entre plusieurs groupes, l’égalité des variances (test de Brown-Forsythe). Les comparaisons entre deux groupes sont réalisées à l’aide d’un test t de Student bilatéral (distribution normale) ou d’un test de test de Wilcoxon-Mann-Whitney (distribution non normale). Pour les comparaisons entre plus de deux groupes (traitements pharmacologiques), les valeurs-p ont été corrigées à l’aide de la méthode de Holm-Šidák. Les autres comparaisons entre plus de deux groupes ont été réalisées à l’aide d’une ANOVA à un facteur suivie d’un test *post-hoc* de Tukey ; ou d’un test de Kruskal-Wallis suivi d’un test *post-hoc* de Dunn en cas de violation des hypothèses.

MM.2 - Méthodes relatives à l'analyse des déterminants de l'apoptose des neurones Cajal-Retzius

Constructions virales

Le virus AAV2/9-CAG-FLEX(tdTomato) provient de Neurophotonics.ca (référence : 296-aav9). L'expression de la tdTomato est sous contrôle du promoteur de la β-actine de poulet associé à l'amplificateur précoce immédiat du cytomégalovirus.

Le plasmide TetOn-FLEX-mCherry a été conçu et produit via VectorBuilder (identifiant : VB231214-1699yaq). Cette construction contient le gène de la mCherry qui est floxé et cloné dans une structure de type TetOn. L'expression de la mCherry est restreinte aux neurones exprimant la Cre-recombinase et est contrôlée par la doxycycline. La séquence TetOn est clonée dans une structure de vecteur viral adéno-associé (AAV) et est flanquée par des séquences 5' et 3' ITR issues d'un AAV2, qui permettent la réplication du génome viral. Cette construction a été encapsidée dans un AAV de sérotype 2/9 par VectorBuilder.

Le lentivirus LV-U6-shNT-PGK-EGFP-WPRE provient de UNC Vector Core (Goutierre, 2019). Nous ne l'utilisons ici que pour détecter la localisation des cellules infectées par le biais de l'expression de la GFP.

Les plasmides EF1a-FLEX(mCherry)-WPRE et EF1a-FLEX(KCC2-Flag-P2A-mCherry)-WPRE ont été conçus et produits via VectorBuilder (identifiant respectif : VB250321-1317tpm et VB250721-1753uwr). Ils contiennent la séquence EF1a-FLEX(mCherry) ou EF1a-FLEX(KCC2-Flag-P2A-mCherry) clonée dans une structure de vecteur lentiviral issue du VIH1. Ces séquences sont flanquées par des domaines 5' et 3' LTR-ΔU3 qui permettent la transcription de l'ARN viral et son encapsidation lors de la production du virus. Seul l'ADNc correspondant à la séquence inclue entre les séquences LTR est intégré dans le génome de la cellule hôte. L'ARN correspondant à ces constructions a été encapsidé dans des lentivirus dérivés du VIH par la plateforme de vectorologie de l'Institut du Cerveau, avec un titre de $3{,}96.10^9$ TU/ml (mCherry) et $8{,}58.10^8$ TU/ml (KCC2-P2A-mCherry).

Le virus AAV2/1-CMV-HI-eGFP-Cre-WPRE-SV40 provient de James M. Wilson (préparation virale Addgene # 105545-AAV1).

Animaux

Les procédures impliquant des souris ont été réalisées selon les Directives du conseil européen du 24 novembre 1986 (86/609/EEC) et selon les recommandations du Ministère de l'Agriculture, de l'Agro-alimentaire et de la Souveraineté alimentaire concernant la gestion des animaux (décret 87-848). Les expériences ont été approuvées par la Direction Départementale

de la Protection des Populations de Paris (animalerie de l'Institut du Fer à Moulin, licence E750522, APAFIS #43219-2023050209184247 v3).

La lignée murine ΔNp73-Cre-IRES-GFP (MGI : 4365581) nous a aimablement été fournie par l'équipe du Dr. Alessandra Pierani (Institut de Psychiatrie et Neurosciences de Paris, Institut Imagine). Cette lignée a été obtenue par l'insertion de la cassette Cre-IRES-GFP dans l'exon 3' du gène *Trp73* (Tissir et al., 2009). Elle présente donc une expression de la Cre et de GFP spécifiquement dans les cellules exprimant ΔNp73. L'insertion de la cassette provoque la délétion de ΔNp73. La lignée est maintenue par croisement entre un animal ΔNp73-Cre-IRES-GFP hétérozygote et une souris WT C57BL6/J. Les souris sont élevées dans une pièce avec des cycles jour/nuit de 12 h et de la nourriture et de l'eau *ad libitum*.

Injections virales *in utero*

Les accouplements sont réalisés entre une femelle WT C57BL6/J et un mâle hétérozygote pour le gène de la Cre-recombinase issu de la lignée ΔNp73-Cre ($\Delta Np73^{+/-}$). Le lendemain de la nuit de l'accouplement est défini comme le jour embryonnaire 0.5 (E0.5) tandis que le jour de la naissance est défini comme le jour post-natal 0 (P0). Les chirurgies sont réalisées sur des souris gestantes à E13.5. Les virus sont dilués dans du sérum physiologique (NaCl 0.9%) ainsi que dans du colorant Fast Green à 0.02% (Sigma-Aldrich) selon les concentrations indiquées dans le tableau 4 Les souris sont anesthésiées avec de l'isoflurane (induction : 4%, chirurgie : 2-1%). Les cornes utérines sont exposées par une laparotomie. 0.5-2 µl de virus sont injectés au travers de la paroi utérine dans les ventricules latéraux des embryons par le biais d'un capillaire en verre borosilicaté préalablement étiré. Une fois l'ensemble des embryons injectés, les cornes utérines sont replacées dans la cavité abdominale et cette dernière est réhydratée avec du sérum physiologique. La paroi musculaire ainsi que la peau sont suturées et les embryons continuent leur développement jusqu'à leur euthanasie (si analyse à E16.5 ou E18.5) ou jusqu'à leur naissance (si analyse post-natale). Lors des chirurgies, l'ensemble des embryons sont injectés car leur génotype est inconnu. Néanmoins les expériences d'immunohistochimie ne sont réalisées que sur les souris hétérozygotes $\Delta Np73^{+/-}$ présentant une copie de la Cre-recombinase, identifiées après la naissance par génotypage.

Dans le cadre de marquages réalisés sur des tranches de cerveau d'embryons, la mère est euthanasiée par dislocation cervicale. Les embryons ou les nouveaux nés (P0) sont prélevés et disséqués dans du PBS 1X froid. Leur cerveau est extrait et post-fixé dans de la PFA 4% à 4°C pendant 4h.

Dans le cadre de marquages réalisés sur des tranches de cerveau de jeunes souris (P15-30), les animaux subissent une perfusion intracardiaque avec du sérum physiologique (NaCl

0.9%). Leur cerveau est ensuite extrait et post-fixé dans de la paraformaldéhyde 4% à 4°C pendant environ 24h.

Virus	Concentration injectée	Volume injecté
AAV2/9-CAG-FLEX(tdTomato)	$1.6.10^{13}$ gc/ml	0.5-1 µl
AAV2/9- TetOn-FLEX(mCherry)	1.10^{12} gc/ml	0.5-1 µl
LV-EF1a-FLEX(mCherry)	$8,58.10^{8}$ TU/ml	1.5 µl
LV-EF1a-FLEX(KCC2Flag-P2A-mCherry)	$8,58.10^{8}$ TU/ml	1.5 µl

Tableau 4 : Virus utilisés pour les chirurgies.

Soins postnataux

Plusieurs expériences réalisées dans le cadre de ce projet reposent sur une chirurgie d'infection virale *in utero*, puis sur l'étude des animaux injectés plusieurs semaines après la naissance. Une faible survie des nouveau-nés a fréquemment été rapportée lors de ce type de manipulations. La cause principale de cette mortalité post-natale est le manque de soins et/ou le cannibalisme de la part des mères envers leurs petits. Ce phénomène est notamment dû au stress et/ou à la douleur causée par la chirurgie, et certaines lignées murines, telles que les souris C57BL6, y sont particulièrement sujettes (Meyer-Dilhet & Courchet, 2020). J'ai donc développé au cours de ma thèse un protocole de soins afin de diminuer le stress et la douleur des mères lors des périodes péri-opératoire et périnatale. Ces directives m'ont permis d'obtenir des taux de mortalité périnataux relativement bas lors de mes expériences.

Au début de la gestation, les animaux sont manipulés régulièrement par l'expérimentateur, ils sont notamment pesés tous les 3-4 jours. 24 h avant la chirurgie, les souris sont placées dans une cage propre, avec une litière chirurgicale afin de limiter les risques d'infection. Les souris ne sont placées à deux dans une cage chirurgicale que si elles sont à moins de deux jours d'écart dans leur gestation, sinon elles sont hébergées seules. Les animaux reçoivent une injection de buprénorphine (0.2 mg/kg) en pré-opératoire ainsi que des injections de méloxicam (10 mg/kg) en post-opératoire et toutes les 12 h pendant au moins 48 h (jusqu'à ce que la souris retrouve son comportement habituel). Dès qu'elles commencent à reprendre du poids et retrouvent un comportement normal, les souris ne sont plus manipulées par l'expérimentateur (au moins 2 jours avant E19.5). L'expérimentateur s'assure de la mise bas avec des gants propres en évitant de trop manipuler l'intérieur de la cage, et notamment le nid. Aucun nouvel enrichissement n'est introduit dans la cage et cette dernière n'est pas changée pendant 7 jours après la mise bas. Dans la mesure du possible, l'expérimentateur ne manipule pas la mère et les petits pendant 7 jours après la naissance, hormis pour les identifier.

Administration de doxycycline

Lors de ma thèse, nous avons dilué différentes concentrations de doxycycline dans l'eau de boisson des souris (Redelsperger et al., 2016). Nous avons traité certains animaux avec 500 µg/ml de doxycycline et 2% de sucrose (afin de masquer le goût de l'antibiotique) et d'autres avec 2 mg/ml de doxycycline et 5% de sucrose, de P13 à P23. Les bouteilles contenant le traitement ont été maintenues à l'obscurité avec des feuilles d'aluminium afin d'éviter la contamination de l'eau. Nous avons vérifié que les souris s'abreuvaient en pesant les bouteilles quotidiennement. La doxycycline a induit une diminution de l'abreuvage des souris pendant le traitement, nous nous sommes donc assurés quotidiennement de l'état de santé des animaux. Nous n'avons pas (ou peu) observé d'expression de mCherry dans les Cajal-Retzius à P23 avec cette méthode. Afin de déterminer si le problème provenait de l'administration de la doxycycline dans l'eau et/ou de la transmission aux petits par la lactation, nous avons associé l'administration *per os* de 2 mg/ml de doxycycline et 5% de sucrose de E7.5 à E15.5 à des injections sous-cutanées de doxycycline (50 mg/kg) chez les mères de E15.5 à E18.5 (transmission de l'antibiotique pendant la gestation). Les embryons ont été prélevés à E18.5 mais nous n'avons pas observé de fluorescence de mCherry.

Injections virales néonatales

Les nouveau-nés (P2) issus de la lignée ΔNp73-Cre sont anesthésiés par immersion dans de la glace pilée pendant 3 min précises. Ils sont ensuite déposés avec leur tête en position latérale sur un support maintenu à 4°C. Le site d'injection est situé aux trois-quarts de la ligne se trouvant entre l'œil et l'oreille, à proximité de l'oreille. Une incision de quelques millimètres est réalisée au niveau du site d'injection avec un scalpel. Le virus LV-U6-shNT-PGK-EGFP-WPRE (10^9 TU/ml, 1 µl) est injecté à l'aide d'un capillaire en verre borosilicaté préalablement étiré relié à une seringue Hamilton. Une fois les nouveau-nés injectés, ils sont réchauffés et stimulés dans la main de l'expérimentateur jusqu'à émettre des vocalisations. Ils sont ensuite déposés sur une plaque chauffante à 37°C pendant au moins 10 min avant d'être replacés dans le nid.

Immunohistochimie

Après avoir été fixés et lavés, les cerveaux d'embryons (E16.5-P0) sont inclus dans une matrice constituée de gélatine 7.5% et de sucrose 10% et sont congelés par immersion dans de l'isopentane à -55°C pendant 30 secondes. Ils sont ensuite coupés en tranches de 20 µm au cryostat. Les tranches sont collectées sur des lames et stockées à -80°C. Avant le marquage, les lames sont décongelées 20 min à température ambiante. Elles sont ensuite réhydratées dans du PBS 1X pendant 10 min puis lavées pendant 20 min dans du PBS 1X à

37°C afin d'éliminer les résidus de gélatine. Après trois lavages de 10 min dans du PBST (Triton X-100 à 0.3% dans du PBS 1X), les tranches sont incubées pendant 1 h à température ambiante dans du sérum d'âne à 10% dilué dans du PBST afin de permettre leur blocage. Elles sont ensuite incubées dans une solution d'anticorps primaires dilués dans du sérum d'âne à 3% et dans du PBST pendant la nuit à 4°C (voir Tableau 5). Les tranches sont ensuite à nouveau lavées et incubées pendant 2 h à température ambiante dans une solution d'anticorps secondaires et de DAPI (1:2000, Sigma-Aldrich) dilués dans du sérum d'âne à 3% et dans du PBST (voir Tableau 5). Enfin, les tranches sont lavées et montées avec du Mowiol.

Après avoir été fixés et lavés, les cerveaux des jeunes souris (P15-P30) sont déshydratés par des immersions successives dans des solutions de sucrose 20% et 30% pendant 2-3 jours au total. Ils sont ensuite coupés en tranches de 50 µm au cryotome à congélation et collectés dans des plaques 24 puits contenant du PBS 1X. Les tranches sont lavées à trois reprises pendant 5 min avec du PBST puis elles sont incubées pendant 1 h à température ambiante dans du sérum d'âne à 10% dilué dans du PBST afin de permettre leur blocage. Elles sont ensuite incubées dans une solution d'anticorps primaires dilués dans du sérum d'âne à 3% et dans du PBST pendant 3-4 jours à 4°C (voir Tableau 5). Les tranches sont ensuite lavées et incubées pendant 2 h à température ambiante dans une solution d'anticorps secondaires et de DAPI (1:2000, Sigma-Aldrich) dilués dans du sérum d'âne à 3% et dans du PBST (voir Tableau 5). Enfin, les tranches sont lavées et montées sur des lames avec du Mowiol.

Expérience	Anticorps
Injection d'AAV-FLEX(tdTomato) à E13.5, analyse à E18.5	- chèvre anti-mCherry (1:500, Sicgen, ref : AB0040) - poulet anti-GFP (1:500) - âne anti-chèvre Cy3 (1:400, Jackson ImmunoResearch, 705-165-147) - âne anti-poulet A488 (1:400, Jackson ImmunoResearch,)
Injection d'AAV-FLEX(tdTomato) à E13.5, analyse à P30 Injection de AAV- TetOn-FLEX(mCherry)	- chèvre anti-mCherry (1:500 ; Sicgen, ref : AB0040) - âne anti-chèvre Cy3 (1:400, Jackson ImmunoResearch, 705-165-147)
Injection de LV-shNT-PGK-EGFP	- poulet anti-GFP (1:500) - âne anti-poulet A488 (1:400, Jackson ImmunoResearch,)
Injection de LV-FLEX(mCherry) ou de LV-FLEX(KCC2-Flag-P2A-mCherry), analyse à différents temps embryonnaires, à P15 et à P30	- chèvre anti-mCherry (1:500, Sicgen, ref : AB0040) - lapin anti-p73 (1:500, Abcam, ref : AB40658) - âne anti-chèvre Cy3 (1:400, Jackson ImmunoResearch, 705-165-147) - âne anti-lapin A488 (1:400, Jackson ImmunoResearch, 711-545-152)

Tableau 5 : Anticorps utilisés lors des expériences d'immunohistochimie.

Acquisition et analyse d'images

Les images de la majorité des expériences (voir paragraphe suivant) ont été acquises avec un microscope confocal Leica SP5 doté d'un objectif 10X et en utilisant le logiciel LAS AF. J'ai réalisé une série d'images en Z sur toute l'épaisseur des tranches avec un pas de 3 µm. La puissance de chaque laser ainsi que le gain associé ont été déterminés pour chaque fluorophore sur la base de l'échantillon le plus fluorescent afin d'éviter la saturation, et ont été maintenus constants entre les échantillons.

Les images correspondant à l'ensemble des expériences d'infection avec le virus LV-FLEX(mCherry) ou le virus LV-FLEX(KCC2-Flag-P2A-mCherry) ont été acquises avec un microscope à épifluorescence à champ large Zeiss Apotome doté d'un objectif 10X et d'une caméra Hamamatsu ORCA Flash4.0 LT+ (ICM.Quant, RRID:SCR_026393). J'ai réalisé une série d'images en Z sur toute l'épaisseur des tranches avec un pas de 3.45 µm. Le temps d'exposition a été déterminé pour chaque canal sur la base de l'échantillon le plus fluorescent afin d'éviter la saturation, et a été maintenu constant entre les échantillons. L'apotome est une technologie basée sur la projection d'une grille qui génère un modèle de variation d'intensité de la fluorescence au niveau du plan focal. Le microscope prend plusieurs images qui correspondent à un même plan focal, avec un décalage de la grille entre chacune d'entre elles ce qui entraine une modulation différente du signal entre les images. Un algorithme analyse ensuite la variation de la fluorescence entre les différentes images d'un plan focal donné. Il génère une nouvelle image en gardant les signaux fortement modulés (signaux du plan focal) et en éliminant les signaux peu modulés (signaux hors plan focal). Ainsi, l'apotome permet de réduire le bruit de fond issu de la lumière diffusée hors champ.

J'ai réalisé la projection maximale des images sur ImageJ. Le comptage des cellules a été fait sur QuPath-0.6.0. Une région d'intérêt incluant l'ensemble des neurones Cajal-Retzius hippocampiques a été dessinée et les cellules positives pour p73 ont été détectées en utilisant le module « *Cell detection* ». Parmi les cellules positives pour p73, celles qui expriment aussi la mCherry ont été détectées par le biais du module « *Create single measurement classifier* », et en appliquant un seuil défini par l'utilisateur.

Culture et infection des cellules HEK-293

Les cellules HEK-293 (LCG ATCC-CRL-11268) ont été maintenues dans un milieu DMEM riche en glucose (4.5 g) supplémenté en GlutaMAX et en pyruvate (Gibco). Avant la culture, le milieu a été additionnellement supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (Gibco) et 0.2% de pénicilline/streptomycine (Gibco). Un jour avant la transduction virale, les cellules sont mises en culture à une densité de 200 000 cellules/puits dans des plaques de six puits. Avant l'ajout des virus, la moitié du milieu est retirée des puits et stockée à 4°C. Les puits sont

subdivisés entre les différentes conditions : LV-FLEX(mCherry), LV-FLEX(KCC2-P2A-mCherry), AAV1-CMV-eGFP-Cre + LV-FLEX(mCherry), AAV1-CMV-eGFP-Cre + LV-FLEX(KCC2-P2A-mCherry). Le virus AAV1-CMV-eGFP-Cre est ici utilisé comme un virus *helper* entrainant la recombinaison des sites Lox du génome des lentivirus et permettant l'expression de la mCherry ainsi que de KCC2. Les cellules sont infectées avec les différentes combinaisons de virus (10^6 TU de lentivirus et 10^4 gc d'AAV par puits) diluées dans 1 ml de milieu conditionné. Les cellules sont incubées dans la solution virale sur la nuit à 37°C avec 5% de CO_2, puis le milieu viral est intégralement remplacé par le milieu conditionné précédemment recueilli. Les protéines sont extraites 72 h après la transduction.

Western blot

Les cellules HEK-293 sont lavées avec du PBS 1X à 4°C à deux reprises. Le PBS 1X est ensuite retiré et 150 µl de RIPA (voir composition dans la partie I du Matériel et méthodes) est ajouté dans chaque puits. Les cellules sont détachées manuellement du fond des puits, les lysats sont transférés dans des tubes et incubés sur une roue tournante pendant 30 min à 4°C. Les échantillons sont ensuite centrifugés et le surnageant, qui contient les protéines, est récupéré. Les Western blots sont réalisés comme décrit dans la partie I du Matériel et méthodes. Les anticorps primaires utilisés sont les suivants : anticorps de cochon d'inde anti-mCherry (1:1000), de lapin anti-GAPDH (1:2000, Invitrogen) et de lapin anti-panKCC2 (1:1000, Upstate) ou de souris anti-Flag M2 (1:1000, Sigma-Aldrich). Les anticorps secondaires utilisés sont : anticorps de chèvre anti-cochon d'inde 700 (1:2000, LI-COR), de chèvre anti-lapin 800 (1:5000, LI-COR) et de chèvre anti-souris 800 (1:5000, LI-COR).

Résultats

Article principal : Contrôle différentiel de la fonction de KCC2 par KCC2a au cours de la maturation des neurones corticaux

Préface

Le gène *Slc12a5* code pour deux isoformes principales, KCC2a et KCC2b, qui diffèrent par leur domaine N-terminal, respectivement constitué de 40 et 17 acides aminés (Uvarov et al., 2007). Ces deux isoformes présentent une expression protéique relativement similaire dans les différentes structures du cerveau embryonnaire (Markkanen et al., 2014; Uvarov et al., 2009). Néanmoins, seul le promoteur de KCC2b est sous le contrôle de nombreux facteurs de transcription, dont Egr4 qui semble impliqué dans l'augmentation développementale de l'expression du transporteur (Uvarov et al., 2005, 2006). Cela résulte en une forte augmentation globale de l'expression de KCC2b lors des deux premières semaines après la naissance chez la souris, tandis que l'expression de KCC2a reste relativement stable embryonnaire (Uvarov et al., 2007, 2009). Chez l'adulte, KCC2a représente 8% de l'expression de KCC2 dans le néocortex, 10% dans l'hippocampe et 18% dans le tronc cérébral et la moelle épinière (Uvarov et al., 2009). Différentes études ont démontré que KCC2a a la capacité d'exporter les ions chlorure des neurones (Ludwig et al., 2017; Markkanen et al., 2017; Uvarov et al., 2007), ce qui lui confère un rôle important dans les structures cérébrales où elle est fortement exprimée lors de la période périnatale. L'isoforme est notamment impliquée dans la régulation du rythme respiratoire par le pont et le nerf hypoglosse lors des premiers jours après la naissance (Dubois et al., 2018).

Compte tenu de sa faible abondance, nous pourrions nous attendre à ce que la contribution de KCC2a au transport de chlorure soit négligeable dans les structures où elle est largement minoritaire, telles que le néocortex ou l'hippocampe, et l'existence d'une fonction spécifique à cette isoforme dans ces régions n'a jamais été étudiée en détail. Plusieurs observations suggèrent néanmoins que KCC2a pourrait jouer un rôle dans ces structures. Des patientes atteintes du syndrome de Rett, une maladie neurologique particulièrement grave caractérisée par une déficience intellectuelle sévère, présentent une altération de l'expression transcriptionnelle de KCC2a mais pas de KCC2b (Hinz et al., 2019). De plus, la perte d'expression de KCC2a chez le poisson-zèbre semble provoquer une altération des performances cognitives et sociales des animaux (Naderi et al., 2024). Il faut toutefois noter que *kcc2a* est codé chez cette espèce par le gène (*slc12a5a*) qui est un paralogue du gène codant *kcc2b* (*slc12a5b*). Il ne s'agit donc pas de l'isoforme homologue de KCC2a des

Mammifères. Ces deux études suggèrent que l'isoforme minoritaire de KCC2 pourrait effectivement exercer une fonction importante dans les structures cérébrales associées à la cognition, sans toutefois identifier le mécanisme sous-jacent ; l'une comme l'autre manque en outre de contrôles importants.

J'ai donc souhaité, au cours de ma thèse, déterminer si KCC2a possède une fonction spécifique dans le néocortex et l'hippocampe et analyser les mécanismes moléculaires sur lesquels reposerait sa fonction. Afin d'étudier le rôle de KCC2a dans l'hippocampe, j'ai commencé par analyser l'expression transcriptionnelle et la répartition des isoformes de KCC2 dans des neurones hippocampiques en culture, qui ont été notre modèle d'étude principal au cours de ce projet. J'ai notamment observé que KCC2a est enrichie dans les dendrites secondaires ainsi que dans les agrégats membranaires de KCC2.
Nous avons ensuite voulu déterminer l'effet de la suppression de KCC2a sur les neurones en culture. Pauline Weinzettl, qui a réalisé un stage Erasmus+ dans l'équipe, a développé et testé des ARNs interférents contre cette isoforme. La transfection des neurones avec ces derniers nous a permis de mettre en évidence que KCC2a stabilise l'expression protéique et membranaire de KCC2b dans les neurones matures. Nous avons aussi observé que la perte d'expression de KCC2a provoque une diminution de la capacité des neurones à exporter le chlorure, démontrant l'importance de la stabilisation de KCC2b par KCC2a dans le maintien de sa fonction canonique.
J'ai ensuite appliqué différents traitements pharmacologiques sur les neurones déplétés pour KCC2a ainsi que sur les contrôles correspondants afin d'élucider le mécanisme de régulation de KCC2b par KCC2a. Cela m'a permis de mettre en évidence que KCC2a inhibe la poly-ubiquitination de KCC2b ainsi que son endocytose et sa dégradation par le protéasome.
Enfin, j'ai étudié la fonction de KCC2a dans les neurones immatures en réalisant des Western blots sur des extraits protéiques issus de cerveaux de souris délétées pour KCC2a. J'ai mis en évidence qu'en conditions physiologiques KCC2a est essentielle pour la phosphorylation de SPAK et de KCC2 par la voie WNK-SPAK lors du développement, mais pas chez l'adulte. Néanmoins, la surexpression d'une protéine WNK1 constitutivement active dans des neurones en culture m'a permis d'observer que KCC2a est nécessaire pour la régulation de l'expression membranaire de KCC2 par cette voie lorsque celle-ci est réactivée dans des neurones matures.

Article

TRANSPARENT PROCESS OPEN ACCESS CHECK FOR UPDATES

EMBO reports

Differential isoform-specific control of KCC2 function in developing and mature cortical neurons

Carla Pagan [1,2], Pauline Weinzettl [1], Marika A Markkanen[3], Marion Russeau[1], Matti S Airaksinen [3] & Jean-Christophe Poncer [1,2]✉

Abstract

The K-Cl cotransporter KCC2 is essential for fast synaptic inhibition in the mature brain. It is encoded by a single gene and expressed as two isoforms: KCC2a and KCC2b, which differ in their N-terminal domains. While KCC2b is predominant, the function of the weakly expressed KCC2a isoform remains unclear. Here, we reveal that KCC2a is a potent, bidirectional regulator of KCC2b membrane stability and function in cortical neurons. In immature neurons, where WNK-SPAK kinase activity is high, KCC2a promotes SPAK-dependent phosphorylation of KCC2b at Thr1007, which likely contributes to hindering its membrane expression and function. Conversely, in mature neurons with low basal WNK-SPAK activity, KCC2a promotes KCC2b expression, clustering, and function. At this stage, although accounting for less than 5% of total KCC2 mRNA, KCC2a is enriched in dendrites and within KCC2 clusters, where it prevents clathrin-mediated KCC2b endocytosis, as well as polyubiquitination and proteasomal degradation. Thus, KCC2a acts as a developmental switch that first inhibits KCC2b during early development and then ensures its membrane stability to support effective synaptic inhibition in the adult brain.

Subject Category Neuroscience
https://doi.org/10.1038/s44319-026-00920-3
Received 22 January 2026; Revised 19 August 2026;
Accepted 24 August 2026
Published online: 05 September 2026

Introduction

The KCC2 neuronal K-Cl cotransporter, which is encoded by the *SLC12A5* gene, is essential for maintaining the low intracellular chloride concentration required for fast hyperpolarizing synaptic responses mediated by inhibitory neurotransmitters, such as gamma-aminobutyric acid (GABA) and glycine, in the mature central nervous system. Upregulation of KCC2 expression is a hallmark of neuronal maturation (Rivera et al, 1999; Virtanen et al, 2021), mediating the developmental shift in GABAergic signaling from depolarizing to hyperpolarizing (Ben-Ari, 2002). Due to its pivotal role in chloride homeostasis and GABA signaling, KCC2 dysfunction has been associated with many neurological and psychiatric disorders (Kaila et al, 2014), including epilepsy (Donneger et al, 2026; Huberfeld et al, 2007), neuropathic pain (Coull et al, 2003), and Alzheimer's disease (Keramidis et al, 2023).

The *SLC12A5* gene generates two full-length protein isoforms, KCC2a and KCC2b, via alternative promoters and splicing (Uvarov et al, 2007). These isoforms only differ in their unique N-terminal sequences. Whereas the fundamental role of KCC2b in chloride transport is well-established and primarily drives the developmental switch in GABA signaling in cortical neurons (Rivera et al, 1999; Uvarov et al, 2009), the regulatory profile and physiological function of KCC2a remain elusive.

Genetic studies suggest a critical and transient role of the KCC2a isoform, particularly in the early stages of postnatal development. Complete genetic ablation of *Slc12a5* in mice results in death at birth due to severe motor deficits (Hübner et al, 2001). However, mice lacking only KCC2b (while retaining KCC2a) survive for 2–3 weeks, suggesting that KCC2a expression alone is sufficient to support vital functions during the immediate postnatal period (Woo et al, 2002). Conversely, KCC2a-deficient mice exhibit transient respiratory anomalies at birth, including low breathing rates and apneas, resulting from abnormally strong inhibition from the pons (Dubois et al, 2018). This functional divergence is mirrored by the distinct developmental expression patterns of KCC2 isoforms. KCC2a accounts for a substantial fraction (50–65%) of total KCC2 RNA in the cortex, brainstem, and spinal cord on embryonic day 17 (Uvarov et al, 2007; Uvarov et al, 2009). However, its relative contribution decreases drastically in the adult forebrain, where KCC2b becomes the predominant isoform (> 90%) (Markkanen et al, 2014; Uvarov et al, 2007). Therefore, the differential regulation and developmental switch of KCC2 isoforms appear critical for circuit function, especially during the perinatal period.

Both KCC2a and KCC2b were shown to function as K-Cl cotransporters (Markkanen et al, 2017; Uvarov et al, 2007) and interact to form heterodimers in both heterologous cells and rat neurons (Uvarov et al, 2009). However, their distinct N-terminal sequences dictate different regulatory mechanisms, enabling the fine-tuning of K-Cl transport activity. In particular, the N-terminus of KCC2a, but not KCC2b, contains a conserved (RFxV/I) binding motif for the Ste20-related proline-alanine-rich kinase (SPAK)

[1]Institut du Fer à Moulin, Inserm, Sorbonne Université, Paris, France. [2]Paris Brain Institute, AP-HP, CNRS, Inserm, Sorbonne Université, Paris, France. [3]Department of Anatomy, Faculty of Medicine, University of Helsinki, Helsinki, Finland. ✉E-mail: j-c.poncer@icm-institute.org

© The Author(s)

(Uvarov et al, 2009), an effector of the WNK (with-no-lysine) kinase pathway known to regulate cation-chloride cotransporters (Friedel et al, 2015; Heubl et al, 2017). Activation of the WNK-SPAK pathway results in the phosphorylation of KCC2b at Thr1007, leading to a subsequent decrease in membrane stability and chloride extrusion function (Friedel et al, 2015; Heubl et al, 2017). In heterologous cells, SPAK was found to co-immunoprecipitate specifically with recombinant KCC2a, but not with KCC2b (Markkanen et al, 2017). Functionally, the overexpression of SPAK significantly decreased the transport activity of KCC2a, yet it had no inhibitory effect on KCC2b in the absence of KCC2a (Markkanen et al, 2017). These results suggest that KCC2a may be essential for the inhibitory regulation of KCC2b by the WNK-SPAK signaling pathway.

Taken together, these data suggest that the N-terminal heterogeneity of KCC2 isoforms provides a mechanism for distinct regulation and developmental expression patterns. However, it remains unknown whether KCC2a maintains a key role in KCC2 function in the adult brain despite its low expression levels. If so, this isoform could be a prime target for new KCC2-modulating therapeutic compounds (Donneger et al, 2026). Here, we investigated the age-dependent function of KCC2a in hippocampal and neocortical neurons. In primary hippocampal cultures, we found that endogenous KCC2a is enriched within dendritic KCC2 clusters, likely promoting its interaction with KCC2b. Knockdown of KCC2a in mature neurons revealed that KCC2a stabilizes KCC2b protein levels and expression at the cell membrane by preventing endocytosis and proteasomal degradation. Using KCC2a knockout mice, we demonstrated that this stabilizing function only prevails in mature neurons with low WNK-SPAK activity. In contrast, in immature neurons with high WNK-SPAK activity, KCC2a acts oppositely by promoting the phosphorylation of KCC2b at Thr1007, thereby reducing its membrane expression. This effect is associated with increased WNK1-mediated SPAK phosphorylation at Ser383. This suggests that KCC2a may recruit a functional protein unit, which includes both KCC2b and SPAK, to regulate chloride transport in dendrites. Taken together, our results reveal a novel mechanism by which KCC2a acts as a context-dependent regulator of KCC2b. Despite its weak expression in mature neurons, KCC2a transitions from a negative regulator to a stabilizing partner of KCC2b in response to developmental shifts in WNK-SPAK signaling.

Results

KCC2 isoform expression and subcellular localization in mature cortical neurons

First, we characterized and compared the expression of the two KCC2 isoforms, KCC2a and KCC2b, in maturing rat hippocampal neurons in vitro and in ex vivo samples from rat hippocampus and cortex. In both in vitro (from 7 to 24 DIV) and ex vivo (hippocampus and cortex from E18.5 and adult) samples, KCC2a mRNA levels remained stable throughout maturation (Fig. 1A–C). In contrast, KCC2b expression increased significantly by ≈12-fold in the hippocampus and cortex and by ≈1.5-fold in vitro between 7 and 24 DIV (Fig. 1B,C). This differential regulation resulted in a marked decrease in the KCC2a/KCC2b mRNA ratio both ex vivo and in vitro (Fig. 1B,C). These results confirm that primary hippocampal cultures recapitulate the dynamic developmental shift in KCC2 expression, with KCC2a accounting for less than 5% of total KCC2 mRNA expression in mature neurons.

Previous work in adult mouse brain suggested KCC2a may be preferentially enriched in distal dendrites compared to KCC2b (Markkanen et al, 2014). We therefore compared the subcellular localization of KCC2a and KCC2b in mature (24 DIV) hippocampal neurons using a panKCC2 antibody (recognizing both isoforms) and a KCC2a-specific antibody (Uvarov et al, 2009) (Fig. EV1). PanKCC2 immunostaining was 20% stronger in primary dendrites compared to the soma ($P < 1.10^{-15}$; Fig. 1D,E). In addition, the KCC2a/panKCC2 fluorescence ratio was significantly increased in secondary dendrites compared to the soma ($P = 0.030$; Fig. 1E), demonstrating that KCC2a is relatively enriched in dendrites compared to KCC2b. As previously demonstrated (Al Awabdh et al, 2022; Chamma et al, 2013; Gauvain et al, 2011), KCC2 immunostaining exhibited heterogeneity, with clusters present in both the soma and dendrites of hippocampal neurons. Notably, a greater fraction of KCC2a immunofluorescence was found within clusters compared to panKCC2 ($P = 1.10^{-9}$; Fig. 1F). Colocalization analysis showed that more than 70% of KCC2 clusters contain the KCC2a isoform (Fig. 1F). However, KCC2a-immunoreactivity was notably absent from dendritic spines (Fig. 1G), where KCC2 has been shown to form large clusters implicated in non-canonical, ion transport-independent functions (Gauvain et al, 2011). These results are consistent with an enrichment of KCC2a within subcellular domains critical for Cl^- extrusion and GABA signaling in mature hippocampal neurons (Raimondo et al, 2012).

KCC2a controls KCC2b stability and function in mature hippocampal neurons

Despite its low expression levels, our data suggest that KCC2a may be optimally positioned to regulate chloride transport in mature hippocampal neurons. To evaluate the localization of each KCC2 isoform at the plasma membrane, we expressed recombinant KCC2a and KCC2b with a 3xFlag tag in their second extracellular loop, thereafter referred to as KCC2-Flag (Chamma et al, 2013; Fig. 2A,B). This enabled us to specifically detect KCC2 membrane pools using live immunostaining (Fig. 2A–C). The recombinant proteins showed no significant difference in total expression ($P = 0.206$; Fig. 2D). However, the relative membrane expression of recombinant KCC2a was slightly but significantly lower than that of KCC2b ($P = 0.010$; Fig. 2D), consistent with prior studies (Markkanen et al, 2014). These results suggest that, despite a small difference in membrane enrichment the overexpressed isoforms have similar inherent stability.

To investigate the functional role of KCC2a in hippocampal neurons, we performed an isoform-specific knockdown using a combination of two shRNAs (shKCC2a_1 + 3). In HEK-293 cells expressing either recombinant KCC2a or KCC2b, these shRNAs specifically reduced KCC2a expression within 48 h, with no significant effect on KCC2b (Fig. EV2). In hippocampal neurons, chronic KCC2a knockdown (from DIV15) with the two shRNAs reduced recombinant KCC2a expression by over 60% ($P = 1.10^{-9}$; Fig. 2E,F) and endogenous KCC2a levels by 25% ($P = 4.10^{-5}$; Fig. EV2). We note, however, that this reduction was variable

 © The Author(s)

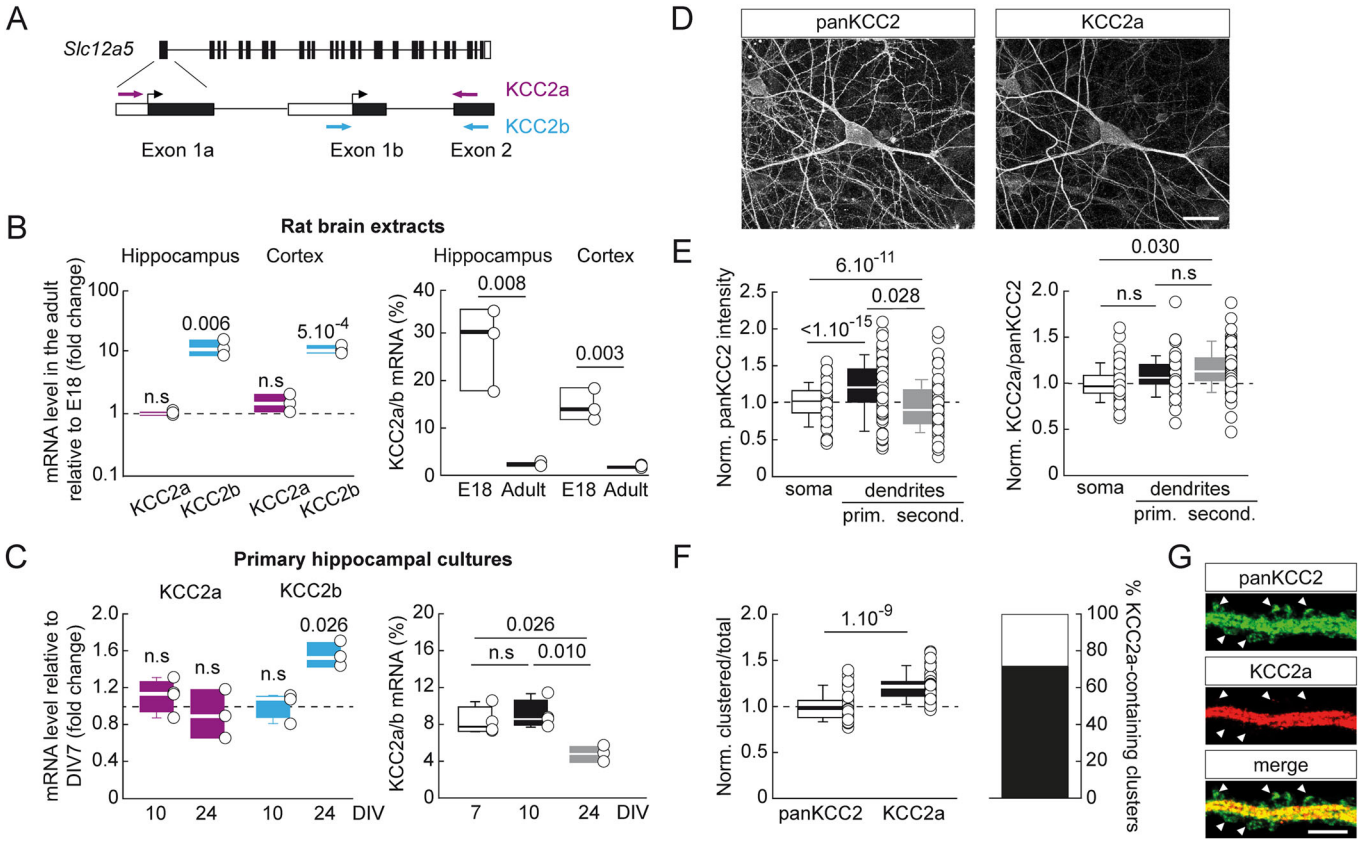


Figure 1. Expression pattern of KCC2 isoforms in rat hippocampal and cortical neurons.

(A) Schematic representation of the complementary sequences of KCC2a- and KCC2b-specific primers. **(B)** Summary boxplots showing the quantitative real-time PCR analysis of KCC2a and KCC2b mRNA expression in the hippocampus and cortex of E18 and adult rats. Left: Isoform-specific mRNA expression relative to Ywhaz in adults, normalized to expression at E18. Right: KCC2a/KCC2b mRNA ratio in E18 embryos and in adults. $n = 3$ animals/age and 3 technical replicates. Two-tailed unpaired *t* test. Box plots show the median (centre line) and the 25th and 75th percentiles (box bounds); with $n = 3$, no whiskers are displayed. **(C)** Same as **(B)** in primary hippocampal cultures. Left: Isoform-specific mRNA expression relative to Ywhaz, normalized by expression at DIV7, one-way Kruskal–Wallis rank-sum test and Dunn's post-hoc test. Right: KCC2a/KCC2b mRNA ratio as a function of time in vitro, one-way ANOVA and Tukey post-hoc test. $n = 3$–4 cultures and three technical replicates. Box plots show the median (centre line) and the 25th and 75th percentiles (box bounds); whiskers, displayed only for datasets with $n = 4$, extend to the minimum and maximum values. **(D)** Representative confocal maximum projection images of hippocampal pyramidal neurons immunostained with panKCC2 and KCC2a-specific antibodies. Scale: 25 µm. **(E)** Summary boxplots showing the intensity of panKCC2 immunofluorescence (left, one-way Kruskal–Wallis rank-sum test and Dunn's post-hoc test) and the ratio of KCC2a to panKCC2 immunofluorescence (right, one-way ANOVA and Tukey post-hoc test), along primary (prim.) and secondary (second.) dendrites, normalized to the soma. $n = 58$ neurons from 2 cultures. **(F)** Left: summary boxplots showing the ratio of immunofluorescence intensity within clusters to total intensity in dendritic sections, for panKCC2 or KCC2a immunostainings, normalized to that of panKCC2. $n = 46$ neurons from 2 cultures, Mann–Whitney rank-sum test. Right: bar plot showing the percentage of panKCC2 clusters colocalizing (black) or not (white) with KCC2a-immunostained clusters. **(G)** Representative confocal images of a dendritic section immunostained with panKCC2 (green) and KCC2a (red) antibodies. Note the complete and specific lack of KCC2a immunostaining in dendritic spines (arrowheads). Scale: 5 µm. **(E, F,** left) Box plots show the median (centre line), the 25th and 75th percentiles (box bounds) and the 10th and 90th percentiles (whiskers); all individual data points, including minima and maxima, are displayed alongside the box (see "Methods"). *P* values are provided on the graphs.

across the five independent hippocampal cultures examined (range: +17% to −76%), likely reflecting the limited sensitivity of the immunostaining assay for this low-abundance isoform.

Surprisingly, despite KCC2a accounting for approximately 5% of total KCC2 mRNA, its suppression resulted in a 28% decrease in the total level of endogenous KCC2 protein ($P = 2.10^{-4}$; Fig. 3A–C). This effect was accompanied by a significant decrease in the density of KCC2 clusters, as well as in their mean area and intensity ($P \leq 0.002$ for all; Fig. 3D). We also examined whether KCC2a knockdown affects the density and morphology of dendritic spines in hippocampal neurons. We compared the spine density per surface area and the proportion of the four spine types—stubby, mushroom, long, and filopodia—between the shNT and shKCC2a conditions. No statistically significant differences in the density ($P = 0.386$) or in the proportion of each spine type (stubby: $P = 0.326$, mushroom: $P = 0.801$, long: $P = 0.741$, and filopodia: $P = 0.624$) were observed between conditions (Fig. EV3).

These results suggested that KCC2a controls the expression of KCC2b in mature hippocampal neurons. To test this hypothesis, we measured recombinant KCC2b expression upon KCC2a knockdown (Fig. 3E–G). Consistent with its effects on endogenous KCC2, KCC2a knockdown reduced the expression of recombinant KCC2b as well as its relative membrane enrichment by 20% and 30%, respectively ($P = 0.010$ and $P = 6.10^{-5}$; Fig. 3F). This reduction was accompanied by a significant decrease in KCC2b cluster density, area, and fluorescence intensity ($P \leq 0.003$ for all; Fig. 3G). Together, these data demonstrate that KCC2a exerts strong, non-stoichiometric control over KCC2b protein expression, membrane availability, and clustering.

© The Author(s)

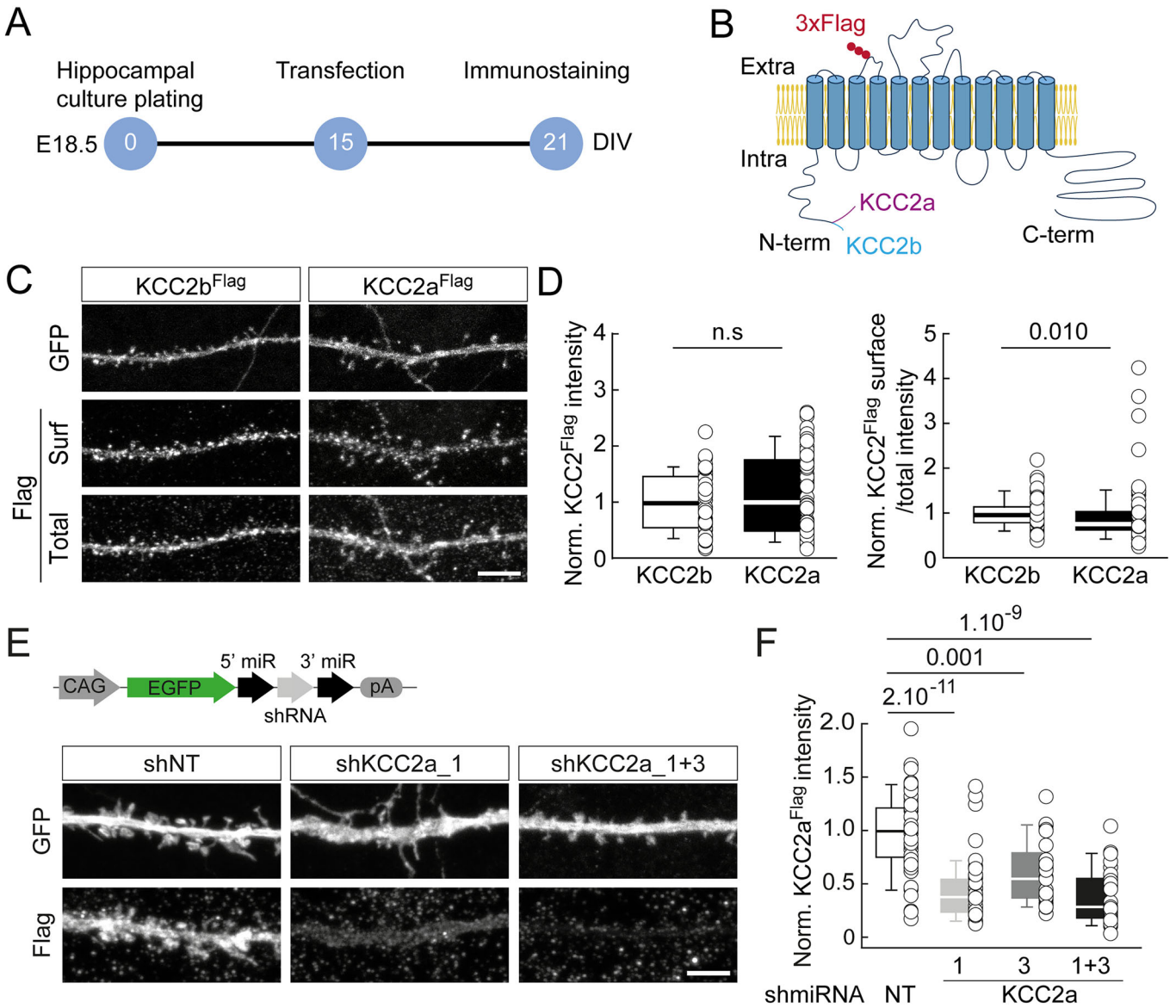
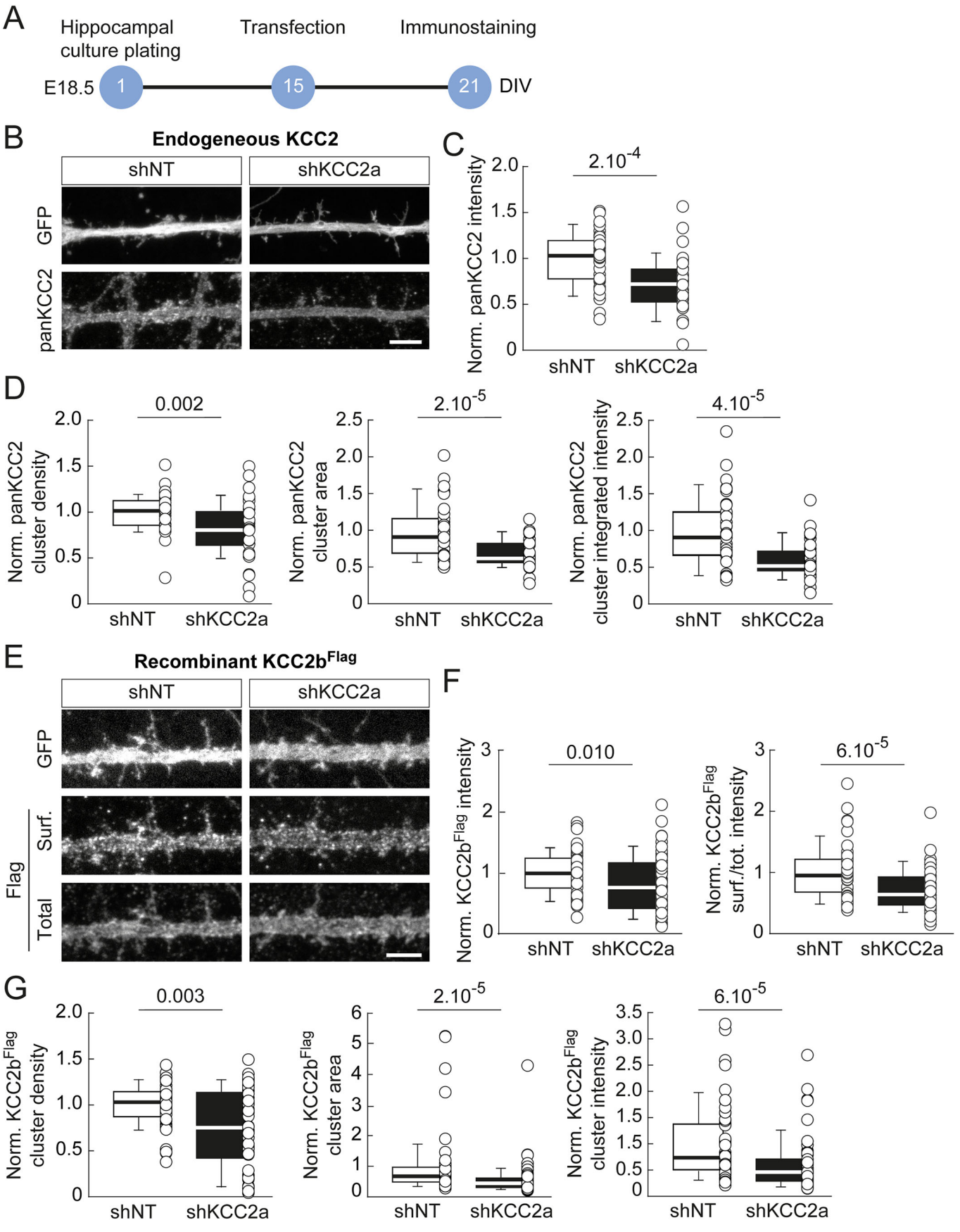


Figure 2. KCC2a-specific knockdown by RNA interference in mature hippocampal neurons.

(**A**) Experiment timeline. (**B**) Schematic structure of the recombinant KCC2a-Flag and KCC2b-Flag proteins. (**C**) Representative confocal maximum projection images of dendritic sections of hippocampal neurons transfected with plasmids encoding for GFP and either KCC2b-Flag or KCC2a-Flag. Neurons were immunostained for plasmalemmal and total Flag (see "Methods") as well as GFP. Scale: 5 µm. (**D**) Summary boxplots showing the immunofluorescence intensity of recombinant KCC2-Flag isoforms (left) and the ratio of membrane-inserted (surf.) to the total (total) KCC2-Flag immunofluorescence intensity normalized to that of KCC2b-Flag (right). KCC2b, $n = 58$; KCC2a, $n = 65$ cells from five independent cultures. Mann–Whitney rank-sum tests. (**E**) Top: Design of the plasmids encoding the shRNAs targeting KCC2a. Bottom: Representative confocal maximum projection images of dendritic sections of neurons transfected with plasmids encoding either for a control scrambled shRNA (shNT) or KCC2a-specific shRNAs (shKCC2a_1 and shKCC2a_3), as well as a plasmid encoding recombinant KCC2a-Flag. Neurons were immunostained for Flag and GFP. Scale: 5 µm. (**F**) Summary boxplot showing the immunofluorescence intensity of recombinant KCC2a-Flag, normalized to shNT. shNT, $n = 53$; shKCC2a_1, $n = 50$; shKCC2a_3, $n = 25$; shKCC2a1 + 3, $n = 27$ cells; from 4 (shNT and shKCC2a_1) or 2 (shKCC2a_3 and shKCC2a_1 + 3) independent cultures. One-way Kruskal–Wallis rank-sum test and Dunn's post-hoc test. Box plots show the median (centre line), the 25th and 75th percentiles (box bounds) and the 10th and 90th percentiles (whiskers); all individual data points, including minima and maxima, are displayed alongside the box (see "Methods"). *P* values are provided on the graphs.

Since membrane stability and clustering are essential for KCC2 ion transport function (Chamma et al, 2012; Chamma et al, 2013; Côme et al, 2019), we investigated whether KCC2a regulates transmembrane chloride transport in hippocampal neurons. We assessed neuronal chloride extrusion efficiency by measuring the difference in the $GABA_A$ R reversal potential (E_{GABA}) between the soma and the dendrite (ΔE_{GABA}) (Al Awabdh et al, 2022; Gauvain et al, 2011; Khirug et al, 2008) (Fig. 4A–D). As expected, KCC2a knockdown did not significantly impact somatic E_{GABA} ($P = 0.755$; Fig. 4E). However, it resulted in a 41% decrease in ΔE_{GABA} (6.0±1.1 versus 3.2±0.7 mV/100 µm; $P = 0.030$; Fig. 4F), indicating a significant reduction in KCC2-mediated chloride export along dendrites. Taken together, our results demonstrate the unsuspected role of the minor KCC2a isoform in controlling both KCC2b

 © The Author(s)


A
Hippocampal culture plating
Transfection
Immunostaining
E18.5
1
15
21
DIV
B
Endogeneous KCC2
shNT
shKCC2a
GFP
panKCC2
C
Norm. panKCC2 intensity
2.10-4
shNT
shKCC2a
D
Norm. panKCC2 cluster density
0.002
Norm. panKCC2 cluster area
2.10-5
Norm. panKCC2 cluster integrated intensity
4.10-5
E
Recombinant KCC2bFlag
Flag
Surf.
Total
F
Norm. KCC2bFlag intensity
0.010
Norm. KCC2bFlag surf./tot. intensity
6.10-5
G
Norm. KCC2bFlag cluster density
0.003
Norm. KCC2bFlag cluster area
2.10-5
Norm. KCC2bFlag cluster intensity
6.10-5

© The Author(s)

Figure 3. Specific KCC2a knockdown reduces KCC2b protein expression, membrane expression, and clustering.

(A) Experiment timeline. **(B)** Representative confocal maximum projection images of dendritic sections of neurons transfected with plasmids encoding scrambled (shNT) or KCC2a-specific shRNAs (shKCC2a), immunostained for endogenous KCC2 and GFP. Scale: 5 µm. **(C)** Boxplot showing the intensity of endogenous KCC2 immunofluorescence in neurons transfected with shNT or shKCC2a_1 + 3. Two-tailed unpaired *t* test. **(D)** Boxplots showing the properties of endogenous panKCC2-immunopositive clusters. Left: cluster density/10 µm², middle: mean cluster surface, right: mean integrated intensity of cluster fluorescence. shNT, $n = 35$; shKCC2a, $n = 35$ cells, from three independent cultures. Mann–Whitney rank-sum tests. **(E)** Same as **(B)** with neurons expressing recombinant KCC2b-Flag and immunostained for Flag and GFP. Scale: 5 µm. **(F)** Boxplots showing the intensity of recombinant KCC2b-Flag immunofluorescence (left) and the ratio of plasmalemmal (surf.) to the overall (total) Flag immunofluorescence intensity (right). Mann–Whitney rank-sum tests. **(G)** Same as **(D)**, for neurons co-transfected with recombinant KCC2b-Flag and shRNA-expressing plasmids. shNT, $n = 53$; shKCC2a, $n = 54$ cells; from four independent cultures. Mann–Whitney rank-sum tests. All data are normalized to shNT. Box plots show the median (centre line), the 25th and 75th percentiles (box bounds) and the 10th and 90th percentiles (whiskers); all individual data points, including minima and maxima, are displayed alongside the box (see "Methods"). *P* values are provided on the graphs.

membrane expression and function in mature hippocampal neurons.

KCC2a stabilizes KCC2b by hindering clathrin-mediated endocytosis and proteasomal degradation

Next, we explored the molecular mechanisms by which KCC2a stabilizes KCC2b in hippocampal neurons. Previous studies have shown that KCC2b undergoes constitutive internalization via a dynamin- and clathrin-dependent pathway (Chamma et al, 2013; Friedel et al, 2017; Zhao et al, 2008). Therefore, we investigated the involvement of KCC2a in KCC2b endocytosis. To this end, we blocked clathrin-dependent endocytosis using a dynamin inhibitory peptide (DiP) (Kittler et al, 2000) for 40 min prior to and during the 20-min live staining (Fig. 5A–C). In neurons expressing a scrambled shRNA, dynamin inhibition resulted in a modest, though not significant, increase in recombinant KCC2b membrane expression ($P = 0.257$; Fig. 5C). However, KCC2a knockdown significantly decreased the relative membrane expression of recombinant KCC2b ($P = 0.042$; Fig. 5C). This reduction was fully reversed in KCC2a knocked-down neurons treated with DiP ($P = 0.257$ compared to shNT+DiP; Fig. 5C). These results demonstrate that KCC2a stabilizes KCC2b at the membrane by preventing its clathrin-mediated endocytosis.

KCC2 may be subject to recycling at the plasma membrane following endocytosis (Côme et al, 2019). Alternatively, it may undergo degradation through the lysosomal (Lee et al, 2010) or ubiquitin-proteasomal pathway (Hu et al, 2023). Next, we investigated whether KCC2a may be preventing KCC2 degradation, which could account for its reduced total expression upon KCC2a knockdown (Fig. 5D-E). Under basal conditions (scrambled shRNA), specifically blocking the proteasome with MG132 (2.5 µM) or polyubiquitination with PYR-41 (50 µM) for 2 h did not significantly reduce endogenous KCC2 expression ($P = 0.854$ and 0.410 respectively) (Fig. 5E). However, the decrease in endogenous KCC2 expression after KCC2a knockdown was fully abolished when either the proteasome or polyubiquitination was blocked ($P = 0.854$ for both, compared to shNT with the corresponding drug; Fig. 5E). These results suggest that KCC2a protects KCC2b from polyubiquitination and subsequent degradation by the proteasome, a degradation pathway that becomes engaged upon KCC2a loss. The effect of MG132, which also inhibits calpain at this concentration, suggests the proteasomal pathway is primarily involved, though a contribution from calpain inhibition cannot be fully excluded.

KCC2a couples KCC2b to the WNK-SPAK regulatory pathway

The expression and function of the plasmalemmal KCC2 pool are tightly regulated by various mechanisms, including protein-protein interactions, calpain-mediated cleavage, and the phosphorylation of key residues in its C-terminal domain (Côme et al, 2019; Hartmann and Nothwang, 2022; Kahle et al, 2013; Pressey et al, 2023). In particular, the WNK-SPAK kinase pathway modulates KCC2 membrane stability in a chloride-dependent manner through phosphorylation of its Thr1007 residue (Friedel et al, 2015; Heubl et al, 2017). KCC2a, but not KCC2b, was shown to contain a conserved binding motif for SPAK and co-immunoprecipitate with SPAK in heterologous cells (Uvarov et al, 2009). We therefore asked whether KCC2a is required for the WNK-SPAK-dependent modulation of KCC2b.

First, we examined protein extracts from the brains (excluding the brainstem) of KCC2a-knockout (KO) mice at postnatal day 9 (P9) (Markkanen et al, 2014), a developmental stage at which high WNK1-SPAK activity has been reported (Friedel et al, 2015). While the total level of KCC2 protein expression did not differ significantly from that of wild-type (WT) littermates ($P = 0.182$; Fig. 6A,B), KCC2a-KO mice exhibited a 62% decrease in KCC2 Thr1007 phosphorylation ($P = 2.10^{-5}$; Fig. 6A,B). This suggests that KCC2a may be necessary for KCC2 phosphorylation by SPAK. Interestingly, KCC2a-KO mice also showed a 43% decrease in SPAK Ser383 phosphorylation ($P = 0.023$; Fig. 6C,D), detected with an antibody against the conserved Ser373 site from the human SPAK protein, but no changes in WNK1 Ser382 phosphorylation (Fig. EV4). This suggests that KCC2a may promote WNK1-dependent SPAK phosphorylation in the immature brain without affecting WNK1 activity itself. By contrast, no changes in KCC2 or SPAK expression or phosphorylation were observed in the brains of adult KCC2a-KO mice, in which basal WNK1-SPAK pathway activity is low (Friedel et al, 2015; Heubl et al, 2017) ($P > 0.234$; Fig. 6E–H). Together, these data show that KCC2a regulates SPAK Ser383 and KCC2b Thr1007 phosphorylation only in the immature brain.

Next, we investigated whether this age-dependent effect was due to different levels of KCC2a expression or WNK-SPAK activity in immature versus adult brains. To explore this possibility, we examined the impact of KCC2a knockdown on WNK-SPAK-dependent regulation of KCC2b in mature neurons under chronic activation of the WNK-SPAK pathway. We used a TetOn system, which allows for precise temporal control, to overexpress a constitutively active WNK1 bearing the S382E mutation

 © The Author(s)

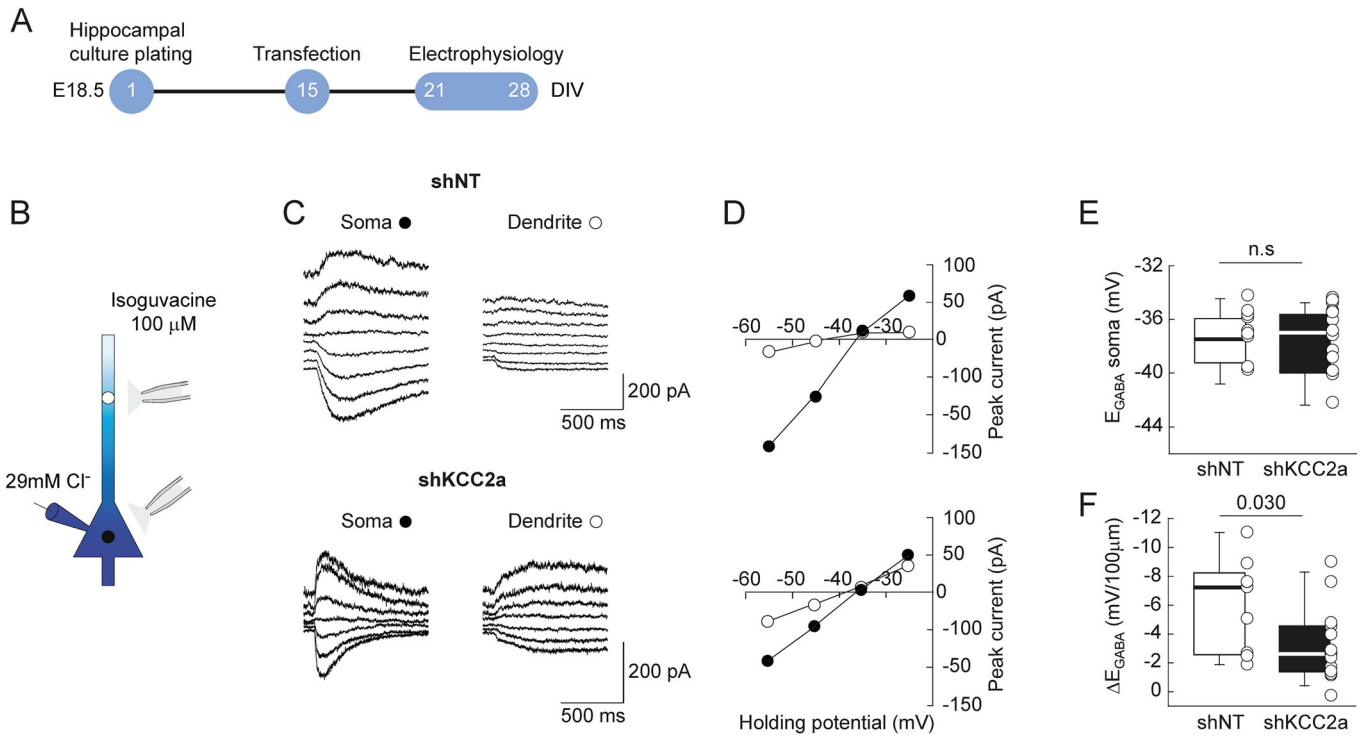


Figure 4. Specific KCC2a knockdown impairs chloride export in hippocampal neurons.

(A) Experiment timeline. **(B)** Schematic representation of the experiment. Isoguvacine (100 μM) was locally released onto the soma or dendrite of neuron in whole-cell patch-clamp configuration. The patch pipette was filled with a high-chloride (29 mM) intracellular solution. **(C)** Representative recordings of isoguvacine-evoked currents at varying potentials. Currents were evoked in neurons transfected with plasmids encoding either scrambled (shNT) or KCC2a-specific (shKCC2a) shRNAs. **(D)** I-V curves corresponding to traces shown in **(C)**. **(E, F)** Summary boxplots showing the reversal potential of isoguvacine-evoked currents at the soma (E_{GABA} soma, **E**) and the somato-dendritic E_{GABA} gradient (ΔE_{GABA}, **F**) in transfected neurons expressing either shNT or shKCC2a_1 + 3. shNT, $n = 9$; shKCC2a, $n = 14$ cells; from five independent cultures. Two-tailed unpaired *t* tests. Box plots show the median (centre line), the 25th and 75th percentiles (box bounds) and the 10th and 90th percentiles (whiskers); all individual data points, including minima and maxima, are displayed alongside the box (see "Methods"). *P* values are provided on the graphs.

(WNK1-CA) (Friedel et al, 2015; Inoue et al, 2012) for 24 h in mature hippocampal neurons in culture (Fig. 7A,B). In line with prior studies (Friedel et al, 2015; Heubl et al, 2017), we observed a 30% decrease in recombinant KCC2b membrane expression in mature neurons with intact KCC2a expression when WNK1-CA expression was induced by doxycycline ($P = 0.041$; Fig. 7C,D). In contrast, in KCC2a-knockdown neurons, the WNK1-CA-induced decrease in KCC2b-Flag membrane expression was abolished and even reversed, leading to a 55% increase in membrane expression ($P = 0.003$; Fig. 7E,F). This demonstrates that SPAK-dependent phosphorylation of KCC2b is tightly dependent on KCC2a, and that this effect is driven by WNK1 pathway activity rather than by the relative expression level of KCC2a.

Discussion

In this study, we reveal the critical and previously unsuspected role of the minor KCC2a isoform in regulating the expression, membrane stability, and function of the predominant KCC2b isoform in mature hippocampal neurons. Despite accounting for less than 5% of total KCC2 mRNA in these neurons, we demonstrate that KCC2a preferentially accumulates in dendritic KCC2 clusters and exerts powerful, age-dependent, and non-stoichiometric control over KCC2b. Suppressing KCC2a in mature hippocampal neurons significantly reduces total KCC2 protein levels and impairs dendritic chloride extrusion. Mechanistically, we demonstrate that KCC2a promotes KCC2b clustering and prevents its clathrin-mediated endocytosis and subsequent proteasomal degradation. Furthermore, we establish that KCC2a provides an essential link between KCC2 and the WNK-SPAK signaling pathway, promoting KCC2b Thr1007 phosphorylation when this cascade is active. Therefore, in immature neurons, KCC2a contributes to maintaining low KCC2b membrane expression. Together, these findings revise the current model of KCC2 regulation. They identify the minor KCC2a isoform as a master regulator that controls the stability and function of KCC2 as well as the formation of a WNK1-SPAK-KCC2 complex that gates WNK1-mediated control of KCC2 phosphorylation.

Consistent with previous studies (Markkanen et al, 2017; Uvarov et al, 2007), our results indicate that KCC2a accounts for a small fraction (< 5%) of total KCC2 transcripts in mature hippocampal neurons in vivo and in primary cultures. Although it is difficult to extrapolate transcript relative abundance to protein levels, western blot data support that KCC2a may represent a similar proportion of total KCC2 in the cortex and hippocampus (Markkanen et al, 2017; Uvarov et al, 2009). Therefore, our observations raise the question of how such a weakly expressed isoform may significantly impact the membrane stability and function of the total KCC2 pool. Our data suggest that this may, at least in part, reflect the preferential

© The Author(s)

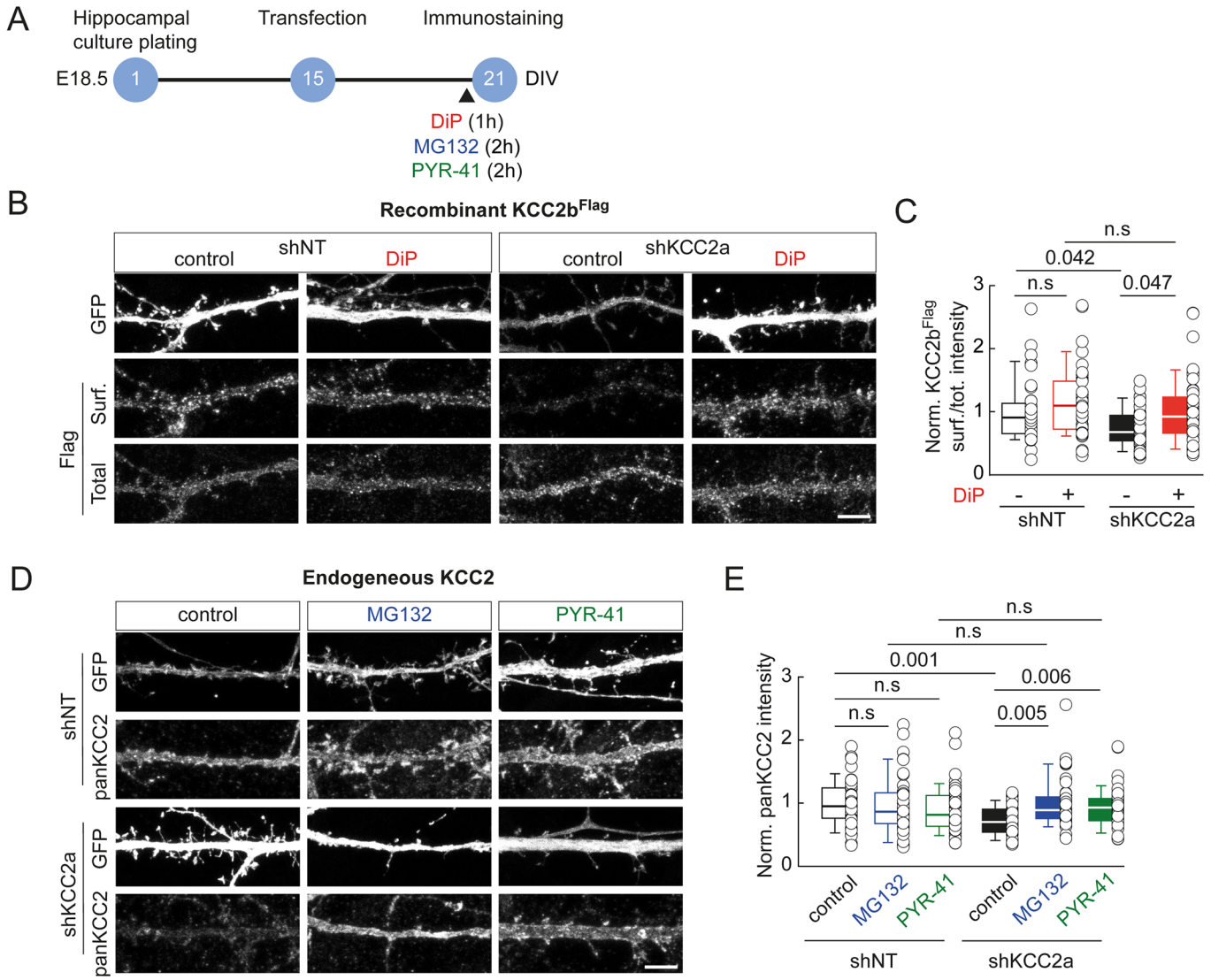


Figure 5. KCC2a prevents KCC2b endocytosis and degradation via the proteasomal pathway.

(A) Timeline of the experiments. **(B)** Representative confocal maximum projection images of dendritic sections of mature hippocampal neurons expressing scrambled (shNT) or KCC2a-specific (shKCC2a) shRNA, treated with a dynamin inhibitory peptide (DiP, 50 µM) 40 min before and during live Flag immunostaining. Scale: 5 µm. **(C)** Summary boxplot showing the ratio of plasmalemmal (surf.) to the overall (total) KCC2b-Flag immunofluorescence intensity, normalized to control shNT condition. shNT control, $n = 37$; shNT +DiP, $n = 39$; shKCC2a control, $n = 42$; shKCC2a +DiP, $n = 41$ cells, from four independent cultures. Mann–Whitney rank-sum tests, *P* value corrected for multiple comparisons using the Holm–Šídák method. **(D)** Representative confocal maximum projection images of dendritic sections of hippocampal neurons expressing scrambled (shNT) or KCC2a-specific shRNA. Two hours before immunostaining with a panKCC2 antibody, neurons were treated with either a proteasome blocker (MG132, 2.5 µM), an inhibitor of the ubiquitin-activating enzyme (PYR-41, 50 µM), or untreated (control). Scale: 5 µm. **(E)** Summary boxplot showing the intensity of endogenous KCC2 immunofluorescence in the different conditions, normalized to shNT control. shNT control, $n = 44$; shNT +MG132, $n = 38$; shNT +PYR41, $n = 43$; shKCC2a control, $n = 43$; shKCC2a + MG132, $n = 40$; shKCC2a + PYR41, $n = 44$ cells, from four independent cultures. Mann–Whitney rank-sum tests, *P* value corrected for multiple comparisons using the Holm–Šídák method. Box plots show the median (centre line), the 25th and 75th percentiles (box bounds) and the 10th and 90th percentiles (whiskers); all individual data points, including minima and maxima, are displayed alongside the box (see "Methods"). *P* values are provided on the graphs.

targeting of KCC2a to functional KCC2 clusters. While KCC2 is expressed throughout the somato-dendritic membrane and exhibits both a diffuse and a clustered distribution, several studies have shown that KCC2 clusters likely represent the most transport-active form of the protein (Al Awabdh et al, 2022; Chamma et al, 2013; Côme et al, 2019; Gauvain et al, 2011; Watanabe et al, 2009). Indeed, manipulations of KCC2 clustering result in changes in chloride export function, even with no change in the total plasmalemmal fraction (Al Awabdh et al, 2022; Watanabe et al, 2009). Despite a slightly lower plasmalemmal-to-total ratio of recombinant KCC2a compared to KCC2b (Fig. 2D), which is consistent with previous work (Markkanen et al, 2014), our data show that endogenous KCC2a is preferentially expressed in proximal and distal dendrites compared to KCC2b (Fig. 1E). Additionally, KCC2a displays an increased cluster-to-total ratio, and the vast majority (> 70%) of KCC2 clusters contain KCC2a (Fig. 1F). Thus, despite its low relative mRNA expression level, KCC2a subcellular expression pattern may be optimal for

 © The Author(s)

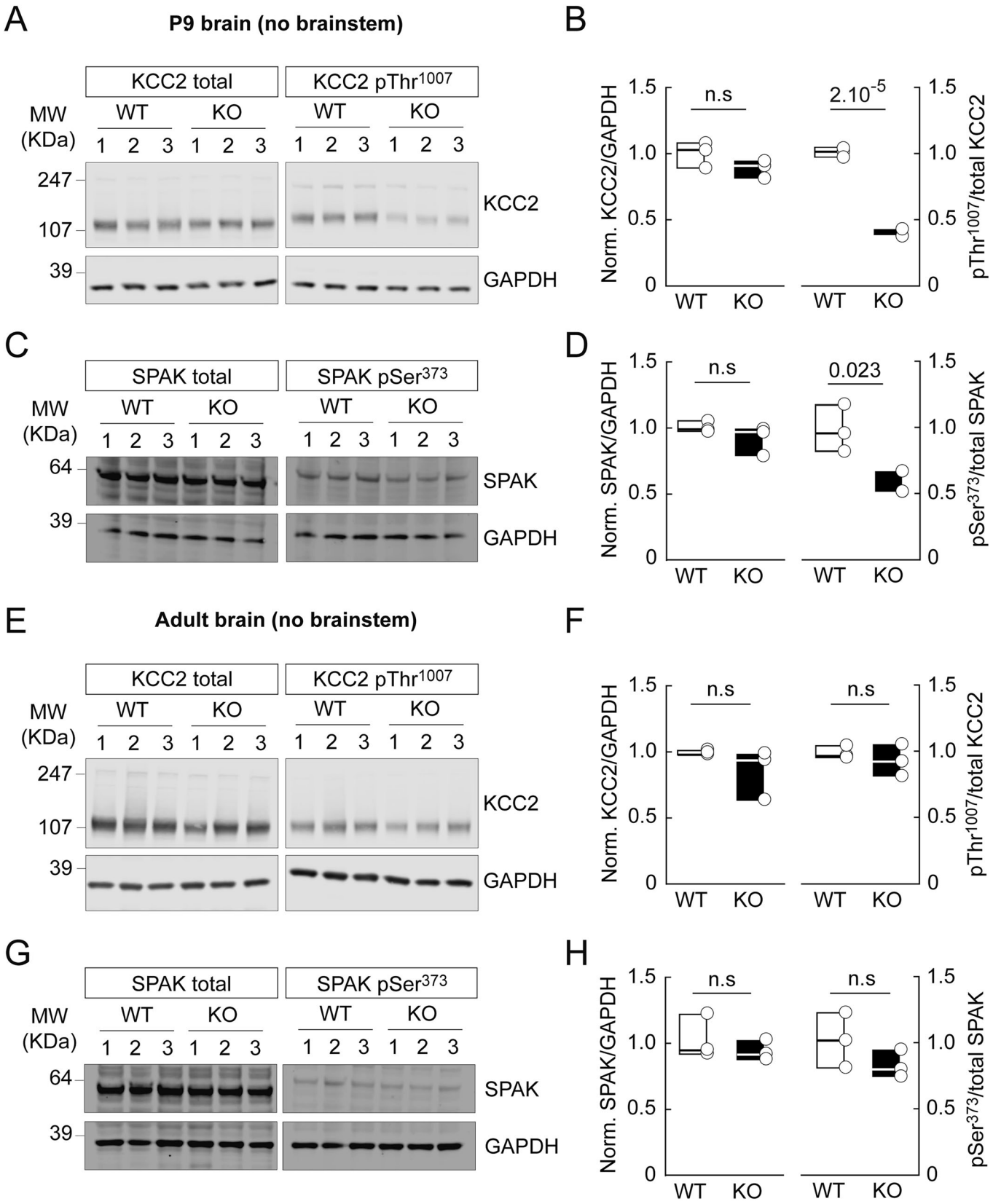

A
P9 brain (no brainstem)
KCC2 total
KCC2 pThr1007
MW (KDa)
WT
KO
1 2 3 1 2 3 1 2 3 1 2 3
247
107
39
KCC2
GAPDH
B
Norm. KCC2/GAPDH
n.s
2.10-5
pThr1007/total KCC2
C
SPAK total
SPAK pSer373
64
39
SPAK
GAPDH
D
Norm. SPAK/GAPDH
n.s
0.023
pSer373/total SPAK
E
Adult brain (no brainstem)
F
G
H

Figure 6. KCC2a gates WNK-SPAK-mediated KCC2 Thr1007 phosphorylation in the immature, but not adult postnatal brain.

(**A**) Western blots of brain extracts (without brainstem) from P9 KCC2a-KO pups and WT littermates. Each membrane was probed for GAPDH, as well as either endogenous KCC2, KCC2 Thr^{1007P}. (**B**) Summary boxplots showing the ratio of total panKCC2 immunofluorescence to that of GAPDH (left) or phosphorylated KCC2 immunofluorescence to that of GAPDH and normalized by the corresponding total protein (right). All results are normalized to WT. WT, $n = 3$; KO, $n = 3$ animals; 3 technical replicates from the same brain extracts. Two-tailed unpaired *t* test. (**C**, **D**), same as (**A**, **B**), for SPAK or hSPAK Ser^{373P} (which detect the mouse SPAK Ser^{383P}) immunoblots. (**E**, **F**), Same as (**A**, **B**) for adult KCC2a-KO and WT littermates. (**G**, **H**) Same as (**C**, **D**) for adult brain extracts. WT, $n = 3$; KO, $n = 3$ animals; three technical replicates from the same brain extracts. Two-tailed unpaired *t* test. Samples being compared derive from the same experiment and membranes were processed in parallel. Box plots show the median (centre line) and the 25th and 75th percentiles (box bounds). With $n = 3$ per group, no whiskers are displayed and all individual data points are shown alongside the box. *P* values are provided on the graphs.

influencing KCC2b clustering and function. Previous studies have highlighted the presence of large KCC2 clusters within dendritic spines (Chamma et al, 2013; Gauvain et al, 2011; Gulyas et al, 2001). There, KCC2 was shown to influence spine maturation and volume, actin dynamics, and synaptic function and plasticity (Awad et al, 2018; Chevy et al, 2015; Gauvain et al, 2011; Li et al, 2007; Llano et al, 2015). Remarkably, we now show that endogenous KCC2a-immunoreactivity is completely absent from dendritic spines (Fig. 1G). This suggests that the two isoforms may be differentially targeted to specific subcellular compartments and that only KCC2b may be endowed with non-canonical functions in dendritic spines.

Despite the imbalance in KCC2 isoform stoichiometry, our data reveal that KCC2a plays a critical and unexpected role in controlling KCC2 in mature hippocampal neurons. Our experiments on neurons expressing recombinant Flag-tagged KCC2b revealed trans-regulation of KCC2 isoforms: KCC2a knockdown reduced KCC2b total expression, plasmalemmal fraction, and clustering (Fig. 3), which was associated with reduced chloride export function (Fig. 4). While KCC2 was initially suggested to undergo very rapid turnover (Rivera et al, 2004), subsequent studies revealed that it is long-lived, with stability under physiological conditions ranging from hours to days (Puskarjov et al, 2012). However, KCC2 can be modulated by activity within minutes. This modulation involves the phosphorylation or dephosphorylation of key residues in its C-terminal domain or calpain cleavage. These changes result in increased membrane diffusion, endocytosis, and degradation by the lysosomal and proteasomal pathways (Côme et al, 2019; Hu et al, 2023). Our data show that, under basal conditions, blocking clathrin-dependent endocytosis for 1 h or polyubiquitination and proteasomal degradation for 2 h has no significant impact on the plasmalemmal fraction or total expression of KCC2, respectively (Fig. 5). These results are inconsistent with previous observations of rapid recycling of membrane-inserted KCC2 (Lee et al, 2010; Zhao et al, 2008), but they do confirm the relative stability of the total KCC2 pool within this time range. However, we demonstrate that these manipulations completely reverse the effects of chronic KCC2a knockdown. This suggests that KCC2a acts to promote KCC2 membrane stability and prevent its ubiquitination and proteasomal degradation, even under basal activity conditions. The molecular determinants of this stabilizing effect remain to be established, but they could involve KCC2 interactions with its numerous partner proteins (Al Awabdh et al, 2022; Mahadevan et al, 2017; Smalley et al, 2020). In particular, the proteasomal pathway has recently been identified as a key element in KCC2 degradation, involving the direct interaction of KCC2b with FBXL4, a protein that forms the E3 ubiquitin ligase complex SCF-FBXL4 and that is essential for KCC2 polyubiquitination (Chen et al, 2025; Hu et al, 2023). KCC2a may hinder this interaction, thereby preventing KCC2b ubiquitination and degradation. Alternatively, KCC2a may influence KCC2b interaction with partners known to control its membrane stability and/or clustering, such as gephyrin (Al Awabdh et al, 2022), SNARE proteins (Asraf et al, 2022), Neto2 (Ivakine et al, 2013), and CKB (Inoue et al, 2006).

In heterologous cells, KCC2a but not KCC2b, has been shown to interact with SPAK (Markkanen et al, 2017), an effector of WNK and a major regulator of cation-chloride cotransporters (Alessi et al, 2014). This interaction is consistent with the presence of a conserved SPAK/OSR1-binding motif (RFxV/I) in the N-terminal domain of KCC2a but not KCC2b (Uvarov et al, 2007). Accordingly, SPAK suppresses chloride transport mediated by recombinant KCC2a but not KCC2b (Markkanen et al, 2017). Since the two isoforms can oligomerize (Uvarov et al, 2009), KCC2a may be necessary for SPAK-dependent modulation of KCC2b within heteromeric transporters. Our results now provide direct evidence for this model. Endogenous phosphorylation of KCC2 at Thr1007 was strongly reduced in brain extracts from P9 KCC2a-KO pups (Fig. 6B), a developmental stage at which WNK-SPAK activity is high (Friedel et al, 2015). Furthermore, KCC2a knockdown abolished the WNK1-CA-induced downregulation of recombinant KCC2b membrane expression in mature hippocampal neurons (Fig. 7), demonstrating that this effect is not strictly age-dependent but persists whenever the WNK-SPAK pathway is active. Conversely, the developmental decline in WNK-SPAK activity is itself sufficient to convert KCC2a from a negative regulator—promoting KCC2b Thr1007 phosphorylation and destabilization—to a stabilizing partner that prevents its endocytosis and degradation.

Although the KCC2a-gated WNK-SPAK-dependent control of KCC2b membrane expression might seem redundant with the already low transcriptional levels of the isoform in immature neurons, these mechanisms might enable an independent regulation of KCC2 canonical and non-canonical functions (Chevy et al, 2020). Indeed, KCC2b is structurally essential during embryonic and early post-natal development as it regulates spine development as well as the apoptosis of cortical projection neurons (Li et al, 2007; Llano et al, 2015; Mavrovic et al, 2020). Yet, the maintenance of a depolarizing effect of GABA on the membrane potential at these stages is important for synaptogenesis and for the proper establishment of neuronal connections (Caillard et al, 1999; Cancedda et al, 2007; Wang and Kriegstein, 2008). Therefore, the weak KCC2b expression might enable the protein to play its structural role while its KCC2a-mediated regulation by the WNK-SPAK pathway might ensure the inhibition of its transporter function.

 © The Author(s)

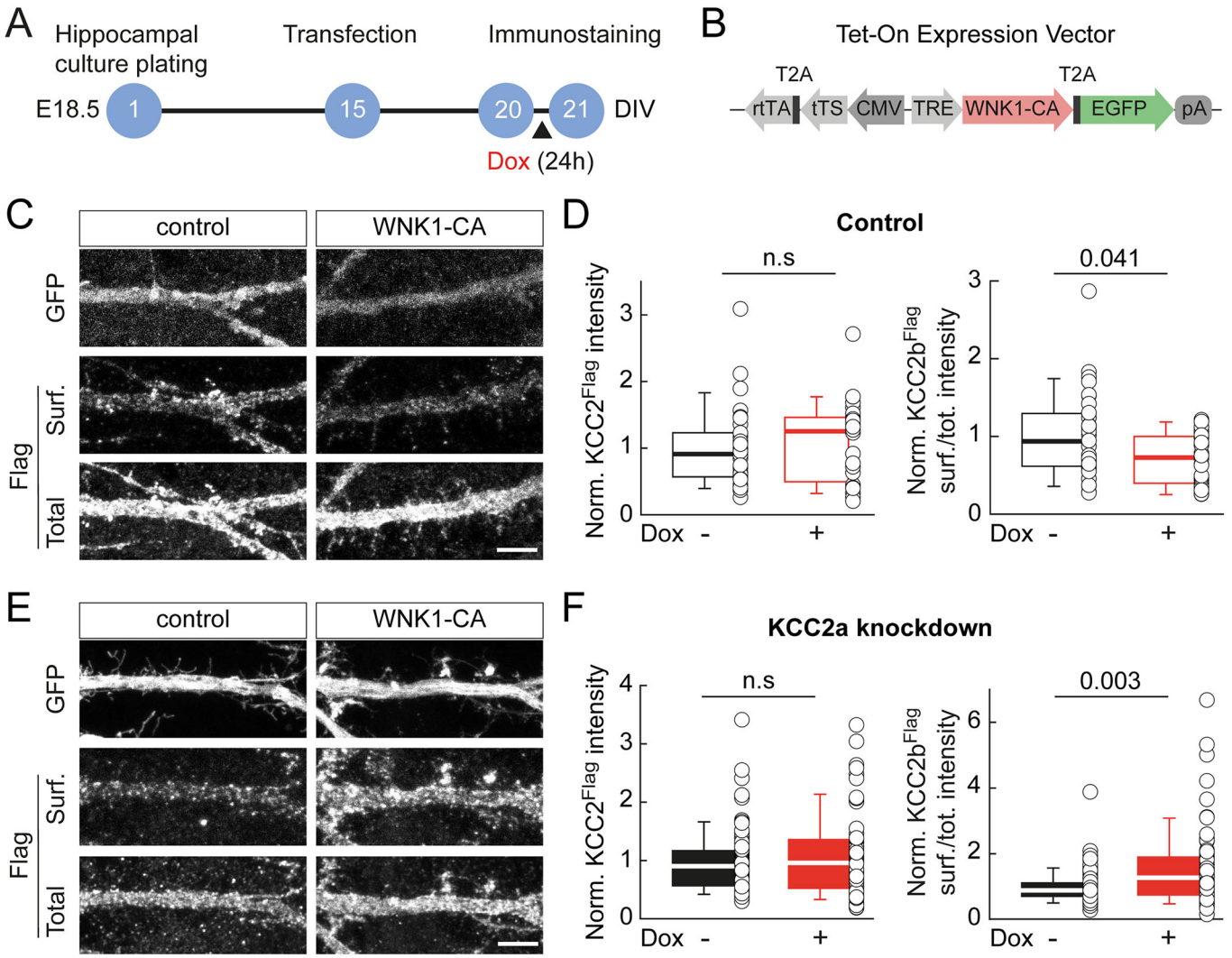


Figure 7. KCC2a gates WNK1-dependent regulation of KCC2b membrane expression in mature hippocampal neuron.

(A) Experiment timeline. **(B)** Design of the plasmid encoding for the constitutively activated WNK1 (WNK1-CA), bearing a S382E mutation. **(C)** Representative confocal maximum projection images of dendritic sections of hippocampal neurons transfected with plasmids encoding GFP, WNK1-CA and recombinant KCC2b-Flag. Doxycycline (Dox +, 2 µg/ml) was added to culture medium 24 h before live immunostaining. Neurons were immunostained for Flag and GFP. Scale: 5 µm. **(D)** Summary boxplots showing the intensity of Flag immunofluorescence (left) and the ratio of plasmalemmal (surf) to the overall (total) Flag immunofluorescence intensity (right) in neurons treated or not with doxycycline. Dox-, $n = 31$; Dox +, $n = 28$ cells; from 3 independent cultures. Mann–Whitney rank-sum tests. **(E)** Same as **(C)**, in neurons additionally co-transfected with plasmids encoding shKCC2a-specific shRNAs. Scale: 5 µm. **(F)** Same as **(D)**, in KCC2a-specific knocked-down neurons. Dox-, $n = 71$; Dox +, $n = 67$ cells; from six independent cultures. Mann–Whitney rank-sum tests. All data were normalized to control (no doxycycline). Box plots show the median (centre line), the 25th and 75th percentiles (box bounds) and the 10th and 90th percentiles (whiskers); all individual data points, including minima and maxima, are displayed alongside the box (see "Methods"). *P* values are provided on the graphs.

More surprisingly, KCC2a-KO brain extracts also showed reduced SPAK phosphorylation at Ser383 without changes in WNK1 phosphorylation (Figs. 6 and EV4), suggesting that interaction with KCC2a may facilitate WNK1-dependent SPAK activation. Collectively, these data support a model in which KCC2a is essential for assembling a functional signaling unit comprising KCC2b and the regulatory kinase SPAK. The mechanistic basis for this model is the N-terminal SPAK/OSR1-binding motif itself. This class of motif is the established determinant of SPAK/OSR1 recruitment across the cation-chloride cotransporter family: transporters carrying it (KCC3, NKCC1, NKCC2) bind these kinases, whereas those lacking it do not (Piechotta et al, 2002). The motif tolerates conservative substitutions, including histidine for arginine at the first position (Austin et al, 2014), and its functional necessity is directly demonstrated by structural and biochemical work showing that an N-terminally truncated human KCC1 lacking this motif (KCC1Δ19) is no longer phosphorylated at its canonical regulatory threonines (Chi et al, 2021). Our data are fully consistent with this framework: in the heteromeric transporter, KCC2a supplies in trans the docking site that KCC2b lacks, allowing SPAK to access and phosphorylate KCC2b; without KCC2a, this docking site is lost. Nonetheless, direct biochemical isolation of the endogenous KCC2a-SPAK-KCC2b complex from native tissue remains challenging, as neuronal SPAK is expressed at

© The Author(s)

low levels and engages a very large interactome (Delpire and Gagnon, 2007), of which KCC2 represents only a minor fraction.

Given the versatile and fine-tuning role of KCC2a in regulating KCC2b, it is somewhat surprising that KCC2a KO mice were reported to display only a mild phenotype, with a low breathing rate and abnormal occurrence of apnea at birth (Dubois et al, 2018). Our experiments using chronic KCC2a knockdown in vitro predict a reduced KCC2 expression and function in the adult forebrain of KCC2a KO mice, which are expected to impact neuronal function and cortical rhythmogenesis (Goutierre et al, 2019; Simonnet et al, 2023). In support of a specific role for this isoform in pathology, KCC2a was also found to be specifically reduced in brain samples of patients with Rett syndrome (Hinz et al, 2019). However, compensatory mechanisms may be at play in the constitutive KO mice to mask these effects. Further phenotypic exploration of these mice may be needed to reveal anomalies related to altered KCC2 function. Our data, on the other hand, also predict that acute neuronal stress induced under conditions associated with re-activation of the WNK-SPAK pathway - such as *status epilepticus* (Heubl et al, 2017), stroke (Bhuiyan et al, 2022), or brain trauma (Gong et al, 2021) - may differentially affect WT versus KCC2a KO mice. Since KCC2a appears to gate WNK-SPAK-dependent KCC2 downregulation, KO mice may display increased resilience or a better outcome in these conditions and compounds that specifically prevent KCC2a-SPAK interaction may represent useful adjunct therapeutics. Notably, small molecules that enhance KCC2 clustering and function have recently shown antiseizure efficacy in both human mTLE resective tissue and animal models (Donneger et al, 2026), underscoring the broader therapeutic potential of targeting KCC2 regulation. Importantly, because KCC2a loss also lowers baseline KCC2b function in mature neurons, the net effect of KCC2a disruption is likely to differ between acute seizure susceptibility and long-term epileptogenesis, and remains to be tested directly.

Methods

Reagents and tools table

Reagent/resource	Reference or source	Identifier or catalog number
Experimental models		
Rj:SD (*R. Norvegicus*)	Janvier	
C57BL/6JOlaHsd (*M. musculus*)	Janvier	
HEK-293 cells (*H. sapiens*)	ATCC	Cat# CRL-1573
Recombinant DNA		
Flag-tagged rat full-length KCC2b	Our lab	Chamma et al, 2013
Flag-tagged rat full-length KCC2a	Our lab	Synthesized for this study
p[miRNA30]-eGFP-scramble	VectorBuilder	VB210729-1210gkw
p[miRNA30]-eGFP-shKCC2a_1	VectorBuilder	VB210729-1220zyz
p[miRNA30]-eGFP-shKCC2a_3	VectorBuilder	VB210729-1219wqx
TRE > WNK1-rev(CMV>tTS:t2A:rtTA)	VectorBuilder	VB230503-1035kvj
Antibodies		
Rabbit anti-KCC2	Millipore	Cat# 07-432; RRID: AB_310611
Rabbit anti-KCC2a	Airaksinen lab	Markkanen et al, 2014
Mouse anti-Flag M2	Sigma	Cat# F3165; RRID: AB_259529
Chicken anti-GFP	Chemicon	Cat# AB16901
Rabbit anti-VGLUT1	Synaptic System	Cat# 135303
Rabbit anti-VGAT	Synaptic System	Cat# 131002
Donkey anti-Rabbit Cy3	Jackson ImmunoResearch	Cat# 711-165-152
Donkey anti-Rabbit A647	Jackson ImmunoResearch	Cat# 711-605-152
Donkey anti-Mouse Cy3	Jackson ImmunoResearch	Cat# 715-165-150
Donkey anti-Mouse A647	Jackson ImmunoResearch	Cat# 715-605-150
Donkey anti-Chicken A488	Jackson ImmunoResearch	Cat# 703-545-155
Rabbit anti-KCC2	Upstate	Cat# 07-432
Rabbit anti-KCC2pT1007	Phosphosolutions	Cat# p1551-1007; RRID: AB_2716769
Sheep anti-SPAK	MRC PPU reagents Dundee	sheep n° S551D
Sheep anti-SPAKpS373	MRC PPU reagents Dundee	sheep n° S670B
Rabbit anti-GAPDH	Invitrogen	Cat# PA1-987; RRID: AB_2107311
Sheep anti-WNK1	MRC PPU reagents Dundee	sheep n°S650C
Sheep anti-WNK1pS382	MRC PPU reagents Dundee	sheep n°S099B
Goat anti-rabbit IRDYE 800CW	LI-COR	Cat# 926-32211; RRID: AB_621843
Donkey anti-sheep 800	Rockland	Cat# 613-745-168
Oligonucleotides and other sequence-based reagents		
Random primers	Thermo Fisher Scientific	Cat# 48190011
Chemicals, enzymes and other reagents		
0.25% trypsin	Gibco	Cat# 15090046
HBSS	Gibco	Cat# 14175095
HEPES	Thermo Fisher Scientific	Cat# 15630056
Poly-D,L-ornithine	Sigma-Aldrich	Cat# P8638
MEM	Gibco	Cat# 51200038
horse serum	Gibco	Cat# 26050088
L-glutamine	Thermo Fisher Scientific	Cat# 25030081
Sodium pyruvate	Thermo Fisher Scientific	Cat# 11360039
Neurobasal medium	Gibco	Cat# 21103049

© The Author(s)

Reagent/resource	Reference or source	Identifier or catalog number
B27	Thermo Fisher Scientific	Cat# A3582801
Penicillin–streptomycin	Gibco	Cat# 15140122
DMEM + GlutaMAX + pyruvate	Gibco	Cat# 10569010
FBS	Gibco	Cat# A3160801
TransFectin	Bio-Rad	Cat# 1703351
PEI	Sigma-Aldrich	
D-glucose	Gibco	
DynaMin Inhibitory Peptide, myristoylated	MedChemExpress	Cat# HY-P1369
PYR-41	MedChemExpress	Cat# HY-13296
MG132	MedChemExpress	Cat# HY-13259
Doxycycline hyclate	Sigma-Aldrich	Cat# D5207
Triton X − 100	Carl Roth	Cat# 3051.3
Goat serum	Gibco	Cat# 16210064
DAPI	Sigma-Aldrich	Cat# D9542
TRIzol	Invitrogen	Cat# 15596026
RNAqueous-Micro Kit	Ambion	Cat# AM1931
SuperScript II reverse transcriptase	Invitrogen	Cat# 18064014
ABsolute Blue QPCR Mix, SYBR Green	Thermo Fisher Scientific	Cat# AB4163A
Protease inhibitors	Roche	Cat# 11836170001
Phosphatase inhibitors	Thermo Fisher Scientific	Cat# 78420
PierceTM BCA Protein assay	Thermo Fisher Scientific	Cat# 23227
NuPAGE™ Sample reducing agent (10X)	Invitrogen	Cat# NP0009
NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4X)	Invitrogen	Cat# NP0007
NuPAGE™ Bis-Tris Mini Protein Gels, 4–12%	Invitrogen	Cat# NP0323BOX
NuPAGE™ Tris acetate Mini Protein Gels	Invitrogen	Cat# EA0375BOX
Amersham Protran NC Nitrocellulose Membrane	Thermo Fisher Scientific	Cat# 10600002
TTX	Latoxan	Cat# L8502
D-AP5	HelloBio	Cat# HB0225
NBQX	HelloBio	Cat# HB0443
CGP54626	Tocris Bioscience	Cat# 1088
Isoguvacine	HelloBio	Cat# HB0883
Software		
SigmaPlot 13	SYSTAT Software	
ImageJ	NIH	
Imaris 10 and 11	Oxford Instruments	
Metamorph	Molecular Devices	
LAS AF	Leica	
Leica DM6000 microscope	Leica	
RTE/CCD-1300-Y/HS MicroMAX Camera	Roper Scientific	
Leica TCS SP5 microscope	Leica	
QuantStudio 3	Thermo Fisher Scientific	
Odyssey CLx Imager	LI-COR	

Animal experimentation

All animal procedures were carried out according to the European Community Council directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and the guidelines of the French Agriculture and Forestry Ministry for handling animals (decree 87-848) and were approved by the *Direction Départementale de la Protection des Populations de Paris*. All procedures were performed in a user facility (Institut du Fer à Moulin animal facility, license E750522). Female rats were bought while pregnant and were housed under standard conditions at 20-24 °C with a 12/12-h dark/light cycle and food and water provided ad libitum. Brains from male and female KCC2a-KO mice and their WT littermates were kindly provided by Muriel Thoby-Brisson's team and were handled as in (Dubois et al, 2018).

Primary hippocampal cultures

Primary hippocampal neuron cultures were prepared from the hippocampi of WT Sprague Dawley (Rj:SD) male and female rats on embryonic day 18.5 (E18.5), as previously described (Al Awabdh et al, 2022; Gauvain et al, 2011). The hippocampi were dissociated using 0.25% trypsin (Gibco) and then triturated mechanically in ice-cold HBSS (Gibco) supplemented with HEPES (Thermo Fisher Scientific). The neurons were plated at a density of 1.5×10^5 cells per 18-mm glass coverslip pre-coated with 50 µg/ml poly-D,L-ornithine (Sigma-Aldrich). The initial plating medium consisted of minimum essential medium (Gibco) supplemented with 10% horse serum (Gibco), 2 mM L-glutamine (Thermo Fisher Scientific), and 1 mM sodium pyruvate (Thermo Fisher Scientific). After a 3 to 4-h attachment period, the plating medium was replaced with a serum-free culture medium composed of Neurobasal medium (Gibco) supplemented with B27 (Gibco), 2 mM L-glutamine (Thermo Fisher Scientific), and antibiotics (200 units/mL penicillin and 200 µg/mL streptomycin, Gibco). The neurons were maintained in an incubator at 37 °C with 5% CO_2 for up to four weeks, with one-third of the medium replaced weekly.

HEK-293 cell cultures

HEK-293 cells were maintained in high glucose (4.5 g) DMEM supplemented with GlutaMAX and pyruvate (Gibco), 10% FBS (Gibco), and 0.2% penicillin/streptomycin (Gibco). For transfection, cells were plated at a density of 5×10^4 cells per 18-mm glass coverslip in 12-well plates without antibiotics. Cells were regularly tested for mycoplasma contamination. Cells have not been authenticated.

© The Author(s)

Plasmid constructs

The KCC2b-Flag construct was generated by inserting a sequence encoding a 3xFlag tag (DYKDHDGDYKDHHIDYKDDDD) into the second extracellular loop of KCC2, between the NsiI and NheI restriction sites of the full-length pEGFP–IRES–KCC2 construct (GenBank accession number U55816) (Chamma et al, 2013). The KCC2a-Flag construct was subcloned by inserting a synthetic 120-bp fragment encoding the KCC2a-specific N-terminus into the KCC2b-Flag backbone to replace the KCC2b-specific N-terminal coding sequence (Genscript, sequence available upon request). Specific knockdown of rat KCC2a was achieved using two distinct shRNAs (short hairpin RNAs) embedded in a miR-30 backbone obtained from VectorBuilder. The target shRNA sequences, which were designed using VectorBuilder and Thermo Fisher Scientific BLOCK-iT™ RNAi Designer tools, were: CTCCCGAGGGAAGACGTCAAA (shKCC2a_1), ACCCAGAGTCCCGCCGGCATTCGGT (shKCC2a_3). The scrambled shRNA sequence was: ACCTAAGGTTAAGTCGCCCTCG.

The WNK1-CA construct expresses a constitutively active form of rat WNK1 with an S382E mutation, which is cloned into a Tet-On backbone (TRE > WNK1:T2A:GFP-rev(CMV>tTS:t2A:rtTA); VectorBuilder). Co-expression of WNK1 and GFP is controlled by the doxycycline-inducible TRE promoter. Doxycycline facilitates binding of the rtTA transcriptional enhancer and prevents binding of the tTS transcriptional silencer, thus activating gene expression. A GFP-encoding construct was used as a control to assess transfection efficiency.

Transfection procedures

Hippocampal neurons were transfected between days in vitro (DIV) 13 and 14 using TransFectin (Bio-Rad), following the manufacturer's instructions. Briefly, the appropriate plasmid combinations (see Table EV1) were mixed in complete culture medium to achieve a total plasmid mass of 1 µg per 20-mm well. Then, TransFectin was mixed with the complete medium at a ratio of 3 µl of TransFectin per 1 µg of plasmid. The plasmid- and TransFectin-containing media were then combined and added to the neurons for 45 min. Subsequently, they were replaced with a mixture of conditioned (2/3) and fresh (1/3) complete culture medium. The transfected neurons were used for immunocytochemistry or electrophysiological analysis 7 to 10 days post-transfection.

HEK-293 cells at 70% confluence were transfected using polyethyleneimine (PEI, Sigma-Aldrich) following a protocol similar to that for neuronal transfection. The cells were incubated in the plasmid/PEI mixture for 48 h prior to fixation.

Pharmacological treatments

Clathrin-mediated endocytosis was inhibited by incubating neurons for 40 min with the Dynamin Inhibitory Peptide, myristoylated (DiP) (50 µM, MedChemExpress) in complete culture medium at 37 °C. Because the effects of DiP are reversible, it was maintained in the medium for all subsequent live staining procedures (20 min).

The ubiquitin-proteasome system was blocked by incubating neurons for 2 h at 37 °C with either the ubiquitin-activating enzyme (E1) inhibitor PYR-41 (50 µM, MedChemExpress) or the proteasome inhibitor MG132 (2.5 µM, MedChemExpress) in complete culture medium. As MG132 is a known calpain inhibitor (IC_{50} = 1.2 µM), this treatment condition also served to inhibit calpain-dependent degradation of KCC2.

Expression of the constitutively active WNK1 (WNK1-CA) via the Tet-On system was induced by incubating neurons for 24 h with doxycycline hyclate (2 µg/ml, Sigma-Aldrich) in complete culture medium at 37 °C.

Immunocytochemistry

To ensure the specificity of the in-house rabbit anti-KCC2a antibody (Markkanen et al, 2014), antibodies were pre-adsorbed on brainstems from P9 KCC2a-KO mice. Tissue was fresh-frozen, fixed in 4% PFA overnight at 4 °C, and sectioned at 50 µm. Approximately forty sections were permeabilized with 0.25% Triton X − 100 (Carl Roth) and incubated for 3 days at 4 °C with 1 ml of the rabbit anti-KCC2a primary antibody (1:750) in 3% inactivated goat serum under agitation. The resulting collected antibody solution was subsequently used for KCC2a immunocytochemistry experiments on cultured neurons.

To quantify total endogenous KCC2a and KCC2 expression, the cells were fixed in a solution of 4% paraformaldehyde and 4% sucrose for 15 min. The neurons were then permeabilized with 0.25% Triton X-100 and blocked for 30 min in 10% inactivated goat serum (Gibco). A two-step primary/secondary antibody staining protocol was then used sequentially. First, the coverslips were incubated with rabbit anti-KCC2a primary antibody (dilution as in Table EV2) in 3% inactivated goat serum for 1 h at room temperature. After washing with 1× PBS, the cells were incubated with a Cy3-conjugated donkey anti-rabbit secondary antibody solution for 45 min at room temperature. The process was then repeated using a rabbit anti-KCC2 antibody and a A647-conjugated donkey anti-rabbit secondary antibody. The same protocol—without the rabbit anti-KCC2/donkey anti-rabbit A647 step—was used to quantify endogenous KCC2a alone to test the efficacy of anti-KCC2a shRNAs.

To quantify the relative membrane expression of recombinant KCC2 isoforms, a live-immunostaining protocol was used as previously described (Al Awabdh et al, 2022). Living neurons were incubated with mouse anti-flag M2 primary antibodies in MEM medium (Gibco) supplemented with D-Glucose (33 mM), sodium pyruvate (1 mM), HEPES (20 mM), glutamine (2 mM), and B27 (1X) to tag the membrane-inserted KCC2-Flag protein (surface) at 13 °C for 20 min. The cells were then fixed, permeabilized and blocked as previously described. After washing with 1x PBS, the cells were sequentially incubated with: a Cy3-conjugated donkey anti-mouse antibody, a mouse anti-Flag M2 and chicken anti-GFP antibody solution and finally a solution containing A647-conjugated donkey anti-mouse and A488 donkey anti-chicken secondary antibodies. The cells were then washed, DAPI-stained, and mounted. For experiments quantifying total endogenous KCC2 or recombinant Flag-tagged KCC2 isoforms, the cells were fixed, permeabilized, and blocked as described above. Primary antibodies (combination as in Table EV2) were incubated for 1 h at room temperature in 3% inactivated goat serum. After washing with 1× PBS, the cells were incubated with the appropriate secondary antibody solutions (Table EV2) for 45 min at room temperature. The cells were then washed, DAPI-stained, and mounted.

 © The Author(s)

Image acquisition and analysis

Standard fluorescence quantification images were acquired using a Leica DM6000 epifluorescence microscope with a 63x objective (NA 1.40) and a 12-bit cooled CCD camera (Micromax, Roper Scientific). The microscope was controlled using Metamorph software (Roper Scientific). The exposure time and other acquisition parameters were determined for each fluorescent channel using the brightest cells to prevent saturation, and these parameters were kept constant across all cells within a given experimental replicate. ImageJ software was used to quantify the surface-to-total fluorescence ratio of recombinant KCC2 isoforms. A region of interest (ROI) was drawn around a primary dendrite positioned in the focal plane. Mean fluorescence intensity was then measured sequentially for the surface (Cy3) and total (Alexa647) pools. Background mean intensity was measured separately for each fluorophore and subtracted from the corresponding signal intensity within the ROI to yield the corrected fluorescence intensity.

Image acquisition for experiments including endogenous KCC2a expression and KCC2 expression depending on various treatments was performed using a Leica SP5 confocal microscope with a 63x objective (NA 1.40) and LAS AF software. Confocal images were acquired at a zoom level of 5. For each neuron, a Z-stack was acquired across a primary dendrite with 0.5 µm Z-steps. For analysis, the Z-stacks were processed into a sum projection using ImageJ. A primary dendrite was selected, and an ROI was drawn. Background fluorescence was subtracted from the A647 signal to determine total protein expression. To account for dendrite thickness, the value was normalized by the dendrite thickness, which was calculated as [number of images in stack − 1] × 0.5 µm. Relative surface expression was calculated as the ratio of corrected surface intensity to corrected total intensity.

We analyzed panKCC2 and KCC2a expression along the somato-dendritic axis using Z-axis projected images. The number of planes was adjusted depending on whether somatic or dendritic expression was quantified. Background intensity was measured independently for the soma stack and the dendrite stack to ensure accurate subtraction. Normalization by the thickness of the neuron ([number of images in the stack – 1]*0.5) was performed independently at the soma and at the dendrite.

IMARIS software was used to quantify enrichment of panKCC2 and KCC2a in protein clusters. Dendritic segments were visualized in 3D and isolated from background noise. Aggregates with a diameter greater than 0.7 µm and a fluorescence intensity exceeding a user-defined threshold were classified as clusters and modeled as 1-µm spheres. The number of clusters and the fluorescence intensity within the clusters and within the dendritic portion were measured for both isoforms, and the corresponding background values were subtracted.

Analysis of KCC2 and recombinant KCC2b-Flag clusters was performed using an in-house Metamorph routine as previously described (Al Awabdh et al, 2022). A primary dendrite ROI was selected, and images were digitally flattened and filtered. Clusters were detected using a user-defined intensity threshold and a minimum area of 0.031 µm^2. The cluster regions were superimposed on the raw images to calculate their mean density, area, and integrated intensity.

IMARIS software was used to quantify spines type and density. Dendritic segments were visualized in 3D and isolated from background noise. The isolated dendrite was defined as a filament and spines (diameter >0.3 µm, length <5 µm) were defined from this filament using a threshold method based on the *Shortest Distance from Distance Map* algorithm. Spines that were not detected with this technique were added manually and then processed with the previously defined spines. The number of spines per dendrite surface unit was measured. Spines were classified using IMARIS Classify Spines XTension. We compared the proportions of the four dendritic spine types (stubby, mushroom, long, filopodia) using a custom Python script with Mann–Whitney *U* tests. We corrected the *P* values for multiple comparisons using the Benjamini–Hochberg false discovery rate (FDR) procedure. Complementary linear mixed-model analyses were also performed with independent cultures as a random intercept.

RNA extraction

RNA was extracted from rat brain tissue using TRIzol reagent (Invitrogen). The tissue was snap-frozen on dry ice and stored at −80 °C. The tissue was lysed by immersing it in 1 ml of TRIzol reagent and homogenizing it with a Potter homogenizer. Then, 200 µl of chloroform was added, and the mixture was centrifuged to separate the aqueous phase containing the RNA. The RNA was then precipitated by adding 500 µl of isopropanol, followed by centrifugation for 10 min. The RNA pellet was washed with 75% ethanol, air-dried for 10 min, and resuspended in 50 µl of RNase-free water.

RNA was extracted from cultured neurons using the RNAqueous-Micro Kit (Ambion). Neurons were plated in 6-well plates at a density of 3.5×10^5 cells/well. For each time point (DIV 7, 10, and 24), neurons from two wells were harvested and pooled. The cells were detached by mechanical dissociation and centrifuged. The supernatant was discarded, cells were lysed, and 50 µl of absolute ethanol was added to the lysate. The lysate/ethanol mixture was loaded onto a column provided in the kit, followed by a series of washing and centrifugation steps. RNA was eluted in 20 µl elution buffer. Residual genomic DNA was removed by DNase I treatment.

Reverse transcription and quantitative PCR

Total RNA was reverse transcribed using SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen). The reaction mixture contained 1 µg RNA, 100 ng random primers (Thermo Fisher Scientific), and 1 µl of a 10 mM dNTP mix (Thermo Fisher Scientific) and was brought to 13 µl with sterile water. The mixture was denatured at 65 °C for 5 min. DTT was added, followed by a 2 min incubation at RT, and then 1 µl SuperScript reverse transcriptase was added. The synthesis steps were 10 min at 25 °C and 50 min at 42 °C. The reaction was then inactivated with a 15-min incubation at 70 °C.

Quantitative PCR was conducted using the ABsolute Blue QPCR Mix, SYBR Green, ROX (Thermo Fisher Scientific). Each target amplification (KCC2a, KCC2b, and the housekeeping gene Ywhaz) was run in triplicate in a 384-well qPCR plate, alongside a no-reverse-transcriptase (NRT) control and a water control. Each 10 µl reaction consisted of: 5 µl Tp2X Sybr, 4 µl template cDNA (C = 10 ng/µl), 0.2 µl forward and reverse primer (10 µM) (Table EV3), and 0.8 µl water. qPCR was performed on a QuantStudio5 device using the following thermal cycling program:

© The Author(s)

initial denaturation at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 30 s, 58 °C for 30 s, 72 °C for 20 s, and a final melt curve step at 95 °C for 15 s. *Ywhaz* encodes the 14-3-3ζ protein (tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein ζ) and was selected as reference gene for its high abundance in brain and its established suitability for qPCR normalization (Bonefeld et al, 2008); in our hands, its expression remained stable across developmental stages in both ex vivo tissue and neuronal cultures, unlike actin.

The RT-qPCR data were analyzed as follows. For each condition (rat hippocampus/cortex, hippocampal neurons in culture), 3–4 independent experiments were performed. Within a single experiment, each variant (*KCC2a*, *KCC2b*, *Ywhaz*) was analyzed at different times (E18/adult or DIV7/10/24) and each association of variant and time was run in triplicate. We calculated the mean Ct of the triplicates for each variant-time, and the value of $2^{-\Delta\Delta Ct}$ was calculated by subtraction of a variant mean Ct by *Ywhaz* mean Ct and then by normalization either by KCC2b value or by the E18/DIV7 value. Finally, we calculated the average $2^{-\Delta\Delta Ct}$ of the independent experiments for each variant-time.

Western blot

Brains used for the western blots were obtained by fast cervical dislocation and decapitation. They were then dissected out, snap-frozen by immersion in isopentane and stored at −80 °C. Adult brain hemispheres or P9 whole brains (with brainstem dissected out) from KCC2a-KO C57BL6/J mice and WT littermates were lysed in a modified RIPA buffer containing (in mM): 50 Tris-HCl (pH 7.4), 150 NaCl, 1% Nonidet P − 40, 1% Triton X-100, 0.5% DOC, 0.1% SDS, 50 NaF, 1 EDTA supplemented with 1X protease inhibitors (Roche) and phosphatase inhibitors (Thermo Fisher Scientific). The lysis volume was standardized (10 µl RIPA per 1 mg tissue). Lysis was achieved by homogenization in a Potter homogenizer. Samples were centrifuged, and the supernatant containing the protein lysate was collected. Protein concentration was determined using the Pierce™ BCA Protein assay (Thermo Fisher Scientific).

For KCC2 and SPAK western blots, protein extracts were prepared with sample reducing agent (Invitrogen) and LDS sample buffer (Invitrogen) to a final concentration of 3 µg/µl and denatured for 1 h at 37 °C. In total, 10 µl of sample was loaded onto a 4–12% Bis-Tris polyacrylamide gel (Invitrogen) for electrophoresis. Proteins were transferred to a nitrocellulose membrane for 3 h at 100 V at 4 °C. Membranes were washed (3 × 10 min) with TBS-Tween (TBST) and blocked with 5% (w/v) skim milk. Primary antibodies were incubated overnight at 4 °C in 5% (w/v) skim milk solution: rabbit anti-KCC2 (1:1000, Upstate), rabbit anti-KCC2pT1007 (1:1000, PhosphoSolutions), sheep anti-SPAK (1:50, MRC PPU reagents Dundee), sheep anti-hSPAKpS373 (1:50, MRC PPU reagents Dundee) and rabbit anti-GAPDH (1:2000, Invitrogen) as loading control. Membranes were washed (3 × 10 min TBST) and incubated for 1 h at RT with goat anti-rabbit DyLight 800 secondary antibody (1:5000, LI-COR) and donkey anti-sheep 800 secondary antibody (1:1000, Rockland, for SPAK staining) in 1% (w/v) skim milk. Fluorescence was acquired using the Odyssey infrared imaging system (LI-COR Bioscience).

For WNK1 western blots, protein samples were denatured for 10 min at 70 °C. In total, 10 µl of protein was loaded on a 3–8% Tris-Acetate polyacrylamide gel (Invitrogen) and transferred to a nitrocellulose membrane for 2.5 h at 65 V at 4 °C. Immunostaining utilized sheep anti-WNK1 (1:50, MRC PPU reagents Dundee) or sheep anti-WNK1pS382 (1:50, MRC PPU reagents Dundee) primary antibodies, followed by donkey anti-sheep 800 secondary antibody (1:1000, Rockland). Integrated intensity of the different bands signal was measured using ImageJ software. To quantify KCC2 (or SPAK) expression for each animal, the integrated intensity of the KCC2 signal was divided by the integrated intensity of the corresponding GAPDH signal. To quantify KCC2 phosphorylation level for each animal, the integrated intensity of the KCC2 Thr1007 phosphorylated signal was divided by the corresponding GAPDH (1) signal. The integrated intensity of the KCC2 signal was divided by the corresponding GAPDH (2) signal. Finally, the $\frac{KCC2\ Thr1007 \times GAPDH(2)}{KCC2 \times GAPDH(1)}$ ratio was calculated. To quantify WNK1 phosphorylation level for each animal, the integrated intensity of the WNK1 Ser382 phosphorylated signal was divided by the integrated intensity of the corresponding WNK1 signal. To account for technical variability, the final protein/GAPDH or phospho-protein/protein ratio for each biological sample (animal) was averaged from three independent technical replicates.

Electrophysiology

Whole-cell patch clamp recordings were performed on DIV 21-24 hippocampal neurons superfused at a rate of 2 ml/min with an artificial cerebral fluid solution (ACSF) composed of (in mM): 2 $CaCl_2$, 2 KCl, 3 $MgCl_2$, 10 HEPES, 20 D-glucose, 120 NaCl at 34 °C. Neurons were recorded using 5 MOhm borosilicate glass pipettes filled with (in mM): 104 K-gluconate, 25.4 KCl, 10 HEPES, 10 EGTA, 2 MgATP, 0.4 Na_3GTP, 1.8 $MgCl_2$. The liquid junction potential (14.9 mV) was corrected post hoc. Signals were acquired with a Multiclamp 700B amplifier (Molecular Devices), low-pass filtered at 2 kHz and digitized at 20 kHz using Clampex 11 (Molecular Devices). $GABA_A$R-mediated currents were isolated using (in µM): 1 TTX (Na^+ channel blocker, Latoxan), 50 D-AP5 (NMDA receptor antagonist, HelloBio), 10 NBQX (AMPA receptor antagonist, HelloBio) and 100 CGP54626 ($GABA_B$ receptor antagonist, Tocris Bioscience). After achieving whole-cell configuration, an isoguvacine-filled pipet (100 µM) was positioned near the soma. Voltage steps ranging from −80 mV to 0 mV (10 mV step) were applied, and GABAA R-mediated currents were evoked by the release of isoguvacine at each step. The isoguvacine pipet was then repositioned over a primary dendrite at a distance of 50−100 µm from the soma, and the same voltage-step protocol coupled with isoguvacine release was applied. Currents were registered at each holding potential, corrected for both the access resistance voltage drop and the liquid junction potential. Current-voltage (I–V) curves were plotted offline using Clampfit 11 to estimate the reversal potential of $GABA_A$ R currents at the soma ($EGABA_{soma}$) and the dendrite ($EGABA_{dendrite}$). The difference (ΔE_{GABA}=$EGABA_{dendrite}$ −$EGABA_{soma}$) was computed and then normalized by the distance between the two application sites to quantify the EGABA gradient.

Statistical analysis and experimental study design

All statistical procedures were conducted in SigmaPlot 13, with significance set at $P < 0.05$. Data are visualized as box plots in which the centre line indicates the median, the box bounds indicate the

 © The Author(s)

25th and 75th percentiles and the whiskers extend to the 10th and 90th percentiles; all individual data points, including minima and maxima, are displayed alongside the box. Numerical differences discussed in the text are based on mean values ± SEM. We determined the appropriate test by first evaluating normality (Shapiro–Wilk) and, for multi-group comparisons, equal variance (Brown–Forsythe). Two-group comparisons were conducted using two-tailed Student's *t* test (normal distribution) or Mann–Whitney rank-sum test (non-normal). For specific experiments involving more than two groups, such as pharmacological rescue experiments (e.g., Fig. 5), *P* values were further corrected using the Holm–Šidák method. Multi-group comparisons were performed using one-way ANOVA with Tukey's post hoc test, or Kruskal–Wallis ANOVA on ranks with Dunn's post hoc test if assumptions were violated.

No statistical methods were used to estimate the samples size and no randomization was performed. Cultures in which neurons seemed particularly damaged were excluded from our experiments. Experiments with a clearly identified experimental issue were also excluded. Data points considered as outliers (criteria depend on the experimental paradigm) were excluded from our analysis. When possible, data were analyzed by an investigator blinded to the experimental group allocation.

Data availability

All source data, uncropped western blot images, and original microscopy images underlying Figs. 1–7 and Expanded View Figs. EV1, EV2, EV3 and EV4 have been deposited in Zenodo and are publicly available at https://doi.org/10.5281/zenodo.20762432.

The source data of this paper are collected in the following database record: biostudies:S-SCDT-10_1038-S44319-026-00920-3.

Expanded view data, supplementary information, appendices are available for this paper at https://doi.org/10.1038/s44319-026-00920-3.

Peer review information

A peer review file is available at https://doi.org/10.1038/s44319-026-00920-3

References

Al Awabdh S, Donneger F, Goutierre M, Séveno M, Vigy O, Weinzettl P, Russeau M, Moutkine I, Lévi S, Marin P et al (2022) Gephyrin interacts with the K-Cl cotransporter KCC2 to regulate its surface expression and function in cortical neurons. J Neurosci 42(2):166–182

Alessi DR, Zhang J, Khanna A, Hochdörfer T, Shang Y, Kahle KT (2014) The WNK-SPAK/OSR1 pathway: master regulator of cation-chloride cotransporters. Sci Signal 7(334):re3

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 hippocampal neurons. iScience 25(2):103751

Austin TM, Nannemann DP, Deluca SL, Meiler J, Delpire E (2014) In silico analysis and experimental verification of OSR1 kinase - peptide interaction. J Struct Biol 187(1):58–65

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(11):4049–4062

Ben-Ari Y (2002) Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. Nat Rev Neurosci 3(9):728–739

Bhuiyan MIH, Young CB, Jahan I, Hasan MN, Fischer S, Meor Azlan NF, Liu M, Chattopadhyay A, Huang H, Kahle KT et al (2022) NF-κB signaling-mediated activation of WNK-SPAK-NKCC1 cascade in worsened stroke outcomes of Ang II-hypertensive mice. Stroke 53(5):1720–1734

Bonefeld BE, Elfving B, Wegener G (2008) Reference genes for normalization: a study of rat brain tissue. Synapse 62(4):302–309

Caillard O, Ben-Ari Y, Gaïarsa JL (1999) Mechanisms of induction and expression of long-term depression at GABAergic synapses in the neonatal rat hippocampus. J Neurosci 19(17):7568–7577

Cancedda L, Fiumelli H, Chen K1, Poo MM (2007) Excitatory GABA action is essential for morphological maturation of cortical neurons in vivo. J Neurosci 27(19):5224–5235

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(39):15488–15503

Chen P, Hu JJ, Liu Y, Cao B, Song XJ (2025) VCP controls KCC2 degradation through FAF1 recruitment and accelerates emergence from anesthesia. Proc Natl Acad Sci USA 122(1):e2414016122

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(48):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: Tang X (ed) Neuronal chloride transporters in health and disease. Academic Press, pp 133–158

Chi G, Ebenhoch R, Man H, Tang H, Tremblay LE, Reggiano G, Qiu X, Bohstedt T, Liko I, Almeida FG et al (2021) Phospho-regulation, nucleotide binding and ion access control in potassium-chloride cotransporters. EMBO J 40:e107294

Côme E, Heubl M, Schwartz EJ, Poncer JC, Lévi S (2019) Reciprocal regulation of KCC2 trafficking and synaptic activity. Front Cell Neurosci 13:48

Coull JA, Boudreau D, Bachand K, Prescott SA, Nault F, Sik 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(6951):938–942

Delpire E, Gagnon KB (2007) Genome-wide analysis of SPAK/OSR1 binding motifs. Physiol Genomics 28(2):223–231

Donneger F, Zanin A, Besson J, Roussel D, Kadiri Y, Pagan C, Sinha M, David N, Russeau M, Bielle F et al (2026) Enhancing KCC2 function reduces interictal activity and prevents seizures in temporal lobe epilepsy. Proc Natl Acad Sci USA 123(10):e2522722123

Dubois CJ, Cardoit L, Schwarz V, Markkanen M, Airaksinen MS, Uvarov P, Simmers J, Thoby-Brisson M (2018) Role of the K+-Cl- cotransporter KCC2a isoform in mammalian respiration at birth. eNeuro 5(5):ENEURO.0264-18.2018

Friedel P, Kahle KT, Zhang J, Hertz N, Pisella LI, Buhler E, Schaller F, Duan J, Khanna AR, Bishop PN et al (2015) WNK1-regulated inhibitory phosphorylation of the KCC2 cotransporter maintains the depolarizing action of GABA in immature neurons. Sci Signal 8(383):ra65

Friedel P, Ludwig A, Pellegrino C, Agez M, Jawhari A, Rivera C, Medina I (2017) A novel view on the role of intracellular tails in surface delivery of the potassium-chloride cotransporter KCC2. eNeuro 4(4):ENEURO.0055-17.2017

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

© The Author(s)

postsynaptic AMPA receptor content and lateral diffusion in dendritic spines. Proc Natl Acad Sci USA 108(37):15474–15479

Gong Y, Wu M, Gao F, Shi M, Gu H, Gao R, Dang BQ, Chen G (2021) Inhibition of the p-SPAK/p-NKCC1 signaling pathway protects the blood-brain barrier and reduces neuronal apoptosis in a rat model of surgical brain injury. Mol Med Rep 24(4):717

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.e107

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(12):2205–2217

Hartmann AM, Nothwang HG (2022) NKCC1 and KCC2: structural insights into phospho-regulation. Front Mol Neurosci 15:964488

Heubl M, Zhang J, Pressey JC, Al Awabdh S, Renner M, Gomez-Castro F, Moutkine I, Eugène E, Russeau M, Kahle KT et al (2017) GABAA receptor dependent synaptic inhibition rapidly tunes KCC2 activity via the Cl-sensitive WNK1 kinase. Nat Commun 8(1):1776

Hinz L, Torrella Barrufet J, Heine VM (2019) KCC2 expression levels are reduced in post mortem brain tissue of Rett syndrome patients. Acta Neuropathol Commun 7(1):196

Hu JJ, Liu Y, Yao H, Cao B, Liao H, Yang R, Chen P, Song XJ (2023) Emergence of consciousness from anesthesia through ubiquitin degradation of KCC2 in the ventral posteromedial nucleus of the thalamus. Nat Neurosci 26(5):751–764

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(37):9866–9873

Hübner CA, Stein V, Hermans-Borgmeyer I, Meyer T, Ballanyi K, Jentsch TJ (2001) Disruption of KCC2 reveals an essential role of K-Cl cotransport already in early synaptic inhibition. Neuron 30(2):515–5240

Inoue K, Yamada J, Ueno S, Fukuda A (2006) Brain-type creatine kinase activates neuron-specific K+-Cl- co-transporter KCC2. J Neurochem 96(2):598–608

Inoue K, Furukawa T, Kumada T, Yamada J, Wang T, Inoue R, Fukuda A (2012) Taurine inhibits K+-Cl- cotransporter KCC2 to regulate embryonic Cl- homeostasis via with-no-lysine (WNK) protein kinase signaling pathway. JBC 287(25):20839–20850

Ivakine EA, Acton BA, Mahadevan V, Ormond J, Tang M, Pressey JC, Huang MY, Ng D, Delpire E, Salter MW et al (2013) Neto2 is a KCC2 interacting protein required for neuronal Cl- regulation in hippocampal neurons. Proc Natl Acad Sci USA 110(9):3561–3566

Kahle KT, Deeb TZ, Puskarjov M, Silayeva L, Liang B, Kaila K, Moss SJ (2013) Modulation of neuronal activity by phosphorylation of the K-Cl cotransporter KCC2. Trends Neurosci 36(12):726–737

Kaila K, Price TJ, Payne JA, Puskarjov M, Voipio J (2014) Cation-chloride cotransporters in neuronal development, plasticity and disease. Nat Rev Neurosci 15(10):637–654

Keramidis I, McAllister BB, Bourbonnais J, Wang F, Isabel D, Rezaei E, Sansonetti R, Degagne P, Hamel JP, Nazari M et al (2023) Restoring neuronal chloride extrusion reverses cognitive decline linked to Alzheimer's disease mutations. Brain 146(12):4903–4915

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(18):4635–4639

Kittler JT, Delmas P, Jovanovic JN, Brown DA, Smart TG, Moss SJ (2000) Constitutive endocytosis of GABAA receptors by an association with the adaptin AP2 complex modulates inhibitory synaptic currents in hippocampal neurons. J Neurosci 20(21):7972–7977

Lee HH, Jurd R, Moss SJ (2010) Tyrosine phosphorylation regulates the membrane trafficking of the potassium chloride co-transporter KCC2. Mol Cell Neurosci 45(2):173–179

Li H, Khirug S, Cai C, Ludwig A, Blaesse P, Kolikova J, Afzalov R, Coleman SK, Lauri S, Airaksinen MS et al (2007) KCC2 interacts with the dendritic cytoskeleton to promote spine development. Neuron 56(6):1019–1033

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 beta-PIX. JCB 209(5):671–686

Mahadevan V, Khademullah CS, Dargaei Z, Chevrier J, Uvarov P, Kwan J, Bagshaw RD, 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

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(8):1897–1914

Markkanen M, Ludwig A, Khirug S, Pryazhnikov E, Soni S, Khiroug L, Delpire E, Rivera C, Airaksinen MS, Uvarov P (2017) Implications of the N-terminal heterogeneity for the neuronal K-Cl cotransporter KCC2 function. Brain Res 1675:87–101

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(4):e48880

Piechotta K, Lu J, Delpire E (2002) Cation chloride cotransporters interact with the stress-related kinases Ste20-related proline-alanine-rich kinase (SPAK) and oxidative stress response 1 (OSR1). JBC 277(52):50812–50819

Pressey JC, de Saint-Rome M, Raveendran VA, Woodin MA (2023) Chloride transporters controlling neuronal excitability. Physiol Rev 103(2):1095–1135

Puskarjov M, Ahmad F, Kaila K, Blaesse P (2012) Activity-dependent cleavage of the K-Cl cotransporter KCC2 mediated by calcium-activated protease calpain. J Neurosci 32(33):11356–11364

Raimondo JV, Markram H, Akerman CJ (2012) Short-term ionic plasticity at GABAergic synapses. Front Synaptic Neurosci 4:5

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(6716):251–255

Rivera C, Voipio J, Thomas-Crusells J, Li H, Emri Z, Sipila 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(19):4683–4691

Simonnet C, Sinha M, Goutierre M, Moutkine I, Daumas S, Poncer JC (2023) Silencing KCC2 in mouse dorsal hippocampus compromises spatial and contextual memory. Neuropsychopharmacology 48(7):1067–1077

Smalley JL, Kontou G, Choi C, Ren Q, Albrecht D, Abiraman K, Santos MAR, Bope CE, Deeb TZ, Davies PA et al (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

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. JBC 282(42):30570–30576

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. JBC 284(20):13696–13704

Virtanen MA, Uvarov P, Mavrovic M, Poncer JC, Kaila K (2021) The multifaceted roles of KCC2 in cortical development. Trends Neurosci 44(5):378–392

Wang DD, Kriegstein AR (2008) GABA regulates excitatory synapse formation in the neocortex via NMDA receptor activation. J Neurosci 28(21):5547–5558

 © The Author(s)

Watanabe M, Wake H, Moorhouse AJ, Nabekura J (2009) Clustering of neuronal K+-Cl- cotransporters in lipid rafts by tyrosine phosphorylation. JBC 284(41):27980–27988

Woo NS, Lu J, England R, McClellan R, Dufour S, Mount DB, Deutch AY, Lovinger DM, Delpire E (2002) Hyperexcitability and epilepsy associated with disruption of the mouse neuronal-specific K-Cl cotransporter gene. Hippocampus 12(2):258–268

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(10):1769–1779

Acknowledgements

The authors wish to warmly thank Pavel Uvarov for advice, technical help, and critical reading of the manuscript, and Muriel Thoby-Brisson for providing brain samples from KCC2a-KO and WT mice. We are grateful to the Imaging Facility of the Institut du Fer à Moulin for assistance with confocal imaging and data analysis, and the ICMQuant core facility (RRID: SCR_026393) of the Paris Brain Institute for access to Imaris software. We also thank the Paris Brain Institute Cellular Engineering and Vectorology ICV Core Facility (RRID: SCR_028048) for providing hippocampal cultures for additional experiments. PW was the recipient of a scholarship from the Erasmus Mundus program. This work was supported in part by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-21-NEU2-0007-02 and ANR-21-CE16-0006-03), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), and the Paris Brain Institute. The Poncer lab is affiliated with DIM C-BRAINS, supported by the Conseil Régional d'Île-de-France.

Author contributions

Carla Pagan: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Investigation; Visualization; Methodology; Writing—original draft. **Pauline Weinzettl**: Data curation; Formal analysis; Investigation; Methodology; Writing—review and editing. **Marika A Markkanen**: Resources; Methodology. **Marion Russeau**: Methodology. **Matti S Airaksinen**: Resources; Methodology; Writing—review and editing. **Jean Christophe Poncer**: Conceptualization; Supervision; Funding acquisition; Validation; Writing—original draft; Project administration; Writing—review and editing.

Source data underlying figure panels in this paper may have individual authorship assigned. Where available, figure panel/source data authorship is listed in the following database record: biostudies:S-SCDT-10_1038-S44319-026-00920-3.

Disclosure and competing interests statement

The authors declare no competing interests.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/. Creative Commons Public Domain Dedication waiver http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/ applies to the data associated with this article, unless otherwise stated in a credit line to the data, but does not extend to the graphical or creative elements of illustrations, charts, or figures. This waiver removes legal barriers to the re-use and mining of research data. According to standard scholarly practice, it is recommended to provide appropriate citation and attribution whenever technically possible.

© The Author(s) 2026

Expanded View Figures

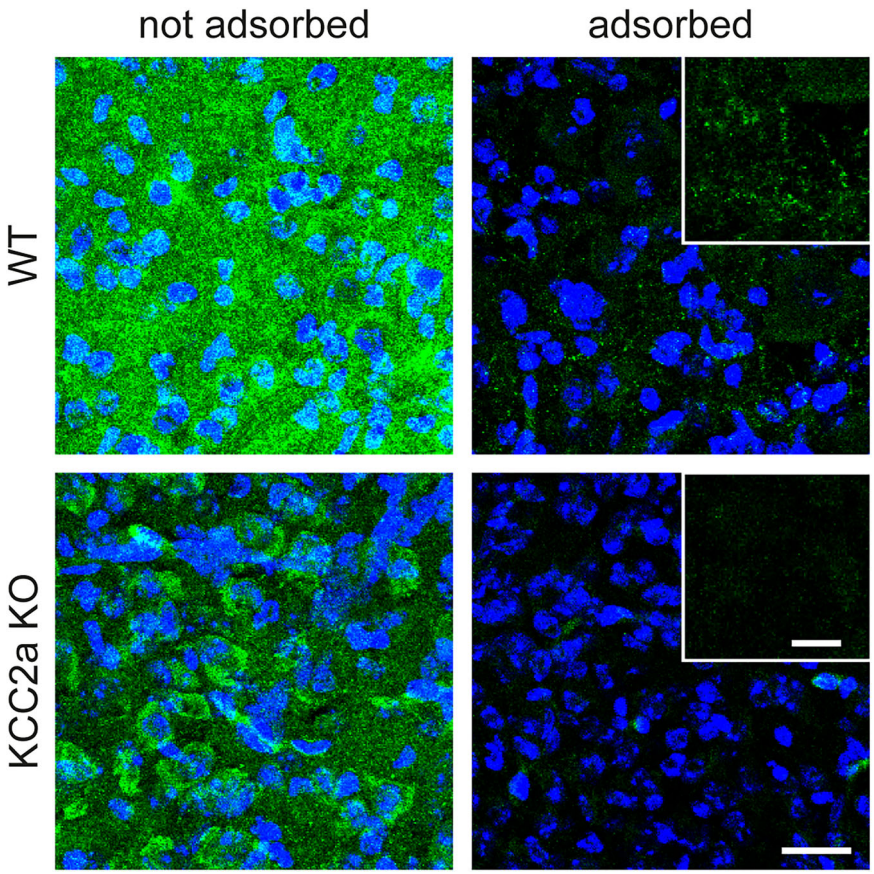


Figure EV1. Specificity of the anti-KCC2a antibody (related to Fig. 1).

Representative confocal maximum projection images of the brainstem from wild-type (WT) and KCC2a-knockout (KCC2a-KO) P9 pups. The sections were immunostained with our anti-KCC2a antibody (green), which was either pre-adsorbed on KCC2a-KO mice brainstems (right) or not pre-adsorbed (left), and then stained with DAPI (blue). Using pre-adsorbed anti-KCC2a antibody greatly reduces nonspecific background staining compared to non-pre-adsorbed antibody. The insets show KCC2a-specific immunostaining in WT but not KCC2a KO samples, at higher magnification. Scale: 20 µm and 10 µm (insets). Two animals per condition, 2 technical replicates.

© The Author(s)

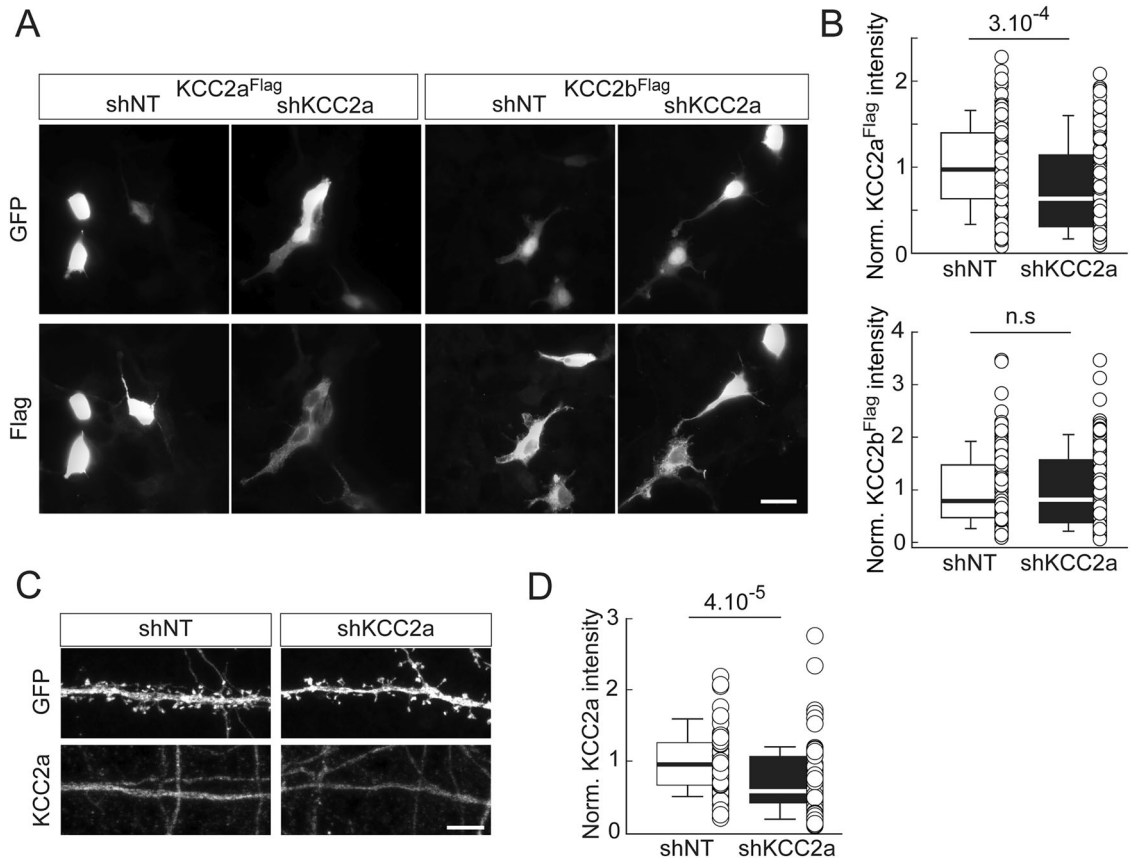


Figure EV2. Specificity of KCC2a knockdown in heterologous cells and hippocampal neurons (related to Fig. 2).

(**A**) Representative epifluorescence images of HEK-293 cells transfected with plasmids encoding either shNT or shKCC2a and either KCC2a-Flag or KCC2b-Flag. Cells were immunostained for Flag and GFP. Scale: 20 µm. (**B**) Summary boxplot showing the intensity of Flag immunostaining in HEK-293 cells expressing scrambled (shNT) or KCC2a-specific (shKCC2a) shRNAs and recombinant KCC2a-Flag (left) or KCC2b-Flag (right). shNT KCC2a-Flag, $n = 131$; shKCC2a KCC2a-Flag, $n = 126$; shNT KCC2b-Flag, $n = 155$; shKCC2a KCC2b-Flag, $n = 153$ cells, from three independent cultures. Mann–Whitney rank-sum test. All data are normalized to the corresponding shNT. (**C**) Representative confocal maximum projection images of dendritic sections of neurons transfected with plasmids encoding shNT or shKCC2a and immunostained for endogenous KCC2a. Scale: 5 µm. (**D**) Boxplot showing the intensity of endogenous KCC2a immunofluorescence in neurons transfected with shNT or shKCC2a_1 + 3. shNT, $n = 73$; shKCC2a, $n = 74$ cells, from five independent cultures (mean effect per culture: −38%, +17%, −13%, −41%, −76%). Mann–Whitney rank-sum test. Box plots show the median (centre line), the 25th and 75th percentiles (box bounds) and the 10th and 90th percentiles (whiskers); all individual data points, including minima and maxima, are displayed alongside the box (see "Methods"). *P* values are provided on the graphs.

© The Author(s)

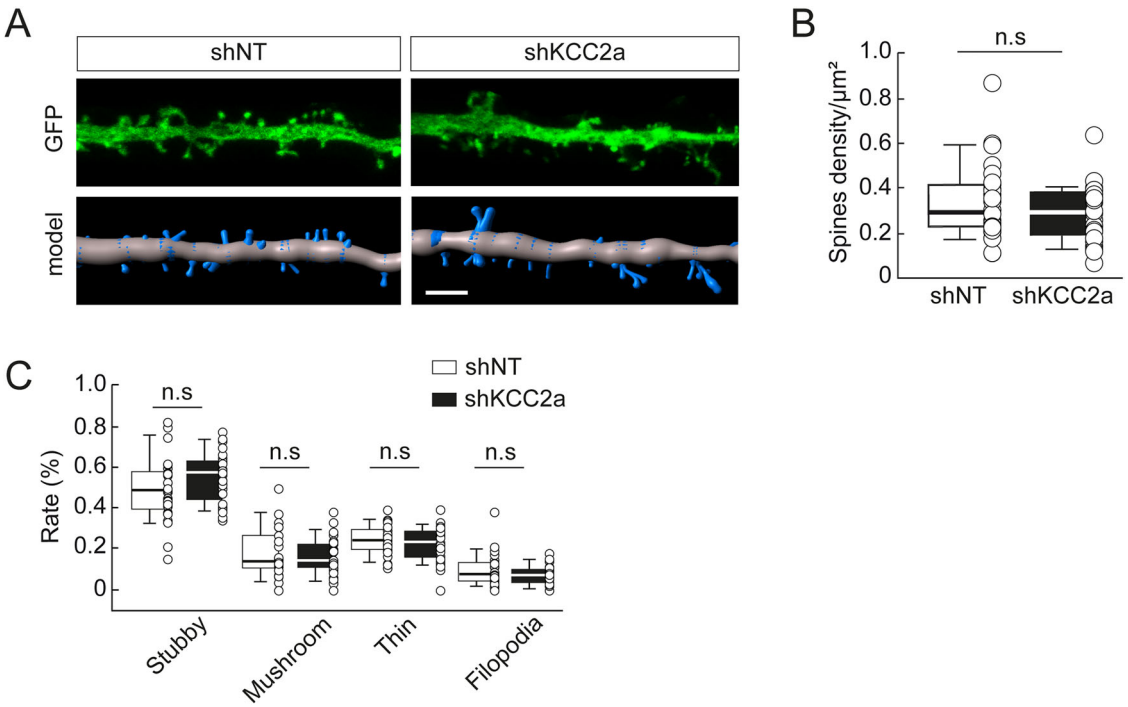


Figure EV3. KCC2a knockdown does not affect dendritic spines in mature hippocampal neurons (related to Fig. 3).

(**A**) Representative confocal maximum projection images and 3D reconstruction of dendritic sections of neurons transfected with plasmids encoding shNT or shKCC2a and immunostained for GFP. The 3D reconstruction was used for spine analysis. Scale: 3 µm. (**B**) Boxplot showing the spine density per dendrite surface area of neurons transfected with shNT or shKCC2a_1 + 3. Mann–Whitney rank-sum test. (**C**) Boxplot showing the proportion of each spine type (stubby, mushroom, long, and filopodia) within neurons transfected with plasmids encoding shNT or shKCC2a. Mann–Whitney rank-sum test, *P* value corrected for multiple comparisons using the Benjamini–Hochberg false discovery rate (FDR) procedure. Complementary linear mixed-model analyses were also performed with independent cultures as a random intercept. shNT, $n = 28$; shKCC2a, $n = 28$, from three independent cultures. Box plots show the median (centre line), the 25th and 75th percentiles (box bounds) and the 10th and 90th percentiles (whiskers); all individual data points, including minima and maxima, are displayed alongside the box (see "Methods").

© The Author(s)

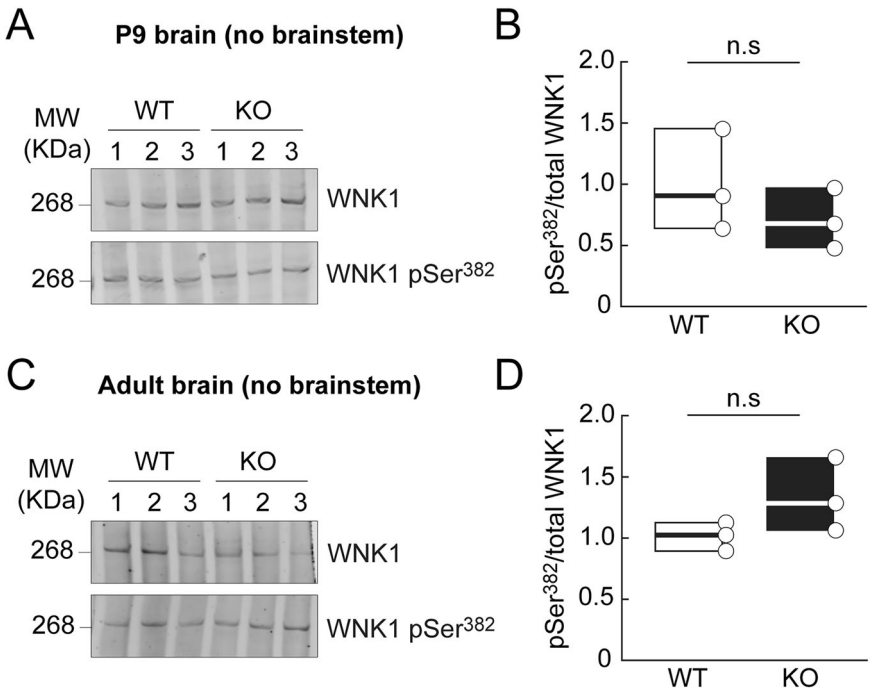


Figure EV4. KCC2a knockout does not affect WNK1 Ser382 phosphorylation (related to Fig. 6).

(**A**, **C**) Western blots of brain extracts (excluding the brainstem) from P9 and adult KCC2a-KO mice and WT littermates. Each membrane was probed for WNK1 or WNK1 Ser^{382P}. Samples which are compared derive from the same experiment and membranes were processed in parallel. (**B**, **D**) Summary boxplots showing the phosphorylated WNK1 immunofluorescence intensity normalized to WNK1 in KCC2a-KO and WT mice. All results are normalized to WT. WT, $n = 3$; KO, $n = 3$ animals; 2–3 technical replicates (for P9-adult, respectively) on the same brain extracts. Two-tailed unpaired *t* test. Samples being compared derive from the same experiment and membranes were processed in parallel. Box plots show the median (centre line) and the 25th and 75th percentiles (box bounds). With $n = 3$ per group, no whiskers are displayed and all individual data points are shown alongside the box.

© The Author(s)

Table EV1. Plasmids ratio used for transfection

Experiment	Plasmids ratio for each condition (C)
Expression and relative membrane expression of recombinant KCC2a- and KCC2b-Flag	C1: KCC2a-Flag (0.8) + EGFP (0.2) C2: KCC2b-Flag (0.8) + EGFP (0.2)
Efficacy and specificity of KCC2a-specific shRNAs	C1: shKCC2a_1-GFP (0.2) + KCC2a-Flag (0.8) C2: shKCC2a_3-GFP (0.2) + KCC2a-Flag (0.8) C3: shNT-GFP (0.2) + KCC2a-Flag (0.8) C4: shKCC2a_1-GFP (0.1) + shKCC2a_3-GFP (0.1) + KCC2a-Flag (0.8)
Effect of KCC2a knockdown on endogenous KCC2 expression	C1: shKCC2a_1-GFP (0.5) + shKCC2a_3-GFP (0.5) C2: shNT-GFP (1)
Effect of KCC2a knockdown on recombinant KCC2b expression and membrane expression	C1: shKCC2a_1-GFP (0.1) + shKCC2a_3-GFP (0.1) + KCC2b-flag (0.8) C2: shNT-GFP (0.2) + KCC2b-flag (0.8)
Effect of WNK1 activation on recombinant KCC2b membrane expression (control)	C1: WNK1-CA-GFP (0.5) + KCC2b-Flag (0.5) C2: WNK1-CA-GFP (0.45) + KCC2b-Flag (0.45) + EGFP (0.1)
Effect of WNK1 activation on recombinant KCC2b membrane expression (KCC2a knockdown)	C1: WNK1-CA (0.4) + KCC2b-Flag (0.4) + shNT (0.2) C2: WNK1-CA (0.4) + KCC2b-Flag (0.4) + shKCC2a_1-GFP (0.1) + shKCC2a_3-GFP (0.1)

Table EV2. Primary and secondary antibodies used for immunostainings

Experiment	Antibodies
Endogenous KCC2a and KCC2 expression in mature neurons	Rabbit anti-KCC2 (1:500, Millipore) Rabbit anti-KCC2a (1:750: Airaksinen lab) Donkey anti-Rabbit Cy3 (1:400, Jackson ImmunoResearch) Donkey anti-Rabbit A647 (1:400, Jackson ImmunoResearch)
Expression and relative membrane expression of recombinant KCC2a- and KCC2b-Flag Effect of KCC2a knockdown on recombinant KCC2b expression and membrane expression Effect of WNK1 activation on recombinant KCC2b membrane expression (+/- KCC2a)	Mouse anti-Flag M2 (1:1000, Sigma-Aldrich) Chicken anti-GFP (1:500, Chemicon) Donkey anti-Mouse Cy3 (1:400, Jackson ImmunoResearch) Donkey anti-Mouse A647 (1:400, Jackson ImmunoResearch) Donkey anti-Chicken A488 (1:400, Jackson ImmunoResearch)
Efficacy of KCC2a-specific shRNAs (recombinant KCC2a-Flag)	Mouse anti-Flag M2 (1:1000, Sigma-Aldrich) Donkey anti-Mouse Cy3 (1:400, Jackson ImmunoResearch)
Efficacy of KCC2a-specific shRNAs (endogenous KCC2a)	Rabbit anti-KCC2a (1:750: Airaksinen lab) Donkey anti-Rabbit Cy3 (1:400, Jackson ImmunoResearch)
Specificity of KCC2a-specific shRNAs	Mouse anti-Flag M2 (1:1000, Sigma-Aldrich) Donkey anti-Mouse A647 (1:400, Jackson ImmunoResearch)
Effect of KCC2a knockdown on endogenous KCC2 expression	Rabbit anti-KCC2 (1:500, Millipore) Donkey anti-Rabbit Cy3 (1:400, Jackson ImmunoResearch)

Table EV3. Primers used for the RT-qPCR

Variant	**Primer pair**
Variant 1 (*KCC2a*)	F: GCCACTTGTGCGATCCCG R: TCCGTGCTGTTGATGAAGGG
Variant 2 (*KCC2b*)	F: CAGCCACCATGCTCAACAAC R: TCTCTCCCCTTCTCCGTGTC
Ywhaz	F: TTGAGCAGAAGACGGAAGGT R: GAAGCATTGGGGATCAAGAA

Conclusion

Cette étude représente la première démonstration de l'existence d'une fonction spécifique de KCC2a dans le néocortex et l'hippocampe. En utilisant des cultures primaires de neurones ainsi que des cerveaux de souris délétées pour KCC2a, nous avons observé que cette isoforme joue un rôle essentiel dans la régulation de KCC2b et que sa fonction évolue au cours du développement.

Dans les neurones immatures, KCC2a favorise la phosphorylation de la thréonine 1007 de KCC2b par la voie WNK-SPAK, ce qui résulte très probablement en son inhibition, comme cela a précédemment été démontré (Friedel et al., 2015; Heubl et al., 2017). La présence d'un dispositif assurant l'inhibition de KCC2 lors des premières semaines de vie chez la souris, alors même que la protéine commence à voir son expression augmenter (Friedel et al., 2015; Rinehart et al., 2009) est probablement nécessaire pour permettre une régulation différentielle du rôle de transporteur de KCC2 et de ses fonctions non-canoniques. En effet, le maintien d'une réponse dépolarisante au GABA lors de la maturation neuronale, en partie assuré par l'inhibition de KCC2 par la voie WNK-SPAK, est essentiel pour divers processus neurodéveloppementaux dont la différenciation et la migration des neurones ou encore la formation des circuits neuronaux (Bortone & Polleux, 2009; X. Liu et al., 2005; D. D. Wang & Kriegstein, 2008). Dans le même temps, l'interaction structurelle de KCC2 avec différentes protéines est mise en jeu dans la régulation de la formation des épines dendritiques et de l'apoptose neurodéveloppementale (H. Li et al., 2007; Llano et al., 2015; Mavrovic et al., 2020). KCC2a, en favorisant la phosphorylation de KCC2b par la voie WNK-SPAK, permet de résoudre cette contradiction apparente en inhibant le transport de chlorure par KCC2b lorsque son expression débute, sans empêcher son interaction avec d'autres protéines.

Dans les neurones matures, KCC2a contribue au maintien d'une faible concentration en chlorure intracellulaire en régulant diverses propriétés qui permettent à KCC2b d'exporter cet ion, telles que son expression membranaire et son agrégation. En effet, j'ai observé que KCC2a stabilise KCC2b en inhibant son endocytose, sa poly-ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. Or, il a précédemment été démontré que la poly-ubiquitination de la fraction membranaire de KCC2 entraine son adressage à la voie ubiquitine/protéasome (P. Chen et al., 2025; Hu et al., 2023). Nous pouvons donc supposer que l'interaction entre les deux isoformes empêche, selon un mécanisme encore inconnu, la poly-ubiquitination de KCC2b, ce qui inhibe son endocytose et sa dégradation par le protéasome. J'ai aussi démontré que KCC2a est importante pour la régulation de KCC2b par la voie WNK-SPAK dans les neurones matures lorsque celle-ci est réactivée. Cette propriété pourrait avoir des implications intéressantes dans le cadre de traitements antiépileptiques (voir Discussion).

En conclusion, nous avons démontré que KCC2a permet une régulation à fois inattendue et particulièrement précise de l'expression ainsi que de la fonction de KCC2b au cours du développement cortical et chez l'adulte.

Article 2 : Potentialiser la fonction de KCC2 réduit l'activité interictale et présente un effet antiépileptique dans le cadre d'épilepsies du lobe temporal

Préface

L'épilepsie est une maladie neurologique qui concerne près de 50 millions de personnes dans le monde. Elle est définie par l'occurrence de deux crises d'épilepsie n'ayant pas de cause apparente et survenant à plus de 24 heures d'intervalle lors de la vie d'un individu, ou d'une unique crise avec un fort risque de récidive (Fisher et al., 2014). Les crises d'épilepsie sont caractérisées par une altération transitoire des fonctions neurologiques qui peut se manifester sous la forme de différents symptômes dont une absence de réponse aux stimuli externes, une perte de conscience, des contractions musculaires, etc. (Stafstrom & Carmant, 2015). Elles sont causées par une hyper-synchronisation de l'activité de certains neurones dans le cerveau (Stafstrom & Carmant, 2015). La période entre deux crises est appelée période interictale et est caractérisée par une signature électrophysiologique spécifique (Lévesque et al., 2023).

Les épilepsies peuvent être catégorisées en fonction de leur origine : génétique, structurale, infectieuse, métabolique, immune ou inconnue (Scheffer et al., 2017). Les épilepsies structurales et infectieuses sont généralement causées par un traumatisme initial (traumatisme crânien, accident vasculaire cérébral, méningite, encéphalite, *status epilepticus*, etc.), entrainant un ensemble de modifications dans le cerveau qui favorisent le développement d'une épilepsie chronique (Pitkänen & Lukasiuk, 2011). Parmi ces traumatismes, le *status epilepticus* (SE) est défini comme une crise épileptique atypique qui ne se résout pas par elle-même et nécessite un traitement médicamenteux (Trinka et al., 2015). Une crise tonico-clonique est considérée comme un SE lorsqu'elle dure plus de cinq minutes (Trinka et al., 2015). Nous estimons qu'un SE tonico-clonique provoque des dommages cérébraux à long terme lorsqu'il dure plus de trente minutes (Trinka et al., 2015).

Les épilepsies sont divisées en deux grandes catégories selon l'étendue de la région cérébrale impliquée. On parle d'épilepsie généralisée lorsque les neurones présentant une activité pathologique sont distribués dans les deux hémisphères cérébraux tandis que l'épilepsie focale est caractérisée par une hyper-synchronisation restreinte à l'un des hémisphères (Stafstrom & Carmant, 2015). L'épilepsie du lobe temporal mésial (ELTm) est la forme la plus commune d'épilepsie focale chez l'adulte (Blumcke et al., 2017). Elle est aussi l'une des formes d'épilepsie focale les plus résistantes aux traitements et peut être prise en charge, en cas d'échec des traitements antiépileptiques, par une intervention chirurgicale afin de retirer

le foyer épileptique (Marathe et al., 2021; Nayak et al., 2026). Dans le cas de l'ELTm, l'activité pathologique provient de l'hippocampe mais aussi de diverses autres structures telles que l'amygdale et le cortex entorhinal (Bernhardt et al., 2013; Lévesque et al., 2023). L'ELTm est généralement associée à une lésion de l'hippocampe et des structures temporales qui l'entourent appelée sclérose temporale mésiale, ou sclérose hippocampique (Bernhardt et al., 2013; Nayak et al., 2026). Cette lésion présente différentes caractéristiques selon son degré de sévérité dont : une mort massive des neurones pyramidaux de la corne d'Ammon et de certains interneurones hippocampiques, la dispersion des cellules en grain du gyrus denté ainsi que le bourgeonnement de leur axone, et une importante gliose (Bernhardt et al., 2013; Nayak et al., 2026).

Plusieurs études ont rapporté une diminution de l'expression de KCC2 dans l'hippocampe et les régions parahippocampiques de patients atteints d'épilepsie du lobe temporal (Huberfeld et al., 2007; Muñoz et al., 2007; Palma et al., 2006). Cette perte d'expression du transporteur est associée à l'établissement d'une transmission GABAergique dépolarisante, spécifiquement chez les neurones n'exprimant pas KCC2 (Huberfeld et al., 2007). Dans ce modèle, la restauration d'une réponse hyperpolarisante au GABA par le biais de l'incubation des tranches d'hippocampe avec un antagoniste du transporteur NKCC1 (le bumétanide) est suffisante pour abolir l'activité intérictale spontanée enregistrée *in vitro* (Huberfeld et al., 2007). Par ailleurs, d'autres études ont rapporté que la restauration d'un effet hyperpolarisant du GABA par le bumétanide bloque l'activité épileptique des neurones dans différents modèles d'ELTm (Nardou et al., 2009; Sivakumaran & Maguire, 2016), sans pour autant empêcher l'épileptogénèse (Nardou et al., 2009). Il semble donc que les changements d'expression de KCC2 et NKCC1 dans l'hippocampe de patients épileptiques, en conférant une action dépolarisante au GABA, jouent un rôle important dans l'initiation de l'activité ictale et intérictale. Il a aussi été suggéré que la perte d'expression de KCC2 dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe adulte provoque des crises d'épilepsie spontanées et entraine une sclérose hippocampique chez la souris (Kelley et al., 2018). Bien que cette dernière observation n'ait pas été reproduite et reste controversée, l'ensemble de ces résultats suggère qu'augmenter l'expression, l'enrichissement membranaire, l'agrégation et donc la fonction de KCC2 pourrait présenter un intérêt thérapeutique dans l'ELTm.

Ces dernières années, plusieurs équipes ont identifié, sur la base de criblage de banques de petites molécules, différents candidats potentialisateurs de KCC2. C'est notamment le cas de la prochlorpérazine (PCPZ), un antipsychotique dérivé de la phénothiazine, ainsi que du CLP-257, un dérivé synthétique de la thiazolone. Le potentiel antiépileptique du promédicament du CLP-257 (le CLP-290) a notamment été étudié lors de crises d'épilepsie néonatales (Sullivan

et al., 2021). En parallèle, la capacité de la PCPZ à augmenter la fonction de KCC2 a été démontrée dans un modèle de lésion de la moelle épinière (Liabeuf et al., 2017). Néanmoins, l'efficacité thérapeutique de ces molécules dans un modèle d'épilepsie du lobe temporal mésial chronique n'a jamais été testée. De même, le mécanisme précis par lequel le CLP-257 et la PCPZ potentialisent la fonction de KCC2 n'est pas connu.

Lors de ce projet, nous avons élucidé le mécanisme par lequel ces deux substances régulent KCC2 et avons testé leur effet antiépileptique dans différents modèles d'ELTm. Après avoir vérifié que le CLP-257 et la PCPZ potentialisent effectivement la fonction de KCC2, nous avons étudié le mécanisme moléculaire sous-jacent dans des cultures de neurones hippocampiques. Nous avons mis en évidence que ces deux molécules ne modifient ni l'expression, ni l'enrichissement membranaire du transporteur mais qu'elles augmentent son efficacité en favorisant son agrégation et en diminuant sa diffusion latérale. Nous avons aussi observé qu'en plus de son action sur KCC2, le CLP-257 augmente l'efficacité des récepteurs GABA-A extra-synaptiques. En enregistrant l'activité multi-unitaire de tranches d'hippocampe chirurgicalement réséquées du cerveau de patients épileptiques, nous avons mis en évidence que les deux composés diminuent fortement l'occurrence des décharges spontanées de type interictal. Enfin, nous avons démontré que l'administration de PCPZ pendant cinq semaines diminue la fréquence des crises épileptiques et des décharges de type interictal dans un modèle murin d'ELTm chronique induit par injection de pilocarpine. Similairement, l'administration de CLP-290 entraine une diminution de la fréquence des crises épileptiques dans ce modèle.

Ma contribution à cet article a été de tester l'effet du CLP-257 sur la fonction des récepteurs GABA-A dans des neurones en culture traités avec une faible concentration de cette molécule (0.7 µM).

PNAS RESEARCH ARTICLE | NEUROSCIENCE

Enhancing KCC2 function reduces interictal activity and prevents seizures in temporal lobe epilepsy

Florian Donneger[a], Adrien Zanin[a,1], Jeremy Besson[a], Delphine Roussel[b], Yoness Kadiri[a], Carla Pagan[a,b], Manisha Sinha[a], Nicolas David[a], Marion Russeau[a], Franck Bielle[b,c], Bertrand Devaux[d,1], Bertrand Mathon[b,e], Vincent Navarro[b,f], Francine Chassoux[d,1], and Jean Christophe Poncer[a,b,2]

Affiliations are included on p. 10.

Edited by Hollis Cline, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA; received August 19, 2025; accepted January 28, 2026

The neuronal K/Cl cotransporter KCC2 regulates the transmembrane chloride gradient, which controls the efficacy of GABAergic signaling. In mesial temporal lobe epilepsy (mTLE) and other neurological disorders, reduced KCC2 expression or function can result in depolarizing GABA signaling, which is thought to contribute to pathological activity and seizures. Therefore, restoring chloride homeostasis represents a promising therapeutic strategy. We investigated the mechanisms and antiseizure effects of two small molecules, prochlorperazine (PCPZ) and CLP-257, that have been identified as potential KCC2 enhancers. We found that both compounds enhance KCC2 function and clustering in cortical neurons while reducing its membrane diffusion, without altering canonical regulatory phosphorylation. CLP-257 also selectively increased extrasynaptic, but not synaptic, $GABA_A$ receptor-mediated currents. Using in vitro recordings from resected brain tissue of patients with drug-resistant mTLE and in vivo recordings from a mouse model, we show that PCPZ and CLP-257 (or its prodrug CLP-290) effectively suppressed spontaneous epileptiform activity in both models. These findings reveal that PCPZ and CLP-257 act as genuine KCC2 enhancers and provide experimental evidence of the therapeutic potential of such compounds for treating drug-resistant mTLE.

chloride transporter | neuropharmacology | hippocampus | resective brain tissue | animal models

Significance

A major challenge in treating epilepsy is the high percentage of patients with drug-resistant forms, like mesial temporal lobe epilepsy (mTLE). This study investigates a therapeutic strategy targeting the neuronal KCC2 transporter, which is often dysfunctional in epilepsy. Our findings identify two compounds, prochlorperazine and CLP-257, that enhance KCC2 function by promoting its clustering on the cell membrane, a previously uncharacterized mechanism. Importantly, these compounds effectively reduce spontaneous epileptiform activity in human brain tissue from mTLE patients and significantly reduce seizure frequency in a mouse model. This work provides a critical proof-of-concept for activating KCC2 as a viable therapeutic approach for drug-resistant epilepsy.

Epilepsy is one of the most common neurological disorders, affecting over 65 million people worldwide (1). Mesial temporal lobe epilepsy (mTLE), the most frequent form of focal epilepsy in adults, is frequently associated with hippocampal sclerosis and often refractory to antiseizure medications (2). Surgical resection of the epileptic focus provides 60 to 75% seizure control at 2 y (3), but not all patients are candidates, and the procedure carries cognitive risks. Moreover, less than 50% of patients remain seizure-free 10 y after surgery (4), highlighting the need for novel therapeutic strategies.

Pharmacoresistant epilepsies, including mTLE, often show altered expression and function of cation-chloride cotransporters (CCCs) that regulate transmembrane chloride gradients (5–10). In neurons, the potassium–chloride cotransporter KCC2 maintains low intracellular chloride, allowing hyperpolarizing inhibition via chloride-permeable $GABA_A$ receptors ($GABA_A$Rs) (11). Reduced KCC2 expression and function, commonly reported in mTLE (5, 9, 12) (but see ref. 13) elevates intraneuronal chloride and can compromise or reverse the driving force for $GABA_A$Rs (5, 14, 15). Depolarizing and excitatory GABA signaling may then paradoxically enhance neuronal activity and promote the abnormal synchronization underlying epileptiform activities (16–18). Accordingly, pharmacological rescue of chloride homeostasis with bumetanide, an antagonist of the chloride importer NKCC1, suppresses interictal-like activity in human mTLE tissue in vitro (5). Similarly, mutations enhancing KCC2 membrane stability and function (19) or overexpression of recombinant KCC2 (20) reduce acute seizures in animal models. Compensating for CCC dysfunction therefore appears to be a promising therapeutic strategy in pharmacoresistant epilepsy.

However, bumetanide failed to prevent acute neonatal seizures in two clinical trials and induced side effects due to peripheral NKCC1 expression (21, 22). Enhancing the function of the neuron-specific chloride extruder KCC2 is therefore a more selective alternative. Recent high-throughput screens have identified several KCC2 enhancers in heterologous systems (23–25). Among them, the phenothiazine-derived antipsychotic prochlorperazine (PCPZ) and the arylmethylidine family compounds CLP-257 and CLP-290 improved symptoms in animal models of disorders associated with KCC2 downregulation (24, 26–30). Yet, their mechanisms of action remain unknown, and their efficacy and selectivity toward KCC2 is debated (31, 32). In addition, CLP-257 has

Author contributions: F.D. and J.C.P. designed research; F.D., A.Z., J.B., D.R., C.P., and M.S. performed research; Y.K., N.D., M.R., F.B., B.D., B.M., V.N., and F.C. contributed new reagents/analytic tools; F.D., A.Z., J.B., D.R., C.P., M.S., and J.C.P. analyzed data; and F.D. and J.C.P. wrote the paper.

Competing interest statement: F.D., A.Z., and J.C.P. are co-inventors on the patent: Methods and Pharmaceutical Compositions for Treating Refractory Epilepsy. WO2022219021, 2022 October.

This article is a PNAS Direct Submission.

Copyright © 2026 the Author(s). Published by PNAS. This article is distributed under Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License 4.0 (CC BY-NC-ND).

[1]Present address: Neurosurgery Department, Lariboisière Hospital, Paris 75010, France.

[2]To whom correspondence may be addressed. Email: j-c.poncer@icm-institute.org.

This article contains supporting information online at https://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.2522722123/-/DCSupplemental.

Published March 3, 2026.

shown conflicting effects on epileptiform activity in vitro (33, 34), and has mostly been tested in acute seizures such as *status epilepticus* (35, 36), or phenobarbital-resistant neonatal seizures (29). Only one study tested CLP-290 on epileptogenesis in a chronic epilepsy model, but the reported events lacked clear electrographic features of seizures, raising doubts about efficacy (37). Thus, the impact of KCC2 enhancers on spontaneous chronic seizures in mTLE remains uncertain, and completely unknown in the case of PCPZ.

Here, we first investigated the mode of action and efficacy of PCPZ and CLP-257 on KCC2 in rat hippocampal neurons. Both compounds enhanced KCC2 function, and CLP-257 also acted as a positive allosteric modulator of extrasynaptic but not synaptic $GABA_A$Rs. Both PCPZ and CLP-257 reduced KCC2 membrane diffusion and increased clustering, without altering total or plasmalemmal KCC2 expression levels, or phosphorylation of canonical regulatory sites. In postoperative human mTLE tissue, both suppressed spontaneous interictal-like discharges. Finally, chronic administration of PCPZ or CLP-290 reduced seizure frequency in a lithium-pilocarpine mouse model of mTLE. Together, our findings reveal the mechanisms and therapeutic potential of two KCC2 enhancers in drug-resistant mTLE.

Results

PCPZ and CLP-257 Act as KCC2 Enhancers in Rat Hippocampal Neurons. We first tested whether PCPZ and CLP-257, two candidate KCC2 enhancers (23, 24), potentiate KCC2 in rat hippocampal neurons in vitro. To assess KCC2 function, we measured the somato-dendritic gradient of GABA reversal potential (ΔE_{GABA}) using whole cell recordings with a defined intracellular chloride concentration of 29 mM (Fig. 1). $GABA_A$ receptors were locally activated by Rubi-GABA uncaging at the soma and along the dendrites (50 to 80 µm from the soma) in CLP 257 experiments, or by brief isoguvacine application for PCPZ, as we found that PCPZ was phototoxic to neurons upon exposure to UV light (*Material and Methods* and *SI Appendix*, Fig. S1). This assay imposes a controlled chloride load on the neuron, providing a dynamic, quantitative, and specific readout of KCC2-mediated chloride transport. Its specificity is supported by the observation that the gradient is abolished upon KCC2 inhibition but remains unaffected by blockade of the chloride importer NKCC1 (38–40). Compared with gramicidin perforated patch recordings, which only report steady state E_{GABA}, the ΔE_{GABA} assay offers greater sensitivity and specificity for detecting changes in KCC2 function.

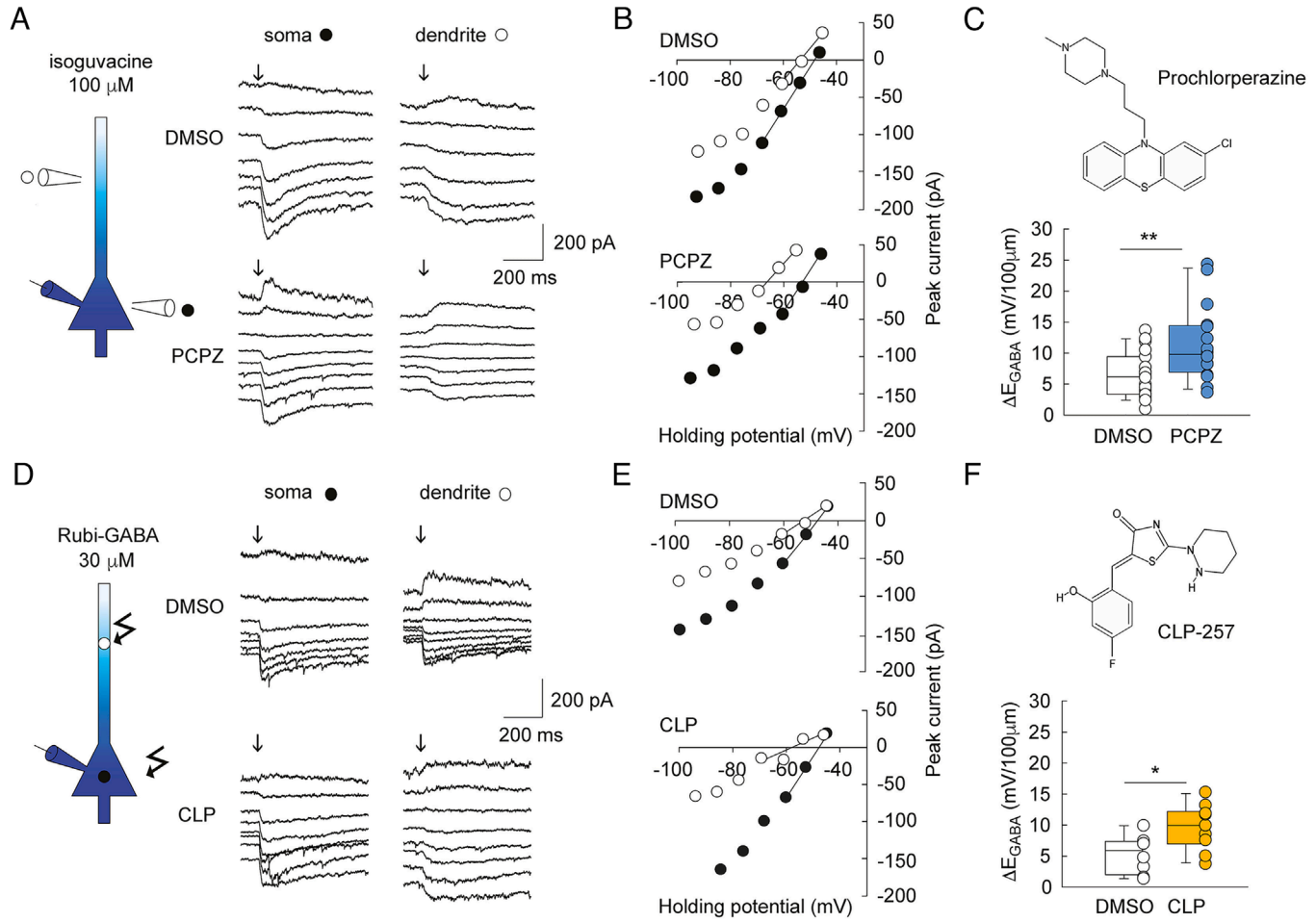


Fig. 1. Prochlorperazine (PCPZ) and CLP-257 promote chloride extrusion in hippocampal neurons. (*A*) Representative currents evoked at varying potentials by focal application of isoguvacine (arrow, 100 µM) onto the soma or dendrite of hippocampal neurons (21-24 DIV) previously treated for 2 h with either vehicle only (DMSO, control) or PCPZ (10 µM). (*B*) I-V curves corresponding to the traces shown in *A*. (*C*) 2D chemical structure of PCPZ (*Top*) and summary graph showing somato-dendritic E_{GABA} gradient (*Bottom*, ΔE_{GABA}) in control and PCPZ-treated neurons (n = 19 neurons and n = 16 neurons respectively, from five independent cultures). ***t* test $P < 0.01$. (*D* and *E*) same as in *A* and *B*, with currents evoked at varying potentials by focal uncaging of Rubi-GABA (arrow, 30 µM) onto the soma or dendrite of hippocampal neurons, pretreated for 2 h with either DMSO alone or 7 µM CLP-257 in DMSO. (*F*) 2D chemical structure of CLP-257 (*Top*) and summary graph showing ΔE_{GABA} (*Bottom*) in control and CLP-treated neurons (n = 8 and 10 neurons, respectively, from four independent cultures) **t* test $P < 0.05$.

The concentrations of PCPZ (10 μM) and CLP-257 (7 μM) used in these experiments were selected based on effective concentrations reported in previous studies (23, 24). We performed a 2-h treatment with CLP-257 or PCPZ, a paradigm used in previous studies with CLP-257 (23, 41). The mean somato-dendritic ΔE_{GABA} was 6.6 ± 0.8 mV/100 μm in control neurons (DMSO). In neurons preincubated with PCPZ (10 μM), this gradient was significantly increased to 11.5 ± 1.5 mV/100 μm (P = 0.006; Fig. 1 *A–C*). Similarly, preincubation with CLP-257 (7 μM) increased ΔE_{GABA} from 5.3 ± 1.1 to 9.7 ± 1.1 mV/100 μm (P = 0.014) (Fig. 1 *D–F*). Neither compound had any effect on neuronal membrane resistance or series resistance, or $GABA_AR$ conductance (*SI Appendix*, Fig. S2). These data demonstrate that both PCPZ and CLP-257 effectively potentiate KCC2 function in rat hippocampal neurons.

CLP-257 But Not PCPZ Directly Modulates $GABA_A$ Receptor Function. CLP-257 has been suggested to act directly to potentiate $GABA_AR$s (31) (but see ref. 32). Because $GABA_AR$-mediated chloride fluxes modulate KCC2 membrane expression and function (42), we asked whether PCPZ and CLP-257 might act primarily to modulate $GABA_AR$ function. We tested their effect on $GABA_AR$-mediated currents, using focal application of isoguvacine (100 μM) or uncaging of Rubi-GABA at low concentration (30 μM), respectively (Fig. 2). PCPZ had no significant effect on the amplitude (157.5 ± 25.4 vs. 150.7 ± 17.5 pA for control, P = 0.48) or decay time constant (130.8 ± 10.5 vs. 127.7 ± 10.2 ms, P = 0.362) of $GABA_AR$-mediated currents (Fig. 2 *A* and *B*). In contrast, CLP-257 rapidly increased their decay time constant (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; Fig. 2 *C* and *D*). This effect of CLP-257 was still observed, albeit weaker, at a 10-fold lower concentration (0.7 μM; 294.1 ± 33.8 ms vs. 239.7 ± 27.2 ms, P < 0.001; *SI Appendix*, Fig. S3). This concentration is close to the reported EC_{50} for KCC2 (0.65 μM) (23).

We next tested the effect of PCPZ and CLP-257 specifically on synaptic $GABA_AR$s, by recording miniature inhibitory postsynaptic currents (mIPSCs) from hippocampal neurons. Neither PCPZ nor CLP-257 had detectable effects on mIPSC amplitude

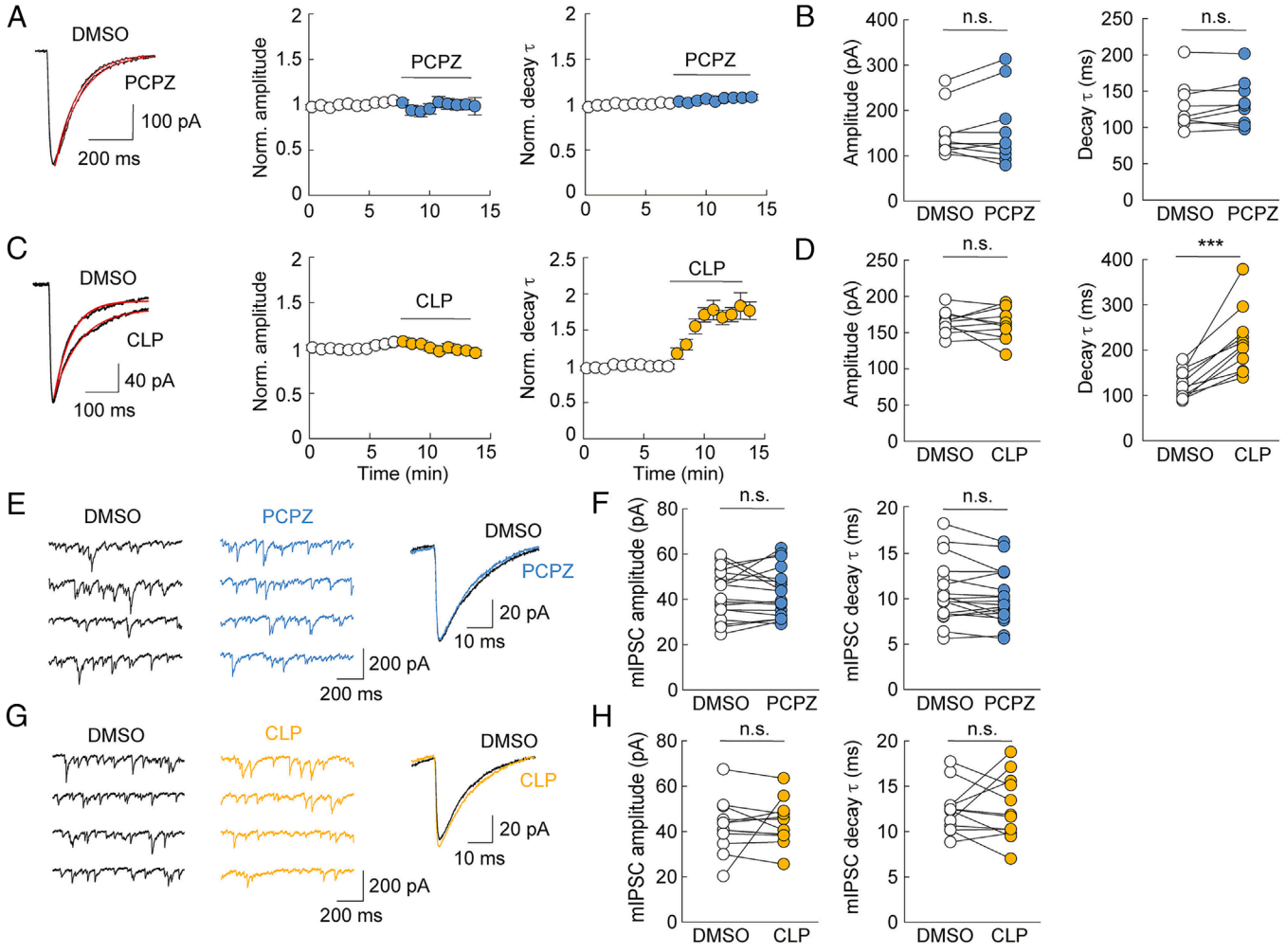


Fig. 2. CLP-257 but not PCPZ modulates $GABA_A$ receptor function. (*A*, *Left*) Representative recording of currents evoked by focal somatic application of isoguvacine before and during acute application of 10 μM PCPZ. Evoked currents were averaged, and their decay was fit with a simple exponential (red). (*Right*) Normalized amplitude and decay time constant over time of evoked currents. (*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 two independent cultures). (*C* and *D*) Same as in *A* and *B* for currents evoked by Rubi-GABA (30 μM) uncaging before and during application of 7 μM CLP-257 (n = 11 neurons each from two independent cultures. *** Wilcoxon test, P < 0.001). (*E*, *Left*) Representative 5-s mIPSC recording before (DMSO) and during application of PCPZ. (*Right*) superimposed averaged mIPSCs detected from this recording. (*F*) Summary graphs showing the effect of PCPZ application on the amplitude (*Left*) and decay time constant (*Right*) of mIPSCs (n = 18 neurons each from four independent cultures. *** Wilcoxon test, P < 0.001). (*G* and *H*) Same as *E* and *F* for CLP-257 showing no effect of CLP-257 on mIPSC amplitude and decay time (n = 12 neurons each from four independent cultures. n.s.: not significant).

(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; Fig. 2 *E–H*). Taken together, these results demonstrate that while both PCPZ and CLP-257 potentiate KCC2 function, CLP-257 also acts to specifically potentiate high-affinity, presumably extrasynaptic but not synaptic $GABA_AR$ function in a benzodiazepine-like manner in rat hippocampal neurons.

PCPZ and CLP-257 Promote KCC2 Clustering and Confinement without Altering KCC2 Expression Levels. We then investigated the mechanisms underlying the potentiation of KCC2 by PCPZ and CLP-257. Enhancement of KCC2 function may result from either increased intrinsic enzymatic activity, increased membrane expression or dimerization of the transporter, or a combination of these factors (43). Therefore, we used surface biotinylation to test whether PCPZ or CLP-257 affects plasmalemmal KCC2 expression. Incubation with PCPZ or CLP-257 for 2 h had no significant effect on total KCC2 expression (Fig. 3*A*, $P = 0.137$ and $P = 0.893$, respectively) or on the ratio of surface to total expression (Fig. 3*B*, $P = 0.735$ and $P = 0.8$, respectively). In addition, PCPZ or CLP-257 had no significant effect on KCC2 dimerization, as measured by the ratio of KCC2 dimers to monomers (surface fraction: $P = 0.492$ and $P = 0.264$ respectively, total fraction: $P = 0.383$ and $P = 0.216$ respectively; *SI Appendix*, Fig. S4). Thus, enhanced KCC2 function by PCPZ or CLP-257 does not reflect an increased expression or dimerization of the transporter. PCPZ and CLP-257 also had no effect on total NKCC1 expression ($P = 0.102$ and $P = 0.602$, respectively) or on the ratio of surface to total NKCC1 expression ($P = 0.266$ and $P = 0.495$, respectively; *SI Appendix*, Fig. S5).

KCC2 function is regulated by fine-tuning of its diffusion and clustering properties at the plasma membrane (44). Thus, the

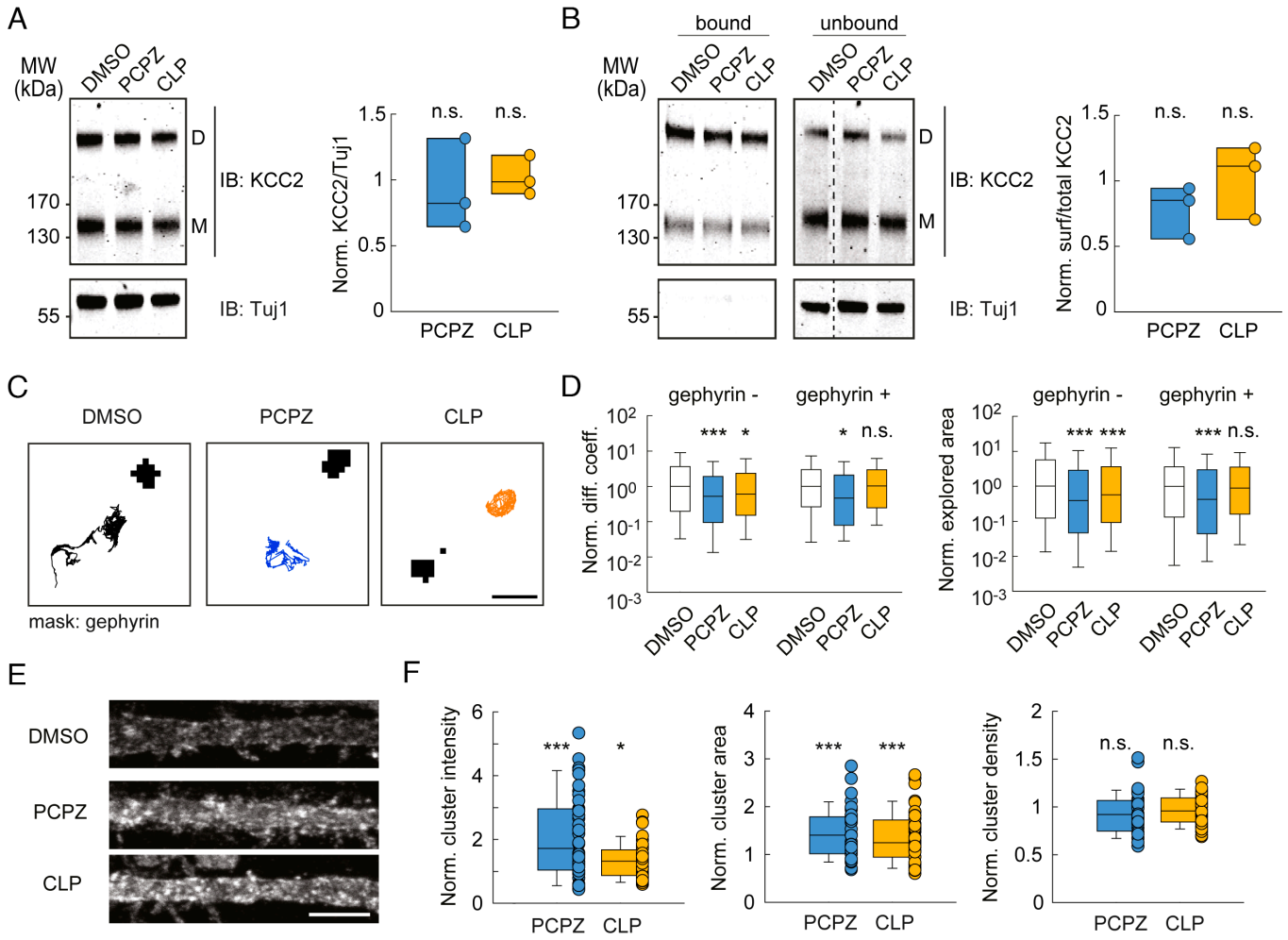


Fig. 3. Both PCPZ and CLP-257 reduce KCC2 membrane diffusion and promote its clustering in hippocampal neurons. (*A*, *Left*) representative immunoblots of protein extracts from primary hippocampal cultures treated for 2 h with either PCPZ (10 μM), CLP-257 (7 μM), or DMSO alone. (*Right*) Quantification from three independent experiments. No significant change in total KCC2 expression was detected upon PCPZ or CLP-257 treatment as compared to control (*t* test $P = 0.14$ and $P = 0.89$, respectively). (*B*) Representative immunoblots (*Left*) and quantification (*Right*) showing biotinylated surface KCC2 fraction (bound/total) was also unaffected upon PCPZ or CLP-257 treatment (n = 3 independent cultures, *t* test $P = 0.74$ and 0.80, respectively). (*C*) Representative trajectories of recombinant KCC2 (black) outside inhibitory synapses (gephyrin-FingR mask, gray), as detected using quantum dot-based single particle tracking, showing reduced lateral diffusion upon treatment with PCPZ or CLP-257. Scale, 1 μm. (*D*) Logarithmic distributions of median diffusion coefficients (*D*) and explored areas (EA) of KCC2 trajectories, outside (gephyrin−) or in the vicinity of (gephyrin+) inhibitory synapses, in control neurons (DMSO, D extra n = 614, D syn n = 162 and EA extra n = 1,836, EA syn n = 486 quantum dots) and neurons treated for 2 h with either PCPZ (D extra n = 512, D syn = 131 and EA extra n = 1536, EA syn n = 393 quantum dots) or CLP-257 (D extra n = 697, D syn n = 179 and EA extra n = 2091, EA syn n = 537 quantum dots). Four independent cultures. Mann–Whitney test $^*P < 0.05$ $^{***}P < 0.001$. (*E*) Maximum projections of confocal images of proximal dendrites after KCC2 immunostaining in cultured hippocampal neurons treated for 2 h with PCPZ, CLP-257, 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 CLP-257. n = 10 neurons per condition per culture and 4 independent cultures per condition. *t* test or Mann–Whitney test $^*P < 0.05$ $^{***}P < 0.001$. n.s.: not significant.

potentiation of KCC2 function is often associated with decreased membrane diffusion and increased clustering (42, 45–47). Membrane lateral diffusion of recombinant Flag-tagged KCC2 was assessed in hippocampal neurons using single particle tracking with quantum dots. The lateral diffusion of KCC2 was reduced by both PCPZ and CLP-257, both in the vicinity of GABAergic synapses and outside. Thus, both compounds reduced the diffusion coefficient of recombinant KCC2 (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 CLP-257) and its 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 CLP-257; Fig. 3 *C* and *D*).

This effect was associated with an increase in KCC2 clustering, as shown by immunocytochemistry assays, which revealed increased cluster integrated 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% $P = 0.34$; Fig. 3 *E* and *F*). Notably, these effects were not observed after a 30-min application (*SI Appendix*, Fig. S6), suggesting that CLP-257 and PCPZ act slowly to promote KCC2 function. Furthermore, the effect of PCPZ, which is also a D2/D3 receptor antagonist, did not involve dopamine receptor antagonism, since a 2-h treatment with eticlopride produced a small reduction in KCC2 cluster integrated intensity (p = 0.046) and did not significantly affect cluster area or density (p = 0.546 and p = 0.140, *SI Appendix*, Fig. S7).

Taken together, our results demonstrate that PCPZ and CLP-257 increase net KCC2 function and promote its clustering without affecting total or plasmalemmal KCC2 expression levels. Therefore, PCPZ and CLP-257 likely induce a redistribution of membrane-inserted KCC2, resulting in increased clustering and function.

PCPZ and CLP-257 Do Not Affect KCC2 Phosphorylation on Canonical Regulatory Residues. The stability, clustering, and membrane turnover of KCC2 are controlled by a variety of posttranslational mechanisms, including phosphorylation of key residues, particularly in its large carboxy-terminal domain, that regulate its net transport function (43, 44, 48). Phosphorylation of serine 940 (S940) by protein kinase C is known to increase the membrane stability and function of KCC2 (45, 49). In contrast, phosphorylation of threonine residues 906 and 1,007 (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 (42, 50). We therefore asked whether PCPZ and CLP-257 could act by modulating the phosphorylation of these residues to promote KCC2 function. Immunoprecipitation assays on hippocampo-cortical slices from adult rats (Fig. 4 *A* and *B* and *SI Appendix, Supplementary Methods*) revealed no significant effect of PCPZ or CLP-257 on KCC2 phosphorylation at either S940 (+20.3 ± 18.7%, $P = 0.339$ and −19.7 ± 34.4%, $P = 0.597$), T1007 (+26.4 ± 17.0% $P = 0.195$ and −18.5 ± 17.1%, $P = 0.340$ respectively), or T906 (−10.2 ± 10.4%, $P = 0.384$ and −12.7 ± 10.9%, $P = 0.308$ respectively) residues.

Consistent with these results, PCPZ and CLP-257 also had no significant effect on the phosphorylation of the WNK effectors SPAK (S373, +36.9 ± 48.4%, $P = 0.488$ and +33.3 ± 24.0%, $P = 0.238$ respectively) and OSR1 (S325, +11.8 ± 23.5%, $P = 0.641$ and +11.5 ± 18.5%, $P = 0.568$, respectively) or their total expression levels (SPAK, −12.3 ± 6.4%, $P = 0.124$ and −6.0 ± 17.4%, $P = 0.748$, respectively; OSR1, +26.3 ± 12.8%, $P = 0.108$ and −2.2 ±8.3%, $P = 0.800$, respectively; Fig. 4 *C* and *D*). In contrast, the pan-WNK inhibitor WNK463 (51) reduced the phosphorylation of T1007 (−78.7 ±3.3%, $P < 0.001$) and to a lesser extent S940 (−14.4 ± 4.7%, $P = 0.037$) but not T906 (−13.7 ±12.5%, $P = 0.333$; Fig. 4 *A* and *B*). These effects of WNK463 were associated with decreased phosphorylation of SPAK (S373, −84.1 ± 4.6%, $P < 0.001$) and OSR1 (S325, −81.0 ± 5.6%, $P < 0.001$; Fig. 4 *C* and *D*). Thus, PCPZ and CLP-257 appear to potentiate KCC2 clustering and function independently of detectable changes in phosphorylation of serine 940 and threonine 906 and 1,007 residues. Consistent with this conclusion, these compounds showed no direct inhibitory effect on the activity of WNK1, WNK3, SPAK, or OSR1 in in vitro kinase assays (*SI Appendix*, Fig. S8).

Finally, phosphorylation of residues Y903 and Y1087 has been reported to affect KCC2 clustering and function (47, 52). Therefore, we also tested the effect of PCPZ and CLP-257 on KCC2 tyrosine phosphorylation (Fig. 4 *E* and *F*). Whereas sodium orthovanadate (Na_3VO_4), a tyrosine phosphatase inhibitor, increased KCC2 tyrosine phosphorylation (+89.1 ± 45.4%, $P = 0.029$), PCPZ, and CLP-257 showed no significant effect (+6.4 ± 14.7% and +19.0 ± 15.0%, $P = 1$ and $P = 0.343$, respectively). Taken together, our results demonstrate that PCPZ and CLP-257 potentiate KCC2 function, decrease its diffusion and increase its clustering via a mechanism independent of phosphorylation of canonical regulatory residues in its carboxy-terminal domain.

PCPZ and CLP-257 Prevent Spontaneous Interictal-Like Discharges in Human mTLE Tissue In Vitro. Human epileptic tissue therapeutically resected from patients diagnosed with mTLE provides an invaluable tool for evaluating antiseizure drug candidates in the pathophysiological context of human mTLE (53, 54). We therefore tested the effect of PCPZ and CLP-257 on 13 tissue samples resected from patients diagnosed with mTLE, 11 of which were associated with hippocampal sclerosis (HS) (*SI Appendix*, Table S1). As previously reported (5, 10), the majority of slices (29/46) prepared from 13 postoperative tissues and recorded with multielectrode arrays (MEA) under control conditions (DMSO, 2 h) showed spontaneous, low-frequency (<40 Hz) events identified as interictal-like discharges (IILDs, Fig. 5). IILDs often originated from only a small subregion of the slice, usually in the subiculum or the dentate gyrus (Fig. 5 *A* and *B* and *SI Appendix*, Table S1). In tissue preincubated with DMSO alone, IILDs had a mean amplitude of 57.3 ± 13.5 µV and occurred at a mean frequency of 0.4 ± 0.1 Hz. As observed previously (5), acute application of the NKCC1 antagonist bumetanide (10 µM) partially reduced the amplitude and frequency of IILDs (Fig. 5*B*). However, these events were almost completely abolished in slices of the same resected tissue incubated for 2 h with either 10 µM PCPZ (Fig. 5*B*) or 7 µM CLP-257 (Fig. 5*C*). Overall, both PCPZ and CLP-257 significantly reduced the proportion of slices with spontaneous IILDs ($P < 0.05$ for both; Fig. 5*F*). This effect did not reflect impaired neuronal activity, as IILD and multiunit activity could be restored in slices pretreated with PCPZ or CLP-257, by increasing neuronal excitability with high potassium/low magnesium ACSF (Fig. 5 *D* and *E*).

In slices from a group of five patients with mTLE (patients #5, 7, 8, 11, 12; group I; *SI Appendix*, Table S1), PCPZ virtually abolished IILDs (−97.6 ± 13.8% change in frequency, $P < 0.001$; Fig. 5*G*). However, in one slice from patient #3 and in the slices from patient #6 (group II) PCPZ failed to reduce the frequency of IILDs (+25.5 ± 15.9%, $P = 0.356$; Fig. 5*G*). Interestingly, neuropathologic examination of the resected tissue from patient #6 revealed an ILAE type 3 HS (*SI Appendix*, Table S1), a rarer

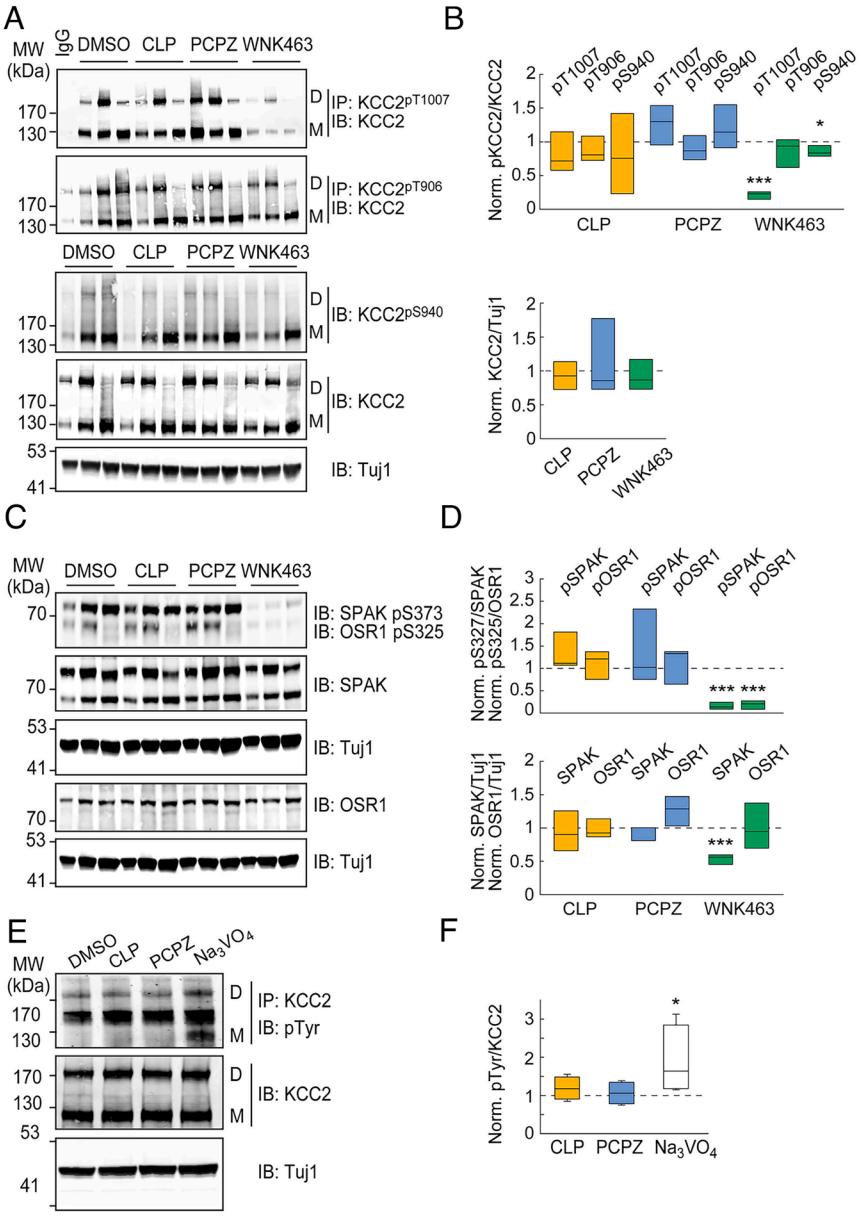


Fig. 4. PCPZ and CLP-257 do not affect phosphorylation of canonical KCC2 residues. (*A*) Immunoblots (IB) (*Left*) of protein lysates or proteins immunoprecipitated (IP) with phospho-specific KCC2 antibodies, immunoblotted with antibodies against KCC2 or pS940 KCC2 and beta-tubulin (Tuj1) as control, prepared from hippocampo-cortical slices treated for 2 h with either DMSO alone, CLP-257 (7 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 1-3). (*B*) Quantification from the three independent replicates shown in *A*. *t* test ***$P < 0.001$ (*C*) IB (*Left*) of protein lysates, prepared as in *A*, immunoblotted with antibodies against SPAK, OSR1, or their phosphorylated forms and beta-tubulin (Tuj1) as control. (*D*) Quantification from the three independent replicates in *B*. *t* test ***$P < 0.001$. (*E*) Representative IB (*Left*) of proteins immunoprecipitated with an anti-KCC2 antibody and immunoblotted with an anti-phosphotyrosine antibody, prepared from hippocampal-cortices slices treated for 2 h with either DMSO, CLP-257 (7 μM in DMSO), PCPZ (10 μM in DMSO), or sodium orthovanadate (Na_3VO_4, 200 μM). (*F*) Quantification from the four independent replicates shown in *E*. Mann–Whitney test *$P < 0.05$.

pattern of HS often associated with dual pathology (55). Similarly, preincubation with CLP-257 virtually abolished IILDs in slices from 5 out of 6 patients (–96.5 ± 2.3% change in frequency, $P < 0.001$; Fig. 5*G*). However, in slices from the remaining patient (#9, *SI Appendix*, Table S1) CLP-257 failed to reduce the frequency of IILDs (+12.6%, Fig. 5*G*). Remarkably, neuropathologic examination of this patient's postoperative tissue did not reveal hippocampal sclerosis, but rather a ganglioglioma associated with a somatic $BRAF^{V600E}$ mutation. Collectively, these data demonstrate that enhancing KCC2 function prevents epileptiform activity recorded in vitro in postoperative tissue from the majority of patients with mTLE and typical ILAE type 1 HS.

PCPZ and CLP-290 Reduce Interictal Activity and Seizures in a Mouse Model of mTLE. Spontaneous ictal activity is rarely observed in postoperative mTLE tissue slices in vitro (53, 54). Therefore, to assess the antiseizure potential of KCC2 enhancers, we tested their effect in a lithium-pilocarpine model of mTLE (56) adapted to mice (Fig. 6*A*). *Status epilepticus* (SE) was induced by intraperitoneal injection of the muscarinic agonist pilocarpine (*SI Appendix, Supplementary Methods*). Mice typically developed SE within 30 to 60 min after pilocarpine injection, and SE was terminated after 1 h by i.p. injection of diazepam and ketamine. Telemetric ECoG recordings from mice implanted with telemetric probes prior to SE induction revealed intense interictal discharge (IID) activity and occasional seizures for hours to a few days after SE, followed by a seizure-free latent period of 2 to 3 wk before regular spontaneous seizures were detected (Fig. 6*B*). Typical epileptiform activity such as interictal discharges (<20 Hz) or high frequency oscillations [>80 Hz, HFOs, (57–59)] was also observed (Fig. 6 *G* and *H*). In addition to these electrophysiological biomarkers, typical histological landmarks were detected in the hippocampus of these mice, including hippocampal sclerosis, granule cell dispersion, mossy fiber sprouting, and reduced KCC2 immunoreactivity in the dentate gyrus (Fig. 6 *C* and *D* and *SI Appendix*, Fig. S9). We tested the impact of chronic administration of KCC2 enhancers 5 wk after SE induction (*SI Appendix, Supplementary Methods*). After a 5-d habituation period with twice-daily i.p. vehicle injections (days 35 to 39, control period, 9 AM and 7 PM), we first tested the effect of vehicle *vs.* PCPZ administration (2 mg/kg, twice daily) on seizure frequency during the next 5 d (days 40 to 44 post-SE, test period) (Fig. 6 *A* and *E*).

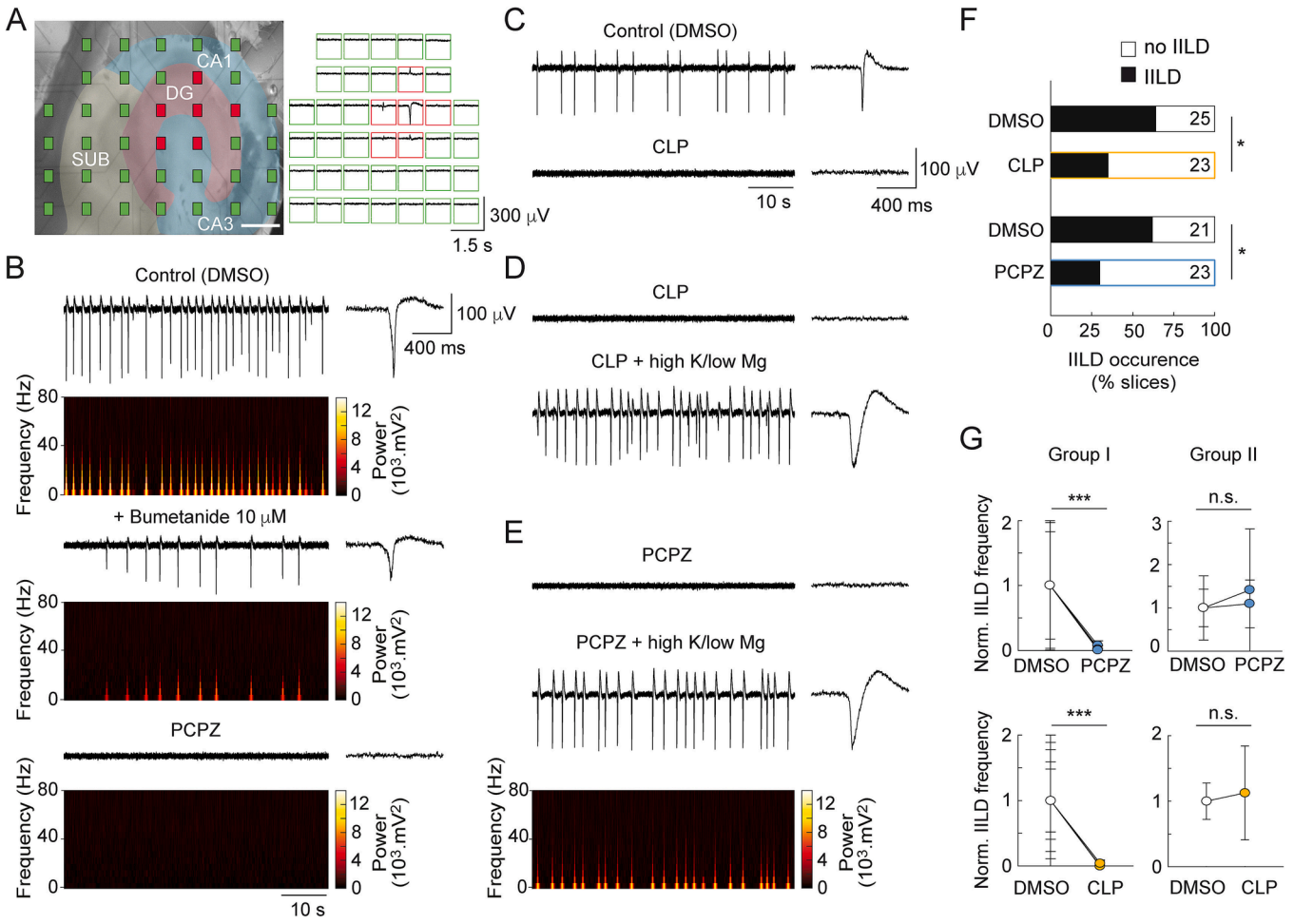


Fig. 5. PCPZ and CLP-257 prevent spontaneous interictal-like discharges in temporal lobe slices from mTLE patients. (*A*, *Left*) Photomicrograph of a recorded slice of resected brain tissue from a mTLE patient, showing multielectrode array (MEA) layout. Hippocampal and parahippocampal regions, including the subiculum, were delineated based on slice morphology. Electrodes were color-coded to indicate the type of activity detected (red: interictal-like discharges (IILDs) green: no activity). Scale: 1 mm. (*Right*) Representative recording from this slice, showing synchronous IILDs mostly within the dentate gyrus. (*B*) Representative local field potential recordings and spectrograms showing spontaneous, low-frequency (<40 Hz) IILDs in a slice maintained in control conditions (2 h in DMSO only, *Top*), and their reduction upon >10 min application of 10 μM bumetanide (middle). These events were completely absent from an adjacent slice from the same tissue incubated for 2 h in ACSF supplemented with 10 μM PCPZ (*Bottom*). Insets show individual IILDs. (*C*) Representative recordings showing spontaneous IILDs in a slice from another patient incubated in control conditions (*Top*), and the absence of these events in an adjacent slice kept for 2 h in ACSF supplemented with 7 μM CLP-257 (*Bottom*). (*D* and *E*) Slices from two other patients treated with either CLP or PCPZ also did not display IILDs. However, application of a proconvulsant ACSF (6.5 mM K^+ and 0.25 mM Mg^{2+}) rescued spontaneous IILDs in these slices. (*F*) Summary plot showing the proportion of slices with and without IILDs. χ^2 test, **P* < 0.05. (*G*) Graphs showing the mean frequency of spontaneous IILDs (normalized to control) recorded in slices from seven mTLE patients incubated in control ACSF (DMSO) or in the presence of 10 μM PCPZ. Two groups were distinguished: responders (Group I, five patients) and nonresponders (Group II, two patients). Similar data are shown for slices from six patients, incubated in control ACSF or treated with 7 μM CLP-257. Wilcoxon signed rank test, ****P* < 0.001.

While seizure frequency was not significantly affected in animals receiving saline during the test period (0.14 ± 0.06 vs. 0.16 ± 0.06 seizures/h, $P = 0.087$), animals receiving PCPZ showed an approximately 40% reduction in seizure frequency compared to the control period (0.08 ± 0.03 vs. 0.13 ± 0.05 seizures/h, $P = 0.032$; Fig. 6*F*). However, PCPZ had no effect on seizure duration (29.9 ± 1.6 vs. 29.1 ± 4.0 s, $P = 0.826$) or power (7329.9 ± 2414.4 vs. 6451.3 ± 1831.1 mV^2, $P = 0.329$; Fig. 6*F*), suggesting that it may affect mechanisms involved in seizure onset rather than seizure maintenance. In addition, consistent with our in vitro results on postoperative human tissue, PCPZ significantly reduced the frequency of IIDs by approximately 30% compared to control (195.5 ± 35.3 vs. 279.1 ± 55.2 IIDs/h, $P = 0.022$; Fig. 6*G*). The effect of PCPZ was even stronger on the frequency of HFOs, with a 55% reduction in PCPZ-treated mice (54.5 ± 21.2 vs. 121.0 ± 64.7 HFO/h, $P = 0.014$), whereas HFO frequency increased by 55% in the saline-only group (93.3 ± 33.5 vs. 60.3 ± 21.4 HFO/h, $P = 0.034$; Fig. 6*H*), showing PCPZ reduces both chronic seizures and interictal activity (including HFOs and IIDs) in an animal model of mTLE. Interestingly, although we observed a circadian rhythmicity in the occurrence of seizures and interictal activity (*SI Appendix*, Fig. S10), as previously reported (60, 61), the effect of PCPZ was similar during light (Zeitgeber time 0 to 12 h) and dark (Zeitgeber time 12 to 24 h) phases ($P = 0.551$ and $P = 0.344$ respectively).

Similarly, in another set of experiments, we evaluated the effect of the CLP-257 prodrug CLP-290 (23) on chronic seizures. Mice injected with vehicle alone (20% 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin, HPCD, see *SI Appendix, Supplementary Methods*) during the control and test periods showed no significant change in seizure frequency ($P = 0.13$). In contrast, mice treated with CLP-290 (100 mg/kg in 20% HPCD, i.p., twice daily) during the test period showed a 55 % reduction in seizure frequency compared to the control period ($P = 0.008$; Fig. 6*E*). Taken together, these results further support that enhancing KCC2 function reduces chronic seizures in an animal model of mTLE.

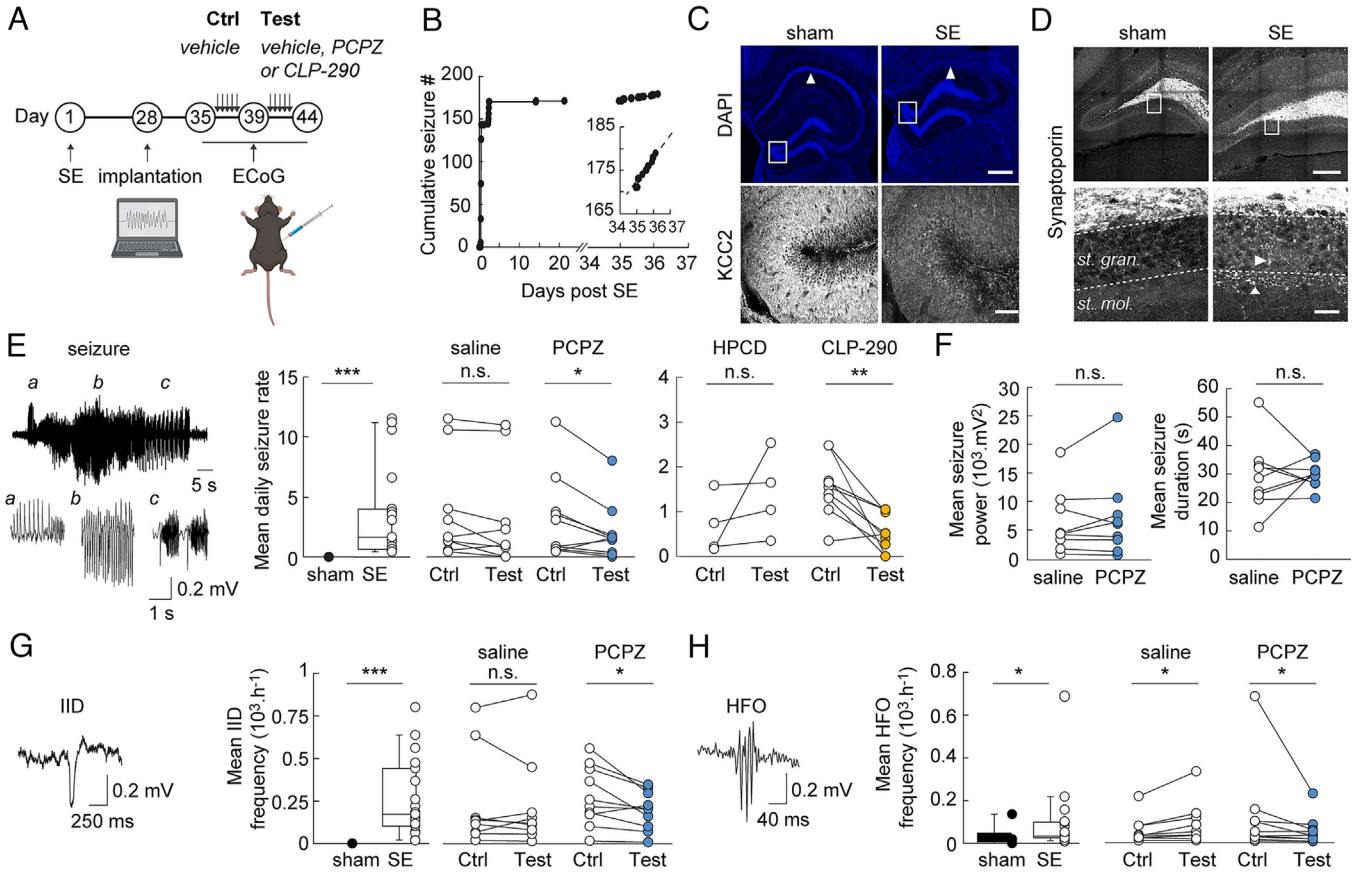


Fig. 6. Chronic administration of PCPZ or CLP-290 reduces seizure rate and epileptiform activities in a mTLE mouse model. (*A*) Experimental timeline. (*B*) Graph showing the cumulative number of seizures detected in a mouse immediately after SE and up to 37 d post SE. Recording was interrupted between days 21 and 34 post SE. Note that seizures stop 2 d after SE and chronic seizures occur at a regular rate after day 34 (*Inset*). (*C*, *Top*) Representative confocal fluorescent micrographs of DAPI staining of hippocampal slices from naïve (no SE) and epileptic mice. Arrowheads indicate the CA1 region, which is largely sclerotic in the epileptic mouse. Also note the dispersion of the dentate gyrus granule cells. Scale: 400 μm. (*Bottom*) Confocal fluorescent micrographs of KCC2 immunolabeling in dentate gyrus, from the regions boxed in *Top* panels, showing reduced KCC2 immunofluorescence in the dentate gyrus of the epileptic mouse. Scale: 60 μm (*D*, *Top*) Representative confocal fluorescent micrographs of synaptoporin immunolabeling of the dentate gyrus of control and epileptic mice. Scale: 200 μm. (*Bottom*) Magnification of the regions boxed in *Top* panels, showing ectopic synaptoporin-immunopositive mossy fibers in the stratum granulosum and stratum moleculare only in the epileptic mouse. Scale: 20 μm. (*E*, *Left*) representative ECoG recording of a seizure with *Insets* (a,b,c) showing typical periods of the seizure. Middle, summary plots showing mean seizure frequency per day in sham (no SE, n = 6) and epileptic mice (n = 19). No seizures were detected in sham animals (*** Mann–Whitney test $P < 0.001$). (*Right*) Summary graphs showing mean seizure frequency per hour in epileptic mice receiving i.p. saline injections during the control period (days 35 to 39) and either saline or PCPZ (2 mg/kg in saline) during the test period (days 40 to 44). Mice receiving PCPZ injections during the test period had significantly fewer seizures than during the control period (n = 10 mice, * paired *t* test $P < 0.05$), while no change in seizure frequency was observed in mice receiving saline injections (n = 9, $P = 0.087$). Similarly, mice chronically injected with CLP-290 (100 mg/kg in 20% HPCD) during the test period showed a 55% reduction in mean daily seizure frequency compared to control (n = 9 mice, ** Wilcoxon test $P < 0.01$), while mice receiving vehicle alone (20% HPCD) showed no significant change in seizure frequency (n = 4, $P = 0.125$). (*F*) Summary graphs comparing mean seizure power (*Left*) and duration (*Right*) during the control (saline) and test (PCPZ) periods. While reducing seizure frequency, PCPZ had no significant effect on seizure power (paired *t* test $P = 0.466$) or duration ($P = 0.657$, n = 9 mice). (*G* and *H*, *Left*) Representative ECoG recording of an interictal discharge (IID, in *G*) and a high-frequency oscillation (HFO, in *H*). (*Middle*) Summary plots showing mean IID (in *G*) and HFO (in *H*) frequency in sham (n = 6) and epileptic animals (n = 19). IIDs and HFOs were significantly more frequent in epileptic animals (Mann–Whitney test *$P < 0.05$, ***$P < 0.001$, respectively). Right, summary plots of mean IID (in *G*) and HFO (in *H*) frequency during the control period (days 34 to 39) and the test period (days 40 to 44). Recordings from mice receiving PCPZ injections during the test period displayed significantly reduced IID and HFO frequency as compared to the control period (*paired *t* test $P < 0.05$, n = 10 mice). Recordings from mice receiving saline injections during the test period revealed no change in IID frequency ($P = 0.846$) and a significant increase in HFO frequency (*$P < 0.05$, n = 9 mice).

Discussion

In this study, we investigated the effect and mode of action of two candidate KCC2 enhancers, PCPZ and CLP-257, in hippocampal neurons. While the concept of restoring chloride gradients for epilepsy is not entirely novel, our study provides critical advancements by revealing a phosphorylation-independent mechanism for KCC2 enhancement by PCPZ and CLP-257. Thus, both compounds reduced KCC2 lateral diffusion and increased its clustering and function, without altering its expression or phosphorylation at canonical regulatory sites. Moreover, we demonstrate the efficacy of both compounds to suppress interictal-like discharges and seizures in human resected brain tissue from drug-resistant mTLE patients as well as in a pertinent animal model of mTLE, thereby emphasizing their direct translational relevance. These findings provide proof-of-concept for the therapeutic potential of KCC2 enhancers in mTLE and potentially other conditions with reduced KCC2 expression.

Several epilepsies are associated with chloride transport dysfunction (62), resulting in paradoxical excitatory signaling through $GABA_AR$ (5, 6). Although pro-GABAergic drugs such as benzodiazepines and other $GABA_AR$ positive allosteric modulators are often effective in epilepsy (63), their efficacy may be limited when intraneuronal chloride levels are elevated. Restoring chloride gradients therefore appears to be a promising first-line therapeutic strategy in drug-resistant epilepsy.

CL-058 was the first compound identified as a KCC2 enhancer candidate by a library screening in a rodent neuroblastoma-glioma

hybrid cell line (23). It was subsequently optimized into CLP-257 and CLP-290, with improved EC_{50} and half-life for in vivo applications. While initially described as specific KCC2 enhancers with little or no activity on other cation-chloride cotransporters, subsequent work found direct binding and potentiating effects on $GABA_AR$ (31). Although still controversial (32), these results have called into question CLP drugs as pure KCC2 enhancers. We reconcile these findings by showing that CLP-257 acts both as a bona fide KCC2 enhancer (Fig. 1) and as a positive allosteric modulator of extrasynaptic, but not synaptic, $GABA_AR$ (Fig. 2) in rat hippocampal neurons. These data thus reconcile apparently contradictory results obtained on tonic $GABA_AR$-mediated currents in hippocampal neurons (31) and mIPSCs from spinal cord neurons (32).

PCPZ on the other hand is a first-generation antipsychotic and is generally known as a dopamine D2 antagonist, although it interacts with a lower affinity with serotoninergic, adrenergic, muscarinic, and histaminergic receptors. It was first suggested as a candidate KCC2 enhancer by screening the Prestwick's library on HEK cells expressing recombinant KCC2 (24) and then shown to reduce the depolarizing driving force of evoked IPSCs in immature rat spinal motoneurons after spinal cord injury. However, its effects on cortical neurons have not been investigated. Our results now show that PCPZ also acts as a potent KCC2 enhancer, with no detectable effect on NKCC1 or $GABA_AR$-mediated currents (Fig. 2).

Despite their potential therapeutic interest in restoring chloride transport function in the pathology, the mechanisms of action of CLP-257 and PCPZ on KCC2 have not been fully characterized. Previous studies have suggested that CLP compounds increase total (28, 29) or plasmalemmal KCC2 expression (23, 27, 64) mostly in animal models of chronic pain or spasticity. Similarly, PCPZ has been shown to rescue KCC2 membrane immunoreactivity in lumbar motoneurons after spinal cord injury (24). However, the underlying mechanisms of these effects have not been further investigated. We observed no such changes in either total or plasmalemmal KCC2 expression upon incubation of hippocampal neurons with PCPZ or CLP-257 (Fig. 3). Instead, increased KCC2 function was associated with reduced KCC2 membrane diffusion and increased clustering (Fig. 3). These observations suggest that under nonpathological conditions, PCPZ and CLP-257 may act by redistributing plasmalemmal KCC2 rather than increasing its abundance.

KCC2 diffusion and clustering in the plasma membrane are tightly correlated with function and are controlled by phosphorylation of key residues in its carboxy-terminal domain (11, 44, 45, 65), making them prime candidate targets for KCC2 modulators. In particular, phosphorylation of S940 and dephosphorylation of T906 and T1007 promote KCC2 clustering and membrane stability (42, 45, 50, 52, 66). This effect usually results in increased membrane expression of the transporter, which was not observed with PCPZ or CLP-257 treatment, making it unlikely that a change in their phosphorylation underlies their effects. Consistent with this conclusion, CLP-257 and PCPZ did not cause a significant change in the phosphorylation of these residues (Fig. 4) and did not affect the WNK/SPAK/OSR1 pathway, which is known to phosphorylate T906 and T1007 (42, 66). These observations are consistent with previous observations in a mouse model of ischemia (29). Finally, phosphorylation of Y1087 may be a good candidate target for PCPZ and CLP-257, as it can affect KCC2 clustering and function without affecting its membrane expression (47, 52, 67). However, KCC2 tyrosine phosphorylation was also unaffected by either compound in hippocampo-cortical slices. Further studies will be required to test whether compensatory phosphorylation and dephosphorylation of different tyrosine residues may mask the net effect of KCC2 enhancers on Y1087.

Taken together, our data demonstrate that both PCPZ and CLP-257 enhance KCC2 function and promote its membrane confinement and clustering without altering expression or canonical phosphorylation. Interestingly, other KCC2 enhancers with unknown mechanisms have the same potentiating effect without affecting KCC2 membrane expression or the phosphorylation of S940 or T1007 (36). PCPZ, CLP-257, and probably other KCC2 enhancers may target noncanonical phosphorylation sites, as identified in large-scale proteomics studies (68–70). Alternatively they may alter KCC2 interaction with various partners known to regulate its function and localization (46, 69, 71), including SNARE proteins (72), CIP1 (73), Neto2 (74), CKB (75), PAM (76), and gephyrin (46). Finally, KCC2 enhancers may also promote KCC2 accumulation in lipid rafts (47), thereby enhancing KCC2 clustering and function.

Although previous studies have reported effects of KCC2 enhancers on epileptiform activity in vitro or acute seizures such as *status epilepticus* in animal models, their effects on spontaneous seizures in chronic epilepsy models remain unclear. CLP-257 has been reported to either increase (33) or decrease (34) ictal-like discharges (ILDs) in two in vitro models of epileptiform activity. On the other hand, inhibition of the WNK/SPAK/OSR1 pathway with WNK463 prevented KCC2 T1007 phosphorylation and reduced the intensity of kainate-induced *status epilepticus* in mice (35). Finally, CLP-290 was shown to reduce phenobarbital-resistant neonatal seizures and susceptibility to pentylenetetrazole-induced seizures in a neonatal ischemic mouse model (29), while other KCC2 enhancers prevented the development of kainate-induced *status epilepticus* (36). To date, only one study has investigated the effects of CLP-290 in a chronic epilepsy model (37), focusing solely on early effects on epileptogenesis, and the observed events lacked electrographic features of seizures, raising doubts about their exact nature.

Our findings now show that both PCPZ and CLP-257 not only enhance KCC2 function but also suppress interictal discharges in human hippocampal slices from mTLE patients as well as interictal activity and seizures in a mouse model of mTLE. Notably, out of 13 temporal lobe resections, PCPZ or CLP-257 almost completely suppressed interictal-like activity in 10 samples, whereas it had virtually no effect in three samples (Fig. 5). Neuropathologic analysis of these patients revealed that they had rare forms of TLE, one related to a ganglioglioma associated with a somatic mutation of the BRAF proto-oncogene, and the other to ILAE type 3, often associated with a dual pathology. Further investigation of the phenotype of these nonresponding tissues will be necessary to elucidate their pathophysiological characteristics and the origin of their resistance to KCC2 enhancers.

PCPZ is a first-generation FDA-approved antipsychotic with indications in schizophrenia, migraine, and nausea and vomiting (77). Side effects are generally mild in adults but adverse effects such as sedation, extrapyramidal symptoms, and in some rare cases, seizures, have been reported in children (78). Here, we show that PCPZ also has significant antiseizure properties both in postoperative temporal lobe tissue from mTLE patients in vitro, and in a mouse model of mTLE. In vitro, the effect of PCPZ was comparable to that of bumetanide as described in postoperative epileptic brain tissue from patients with epilepsy of various etiologies (5–7), supporting the idea that restoring chloride homeostasis may be an effective antiseizure strategy. In vivo, PCPZ reduced seizure frequency by approximately 40% (Fig. 6) but also greatly reduced interictal discharges and high-frequency oscillations, two hallmarks of epileptic networks (57–59). PCPZ was administered at a concentration of 2 mg/kg by i.p. injection, a dose classically used to test the central effects of PCPZ (79–81). Importantly, the antiseizure effects of PCPZ in vivo are unlikely to be due to D2 receptor antagonism, as reduced D2 receptor expression or function is associated with increased, not decreased,

seizure threshold and D2 agonists, not antagonists, have been shown to have antiseizure properties (82). This suggests that the KCC2-enhancing property of PCPZ overrides any potential proconvulsant side effects linked to its other pharmacological actions, at least within the experimental conditions tested. In addition, the effects of CLP-290 provide further independent support that promoting KCC2 function reduces seizure frequency in mTLE. Given its dual effect on the function of extrasynaptic $GABA_AR$ and KCC2, along with no proconvulsive effect through D2 receptor antagonism, CLP-290 is expected to have a more pronounced antiseizure effect than PCPZ. However, i.p. administration may limit its bioavailability as compared to p.o. administration (23), thereby hindering its antiseizure effect under our experimental conditions.

In conclusion, our results demonstrate that PCPZ and CLP-257 are effective KCC2 enhancers and suggest that KCC2 activation may be an effective strategy in patients with mTLE. Recent progress in elucidating the molecular structure of KCC2 (83–86) provides a unique opportunity to explore the molecular mechanisms underlying the modulation of its expression and function and to design more specific, structure-based KCC2 enhancers with improved pharmacokinetics, efficacy, and specificity.

Materials and Methods

Animal Procedures. This study adheres to the ARRIVE guidelines for reporting animal research. All animal procedures were performed in accordance with the European Community Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC), and the guidelines for the treatment of animals issued by the French Ministry of Agriculture and Forestry (Decree 87–848) and were approved by the "Direction Départementale de la Protection des Populations de Paris" (authorization number D75-05-22). The procedures were evaluated by the local animal welfare structure and the Ethics Committee n°5 (Charles Darwin). Following the positive opinion of the Ethics Committee of our project (APAFIS#24889-202008050923999 v4, APAFIS#5575-2016042916319074 v5, and APAFIS #50258-202407091126447 v3), we obtained the authorization from the Ministry of Research and Higher Education to perform the experiments on animals used for scientific purposes. All procedures were performed in a user facility (either IFM, approved by the Ministry of Agriculture under the reference D-75-05-22, or ICM, reference C-75-13-19).

Human Tissue and Ethics Approval. Informed consent to participate in the study was obtained from patients or their legal guardians. The protocol was approved by a local research ethics committee (CPP Île-de-France 1 - 14388, January 16, 2017). A small amount of nonessential brain tissue for neuropathologic diagnostic purposes was allocated to research by the neurosurgeon during surgery, in agreement with the neuropathologist and the neurologist. Brain samples were obtained between 2017 and 2021 from 13 patients (four males, nine females, age range: 16 to 63 y, *SI Appendix*, Table S1) diagnosed with mesial temporal lobe epilepsy that was associated with hippocampal sclerosis (11 patients), glioneuronal tumor (one patient), and hippocampal atrophy with malformation of cortical development (polymicrogyria and subcortical heterotopia, one patient). Patients underwent multimodal preoperative evaluation, including neurological examination, neuropsychological assessment, video-electroencephalographic recording, MRI, and fluorodeoxyglucose positron emission tomography. In addition, stereo-electroencephalography was performed in six patients.

Corticectomies were performed at the Sainte-Anne Hospital (nine patients) and at the Pitié-Salpêtrière Hospital (four patients). Neuropathologic diagnosis was made according to the classification of the Diagnostic Methods Commission of the International League Against Epilepsy (ILAE) (55).

Statistical Analysis. The number of observations reported corresponds to the number of cells for electrophysiology and immunocytochemistry data, individual quantum dots for single-particle tracking, independent primary hippocampal cultures or animals for biochemistry, animals for in vivo experiments, and slices or patients for human tissue recordings. Sample size selection for experiments was based on published experiments, pilot studies, and in-house expertise. Most experimental analyses were blinded to the treatment conditions. In addition, semi-automated analysis software was used to reduce human bias. Human hippocampal slices were randomly assigned to either the control or treatment paradigm prior to conducting the experiments. Finally, animals were randomly assigned to treatment groups with approximately equal numbers in each condition.

Means are presented ±SEM, medians are presented with their interquartile range (IQR, 25 to 75%). Means were compared using the parametric Student's *t* test when statistical conditions (normal distribution and homoscedasticity) were met. Otherwise, the nonparametric Mann–Whitney (MW) test was used. For paired measurements, the Wilcoxon test was used unless statistical conditions for Student's paired *t* test were verified. Statistical tests were performed with SigmaPlot 13 (Systat Software) or Prism 10 (GraphPad). Differences were considered significant with p-values less than 5 % ($*P \leq 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$). Error bars correspond to SEM.

A comprehensive description of the experimental and analytical procedures is provided in *SI Appendix*.

Data, Materials, and Software Availability. Software for MEA and ECoG signal analysis has been deposited on GitHub (https://github.com/jcponcer/PoncerLab/tree/main/Donneger_2026) (87). Some data reported in this paper have been deposited on the public repository Zenodo (10.5281/zenodo.18668820) (88) within the limits of the data volume accepted by the platform; any additional data exceeding these limits will be shared by the lead contact upon reasonable request.

ACKNOWLEDGMENTS. We wish to thank Liset M de la Prida for helpful discussions and critical reading of the manuscript. We would also like to thank the following people: Jinwei Zhang for his expert guidance with phospho-KCC2 biochemistry; Yves de Koninck and Annie Castonguay for kindly providing CLP-290; Christophe Bernard and Antoine Ghestem for their training on telemetric ECoG probe implantation; Etienne Côme and Marianne Renner for their training and advice on single particle tracking (SPT) recordings and data analysis; Esther Bliard for her assistance with *status epilepticus* induction; Ludovic Langlois for his assistance during the revision of the manuscript. We are also grateful to the Imaging Facility of the Institut du Fer à Moulin for assistance with confocal imaging, and to the Phenoparc and ePHYS (RRID SCR_026412) facilities at the Paris Brain Institute where the CLP-290 experiments were performed. Some of the data presented in this manuscript was previously described in Florian Donneger's PhD thesis (https://theses.fr/2022SORUS273). This work was supported by Fondation pour la Recherche Médicale (DEQ20140329539 to J.C.P., FDT202106013286 to F.D.), Agence Nationale de la Recherche ERANET-Neuron (ANR-16-NEU3-0006-02 to J.C.P.), LabEx BioPsy, Agence Nationale de la Recherche (ANR-11-LABX-0035 to J.C.P.), Fondation Française pour la Recherche sur l'Epilepsie (J.C.P.), Federation pour la Recherche sur le Cerveau (J.C.P.), Sorbonne Université (F.D., J.B., and C.P.), and INSERM (J.C.P.). The Poncer lab is affiliated to DIM C-BRAINS, supported by the Conseil Régional d'Ile de France.

Author affiliations: [a]Institut du Fer à Moulin, Inserm, Sorbonne Université, UMR-S 1270, Paris 75005, France; [b]Sorbonne Université, Institut du Cerveau Paris Brain Institute - ICM, Inserm, CNRS, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital de la Pitié Salpêtrière, Paris 75013, France; [c]Department of Neuropathology, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpitaux Universitaires La Pitié Salpêtrière–Charles Foix, Paris 75013, France; [d]Department of Neurosurgery, Sainte-Anne Hospital, Paris 75014, France; [e]Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (AP-HP), Department of Neurosurgery, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris 75013, France; and [f]Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (AP-HP), Epilepsy Unit, Reference Center for Rare Epilepsies, and Department of Clinical Neurophysiology, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris 75013, France

1. A. K. Ngugi, C. Bottomley, I. Kleinschmidt, J. W. Sander, C. R. Newton, Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: A meta-analytic approach. *Epilepsia* **51**, 883–890 (2010).
2. I. Blumcke *et al.*, Histopathological findings in brain tissue obtained during epilepsy surgery. *N. Engl. J. Med.* **377**, 1648–1656 (2017).
3. A. J. Lowe *et al.*, Epilepsy surgery for pathologically proven hippocampal sclerosis provides long-term seizure control and improved quality of life. *Epilepsia* **45**, 237–242 (2004).
4. J. de Tisi *et al.*, The long-term outcome of adult epilepsy surgery, patterns of seizure remission, and relapse: A cohort study. *Lancet* **378**, 1388–1395 (2011).
5. G. Huberfeld *et al.*, Perturbed chloride homeostasis and GABAergic signaling in human temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci.* **27**, 9866–9873 (2007).
6. J. Pallud *et al.*, Cortical GABAergic excitation contributes to epileptic activities around human glioma. *Sci. Transl. Med.* **6**, 244ra289 (2014).
7. T. Blauwblomme *et al.*, Gamma-aminobutyric acidergic transmission underlies interictal epileptogenicity in pediatric focal cortical dysplasia. *Ann. Neurol.* **85**, 204–217 (2019).
8. M. Munakata *et al.*, Altered distribution of KCC2 in cortical dysplasia in patients with intractable epilepsy. *Epilepsia* **48**, 837–844 (2007).

9. A. Munoz, P. Mendez, J. DeFelipe, F. J. Alvarez-Leefmans, Cation-chloride cotransporters and GABA-ergic innervation in the human epileptic hippocampus. *Epilepsia* **48**, 663–673 (2007).
10. I. Cohen, V. Navarro, S. Clemenceau, M. Baulac, R. Miles, On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. *Science* **298**, 1418–1421 (2002).
11. P. Blaesse, M. S. Airaksinen, C. Rivera, K. Kaila, Cation-chloride cotransporters and neuronal function. *Neuron* **61**, 820–838 (2009).
12. H. R. Pathak *et al.*, Disrupted dentate granule cell chloride regulation enhances synaptic excitability during development of temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci.* **27**, 14012–14022 (2007).
13. M. R. Karlocai *et al.*, Enhanced expression of potassium-chloride cotransporter KCC2 in human temporal lobe epilepsy. *Brain Struct. Funct.* **221**, 3601–3615 (2016).
14. M. Goutierre *et al.*, KCC2 regulates neuronal excitability and hippocampal activity via interaction with Task-3 channels. *Cell Rep.* **28**, 91–103.e7 (2019).
15. M. R. Kelley *et al.*, Locally reducing KCC2 activity in the hippocampus is sufficient to induce temporal lobe epilepsy. *EBioMedicine* **32**, 62–71 (2018).
16. T. J. Ellender, J. V. Raimondo, A. Irkle, K. P. Lamsa, C. J. Akerman, Excitatory effects of parvalbumin-expressing interneurons maintain hippocampal epileptiform activity via synchronous afterdischarges. *J. Neurosci.* **34**, 15208–15222 (2014).
17. R. Khazipov, G. Valeeva, I. Khalilov, Depolarizing GABA and developmental epilepsies. *CNS Neurosci. Ther.* **21**, 83–91 (2015).
18. G. Di Cristo, P. N. Awad, S. Hamidi, M. Avoli, KCC2, epileptiform synchronization, and epileptic disorders. *Prog. Neurobiol.* **162**, 1–16 (2018).
19. Y. E. Moore, T. Z. Deeb, H. Chadchankar, N. J. Brandon, S. J. Moss, Potentiating KCC2 activity is sufficient to limit the onset and severity of seizures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **115**, 10166–10171 (2018).
20. V. Magloire, J. Cornford, A. Lieb, D. M. Kullmann, I. Pavlov, KCC2 overexpression prevents the paradoxical seizure-promoting action of somatic inhibition. *Nat. Commun.* **10**, 1225 (2019).
21. R. M. Pressler *et al.*, 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 (2015).
22. J. S. Soul *et al.*, A pilot randomized, controlled, double-blind trial of bumetanide to treat neonatal seizures. *Ann. Neurol.* **89**, 327–340 (2021).
23. M. Gagnon *et al.*, Chloride extrusion enhancers as novel therapeutics for neurological diseases. *Nat. Med.* **19**, 1524–1528 (2013).
24. S. Liabeuf *et al.*, Prochlorperazine increases KCC2 function and reduces spasticity after spinal cord injury. *J. Neurotrauma* **34**, 3397–3406 (2017).
25. F. J. Prael Iii *et al.*, Discovery of small molecule KCC2 potentiators which attenuate in vitro seizure-like activity in cultured neurons. *Front. Cell Dev. Biol.* **10**, 912812 (2022).
26. A. J. Barbour, K. F. Hauser, A. R. McQuiston, P. E. Knapp, 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 (2020).
27. J. N. Bilchak, K. Yeakle, G. Caron, D. Malloy, M. P. Cote, Enhancing KCC2 activity decreases hyperreflexia and spasticity after chronic spinal cord injury. *Exp. Neurol.* **338**, 113605 (2021).
28. Y. Gao *et al.*, KCC2 receptor upregulation potentiates antinociceptive effect of GABAAR agonist on remifentanil-induced hyperalgesia. *Mol. Pain* **18**, 17448069221082880 (2022).
29. B. J. Sullivan, P. A. Kipnis, B. M. Carter, L. R. Shao, S. D. Kadam, Targeting ischemia-induced KCC2 hypofunction rescues refractory neonatal seizures and mitigates epileptogenesis in a mouse model. *Sci. Signal.* **14**, eabg2648 (2021).
30. I. Keramidis *et al.*, Restoring neuronal chloride extrusion reverses cognitive decline linked to Alzheimer's disease mutations. *Brain* **146**, 4903–4915 (2023), 10.1093/brain/awad250.
31. R. A. Cardarelli *et al.*, 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 (2017).
32. M. Gagnon *et al.*, 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 (2017).
33. S. Hamidi, M. Avoli, KCC2 function modulates in vitro ictogenesis. *Neurobiol. Dis.* **79**, 51–58 (2015).
34. V. I. Dzhala, K. J. Staley, KCC2 chloride transport contributes to the termination of ictal epileptiform activity. *eNeuro* **8**, ENEURO.0208-20.2020 (2020).
35. K. T. Kahle *et al.*, 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 (2005).
36. R. Jarvis *et al.*, Direct activation of KCC2 arrests benzodiazepine refractory status epilepticus and limits the subsequent neuronal injury in mice. *Cell Rep. Med.* **4**, 100957 (2023), 10.1016/j.xcrm.2023.100957.
37. J. Cai *et al.*, The suppressive effect of the specific KCC2 modulator CLP290 on seizure in mice. *Epilepsy Res.* **203**, 107365 (2024).
38. G. Gauvain *et al.*, 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 (2011).
39. Y. Otsu, F. Donneger, E. J. Schwartz, J. C. Poncer, Cation-chloride cotransporters and the polarity of GABA signalling in mouse hippocampal parvalbumin interneurons. *J. Physiol.* **598**, 1865–1880 (2020).
40. S. Khirug *et al.*, 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 (2008).
41. M. Chen *et al.*, APP modulates KCC2 expression and function in hippocampal GABAergic inhibition. *Elife* **6**, e20142 (2017).
42. M. Heubl *et al.*, $GABA_A$ receptor dependent synaptic inhibition rapidly tunes KCC2 activity via the Cl^--sensitive WNK1 kinase. *Nat. Commun.* **8**, 1776 (2017).
43. M. A. Virtanen, P. Uvarov, M. Mavrovic, J. C. Poncer, K. Kaila, The multifaceted roles of KCC2 in cortical development. *Trends Neurosci.* **44**, 378–392 (2021).
44. E. Côme, M. Heubl, E. J. Schwartz, J. C. Poncer, S. Lévi, Reciprocal regulation of KCC2 trafficking and synaptic activity. *Front. Cell. Neurosci.* **13**, 48 (2019).
45. I. Chamma *et al.*, Activity-dependent regulation of the K/Cl transporter KCC2 membrane diffusion, clustering, and function in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **33**, 15488–15503 (2013).
46. S. Al Awabdh *et al.*, Gephyrin interacts with the K-Cl cotransporter KCC2 to regulate its surface expression and function in cortical neurons. *J. Neurosci.* **42**, 166–182 (2022).
47. M. Watanabe, H. Wake, A. J. Moorhouse, J. Nabekura, Clustering of neuronal K^+-Cl^- cotransporters in lipid rafts by tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **284**, 27980–27988 (2009).
48. K. T. Kahle *et al.*, K-Cl cotransporters, cell volume homeostasis, and neurological disease. *Trends Mol. Med.* **21**, 513–523 (2015).
49. H. H. Lee, T. Z. Deeb, J. A. Walker, P. A. Davies, S. J. Moss, *NMDA* receptor activity downregulates *KCC2* resulting in depolarizing *GABAA* receptor–mediated currents. *Nat. Neurosci.* **14**, 736–743 (2011).
50. P. de Los Heros *et al.*, The *WNK*-regulated *SPAK/OSR1* kinases directly phosphorylate and inhibit the K^+-Cl^- co-transporters. *Biochem. J.* **458**, 559–573 (2014).
51. K. Yamada *et al.*, Small-molecule WNK inhibition regulates cardiovascular and renal function. *Nat. Chem. Biol.* **12**, 896–898 (2016).
52. H. H. Lee, R. Jurd, S. J. Moss, Tyrosine phosphorylation regulates the membrane trafficking of the potassium chloride co-transporter KCC2. *Mol. Cell. Neurosci.* **45**, 173–179 (2010).
53. G. Huberfeld *et al.*, Glutamatergic pre-ictal discharges emerge at the transition to seizure in human epilepsy. *Nat. Neurosci.* **14**, 627–634 (2011).
54. C. Le Duigou *et al.*, Imaging pathological activities of human brain tissue in organotypic culture. *J. Neurosci. Methods* **298**, 33–44 (2018).
55. I. Blümcke *et al.*, 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 (2013).
56. G. Foffani, Y. G. Uzcategui, B. Gal, L. Menendez de la Prida, Reduced spike-timing reliability correlates with the emergence of fast ripples in the rat epileptic hippocampus. *Neuron* **55**, 930–941 (2007).
57. L. Menendez de la Prida, A. J. Trevelyan, Cellular mechanisms of high frequency oscillations in epilepsy: On the diverse sources of pathological activities. *Epilepsy Res.* **97**, 308–317 (2011).
58. M. Zijlmans *et al.*, High-frequency oscillations as a new biomarker in epilepsy. *Ann. Neurol.* **71**, 169–178 (2012).
59. M. Levesque, P. Salami, Z. Shiri, M. Avoli, Interictal oscillations and focal epileptic disorders. *Eur. J. Neurosci.* **48**, 2915–2927 (2017), 10.1111/ejn.13628.
60. M. O. Baud, A. Ghestem, J. J. Benoliel, C. Becker, C. Bernard, Endogenous multidien rhythm of epilepsy in rats. *Exp. Neurol.* **315**, 82–87 (2019), 10.1016/j.expneurol.2019.02.006.
61. P. J. Karoly *et al.*, Cycles in epilepsy. *Nat. Rev. Neurol.* **17**, 267–284 (2021).
62. R. J. Burman *et al.*, Why won't it stop? The dynamics of benzodiazepine resistance in status epilepticus. *Nat. Rev. Neurol.* **18**, 428–441 (2022).
63. L. J. Greenfield Jr., Molecular mechanisms of antiseizure drug activity at GABAA receptors. *Seizure* **22**, 589–600 (2013).
64. F. Ferrini, L. E. Lorenzo, A. G. Godin, M. L. Quang, Y. De Koninck, Enhancing KCC2 function counteracts morphine-induced hyperalgesia. *Sci. Rep.* **7**, 3870 (2017).
65. A. M. Hartmann, H. G. Nothwang, NKCC1 and KCC2: Structural insights into phospho-regulation. *Front. Mol. Neurosci.* **15**, 964488 (2022).
66. P. Friedel *et al.*, *WNK1*-regulated inhibitory phosphorylation of the *KCC2* cotransporter maintains the depolarizing action of *GABA* in immature neurons. *Sci. Signal.* **8**, ra65 (2015).
67. K. Strange, T. D. Singer, R. Morrison, E. Delpire, Dependence of KCC2 K-Cl cotransporter activity on a conserved carboxy terminus tyrosine residue. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **279**, C860–C867 (2000).
68. A. Cordshagen, W. Busch, M. Winklhofer, H. G. Nothwang, A. M. Hartmann, Phospho-regulation of the intracellular termini of K-Cl cotransporter 2 (KCC2) enables flexible control of its activity. *J. Biol. Chem.* **293**, 16984–16993 (2018), 10.1074/jbc.RA118.004349.
69. J. L. Smalley *et al.*, Isolation and characterization of multi-protein complexes enriched in the K-Cl co-transporter 2 from brain plasma membranes. *Front. Mol. Neurosci.* **13**, 563091 (2020).
70. M. Weber, A. M. Hartmann, T. Beyer, A. Ripperger, H. G. Nothwang, 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 (2014).
71. V. Mahadevan *et al.*, Native KCC2 interactome reveals PACSIN1 as a critical regulator of synaptic inhibition. *Elife* **6**, e28270 (2017).
72. H. Asraf *et al.*, SNAP23 regulates KCC2 membrane insertion and activity following mZnR/GPR39 activation in hippocampalneurons. *iScience* **25**, 103751 (2022).
73. M. Wenz, A. M. Hartmann, E. Friauf, H. G. Nothwang, CIP1 is an activator of the K^+-Cl^- cotransporter KCC2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **381**, 388–392 (2009).
74. E. A. Ivakine *et al.*, Neto2 is a KCC2 interacting protein required for neuronal Cl^- regulation in hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 3561–3566 (2013).
75. K. Inoue, J. Yamada, S. Ueno, A. Fukuda, Brain-type creatine kinase activates neuron-specific K^+-Cl^- co-transporter KCC2. *J. Neurochem.* **96**, 598–608 (2006).
76. N. Garbarini, E. Delpire, The RCC1 domain of protein associated with Myc (PAM) interacts with and regulates KCC2. *Cell. Physiol. Biochem.* **22**, 31–44 (2008).
77. J. S. Furyk, R. A. Meek, D. Egerton-Warburton, Drugs for the treatment of nausea and vomiting in adults in the emergency department setting. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2015**, Cd010106 (2015).
78. M. Lau Moon Lin, P. D. Robinson, J. Flank, L. Sung, L. L. Dupuis, The safety of prochlorperazine in children: A systematic review and meta-analysis. *Drug Saf.* **39**, 509–516 (2016).
79. C. Ghelardini, N. Galeotti, C. Uslenghi, I. Grazioli, A. Bartolini, Prochlorperazine induces central antinociception mediated by the muscarinic system. *Pharmacol. Res.* **50**, 351–358 (2004).
80. M. R. Landauer, R. L. Balster, L. S. Harris, Attenuation of cyclophosphamide-induced taste aversions in mice by prochlorperazine, delta 9-tetrahydrocannabinol, nabilone and levonantradol. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **23**, 259–266 (1985).
81. C. Ghelardini, N. Galeotti, E. Vivoli, I. Grazioli, C. Uslenghi, The central analgesia induced by antimigraine drugs is independent from Gi proteins: Superiority of a fixed combination of indomethacin, prochlorperazine and caffeine, compared to sumatriptan, in an *in vivo* model. *J. Headache Pain* **10**, 435–440 (2009).
82. Y. Bozzi, E. Borrelli, The role of dopamine signaling in epileptogenesis. *Front. Cell. Neurosci.* **7**, 157 (2013).
83. X. Chi *et al.*, Cryo-EM structures of the full-length human KCC2 and KCC3 cation-chloride cotransporters. *Cell Res.* **31**, 482–484 (2020), 10.1038/s41422-020-00437-x.
84. Y. Xie *et al.*, Structures and an activation mechanism of human potassium-chloride cotransporters. *Sci. Adv.* **6**, eabc5883 (2020).
85. T. A. Chew, J. Zhang, L. Feng, High-resolution views and transport mechanisms of the NKCC1 and KCC transporters. *J. Mol. Biol.* **433**, 167056 (2021), 10.1016/j.jmb.2021.167056.
86. S. Zhang *et al.*, The structural basis of function and regulation of neuronal cotransporters NKCC1 and KCC2. *Commun. Biol.* **4**, 226 (2021).
87. F. Donneger, Y. Kadiri, M. Sinha, N. David, J. C. Poncer, Donneger_2026. GitHub. https://github.com/jcponcer/PoncerLab/tree/main/Donneger_2026. Deposited 17 February 2026.
88. F. Donneger, J. C. Poncer, Jean Christophe, Donneger et al PNAS 2026. Zenodo. https://doi.org/10.5281/zenodo.18668820. Deposited 17 February 2026.

PNAS

Supporting Information for
Enhancing KCC2 function reduces interictal activity and prevents seizures in temporal lobe epilepsy

Florian Donneger, Adrien Zanin, Jeremy Besson, Delphine Roussel, Yoness Kadiri, Carla Pagan, Manisha Sinha, Nicolas David, Marion Russeau, Franck Bielle, Bertrand Devaux, Bertrand Mathon, Vincent Navarro, Francine Chassoux, Jean Christophe Poncer

Corresponding author: Jean Christophe Poncer
Email: j-c.poncer@icm-institute.org

This PDF file includes:

Supplementary Methods
Supplementary references
Supplementary Table 1
Figures S1 to S10

Supplementary Methods

Primary hippocampal cultures

Primary cultures of hippocampal neurons were prepared as described previously (1-3). 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 (Invitrogen) containing 10 mM HEPES. Neurons were plated at a density of 120.10^3 cells/ml on 18-mm diameter glass coverslips precoated with 50 µg/ml poly-D,L-ornithine (Sigma-Aldrich) in plating medium consisting 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 hours, cells were incubated in culture medium consisting 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% CO_2 humidified incubator. One-fifth of the culture medium was replaced each week.

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. CLP-257 (Tocris) stock was prepared at 7 mM in DMSO and used at a final concentration of 7 or 0.7 µM, as indicated. 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 a control. Eticlopride hydrochloride stock (Tocris) was prepared at 2 mM in H_2O and used at a final concentration of 2 µM. Sodium orthovanadate (Sigma-Aldrich) stock was prepared at 100 mM in H_2O and used at a final concentration of 100 µM.

For most experiments on hippocampal cultures, neurons were preincubated for 2 hours with either DMSO alone, PCPZ, CLP-257, or eticlopride in a CO_2 incubator set at 37°C. Drugs were added directly to the culture medium. For some electrophysiology experiments, neurons were also recorded in the presence of these drugs in the bath. For experiments on rat brain extracts or postoperative human tissue, slices were incubated with either DMSO alone, CLP-257, PCPZ, WNK463 or sodium orthovanadate for 2 hours in interface chambers set at 37°C.

Cellular electrophysiology

Neurons were perfused at a rate of 1 ml/min with an extracellular solution containing (in mM): NaCl 120, D-glucose 20, HEPES 10, $MgCl_2$ 3, KCl 2, $CaCl_2$ 2 (pH 7.4), in a recording chamber (Luigs & Neumann) maintained at 33°C and mounted on an upright microscope (BX51WI; Olympus). Neurons were whole-cell patch clamped using borosilicate glass pipettes (Hilgenberg, GmbH) 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. Recordings were made in the presence of blockers of ionotropic glutamate and $GABA_B$ receptors and voltage-gated sodium channels (in µM): D-APV 50 (HelloBio), NBQX 10 (HelloBio), CGP54626 100 (Tocris), and TTX 1 (Latoxan, France). $GABA_A$R-mediated currents were induced at the somatic or dendritic level (approximately 50-80 µm from the soma) by local uncaging of Rubi-GABA (30 µM, Tocris) using a laser pulse (405 nM, 1-8 ms and 15-80 mW, Omicron Deepstar) delivered through the 40× objective using a photolysis head (Prairie Technologies, Brucker) (4). However, we observed that PCPZ was phototoxic to neurons upon exposure to UV light (**Fig. S1**). Therefore, to test the effect of PCPZ on GABA signaling, currents were therefore evoked by focal application of isoguvacine (100 µM, Sigma-Aldrich) through a second pipette using a PicoSpritzer set at 10 psi for 10 ms (soma) or 100 ms (dendrites). Neurons were voltage clamped from -85 to -5 mV with 3.5

s step increments of 10 mV. The current-voltage relationship 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 the voltage drop across the series resistance. The reversal potential of $GABA_AR$ currents was estimated for somatic and dendritic activation. The somato-dendritic E_{GABA} gradient (ΔE_{GABA}) was calculated as the difference between somatic and dendritic E_{GABA} normalized to the distance between the two activation sites.

The same protocol was used to test the effect of KCC2 enhancers on extrasynaptic $GABA_A$ receptors, but GABAergic currents were only induced at the somatic level. Neurons were voltage clamped at -65 mV and recorded before (DMSO) and after addition of KCC2 enhancers (PCPZ or CLP-257) in the bath. Series resistance (Rs) and input resistance (Ri) were monitored throughout the recording and cells were discarded if there was a >20% drift in either parameter. I_{GABA} amplitude was calculated as the average peak amplitude of GABAergic currents, recorded during 8 sweeps before and during drug application. To calculate the $GABA_AR$ deactivation time constant, the currents were averaged, and the rate of current deactivation was obtained by fitting their decay 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, Na_3GTP 0.4, and $MgCl_2$ 1.8 (pH 7.4) and held at -60mV. Recordings were made in the presence of blockers of ionotropic glutamate receptors and voltage-gated sodium channels (in µM): D-APV 50 (HelloBio), NBQX 10 (HelloBio), and TTX 1 (Latoxan, France). Spontaneous mIPSCs were recorded before (DMSO) and during

application of KCC2 enhancers (CLP-257 or PCPZ) or eticlopride in the bath. mIPSC amplitude and frequency were analyzed using Detectivent 4.0. To measure the deactivation time constant of synaptic $GABA_A$Rs, 100 events were averaged, and the rate of current deactivation was obtained by fitting the decay of the averaged currents to a simple exponential.

Surface biotinylation

Neurons were washed three times with ice-cold PBS 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 minutes with gentle shaking. Biotinylation was stopped by adding 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, Na_3VO_4 1 and protease and phosphatase inhibitors (Roche). Lysates were then collected by gently scraping the bottom of each well. After complete homogenization, the samples were centrifuged, and the supernatant was collected.

A small fraction of the lysates was retained for KCC2 input and total protein quantification using a BCA kit (Thermo Scientific). Lysates were mixed with a 50% slurry of Neutravidin beads (Thermo Scientific) and rotated at 4°C overnight. The beads were then pelleted by centrifugation, and the supernatant (non-biotinylated fraction) was collected. The beads were then washed three times in modified RIPA buffer and once in modified RIPA buffer without detergent. 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 6× SDS sample buffer at 37°C for one hour.

Samples were electrophoresed on polyacrylamide gradient gels (4-12%) and transferred to nitrocellulose membranes. The transfer efficiency was checked by the addition of red Ponceau. Membranes were washed with TBS-Tween solution (TBST; Invitrogen) for 30 min and blocked with a solution containing 5% (w/v) skim milk. The membranes were then incubated overnight at 4°C with a rabbit primary antibody against KCC2 (07-432; Millipore; 1:3000) or a goat antibody 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). They were then washed three times with a TBST-milk solution and incubated 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) for one hour at RT. The membranes were then washed again three times with TBST and once with TBS. Fluorescence was detected using an Odyssey infrared imaging system (LI-COR Bioscience). 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 beta-III tubulin. Surface expression of KCC2 was determined as the ratio of monomeric + oligomeric biotinylated KCC2 fraction to total KCC2 fraction (biotinylated fraction + non-biotinylated fraction).

Single particle tracking and analysis

A previously described KCC2-Flag construct was used for single particle tracking experiments (1). This recombinant Flag-tagged KCC2 transporter was shown to maintain normal trafficking and function in transfected hippocampal neurons.

All constructs were sequenced by Beckman Coulter Genomics (Hope End, Takeley, UK). Neuronal transfections were performed at DIV 13–14 using Transfectin (Bio-Rad), according to the 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 after transfection.

Neurons were stained as described previously (1). Briefly, cells were incubated with a mouse anti-Flag antibody (1:300, Sigma-Aldrich) for 6 min at 37 °C, washed, and incubated with a biotinylated Fab goat anti-mouse antibody (1:300; Jackson Immuno Research) in imaging medium for 6 min at 37 °C. After washing, 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 60× objective (NA 1.42; Olympus) and a 120 W mercury vapor short arc lamp (X-Cite 120Q, Lumen Dynamics). QD real-time images (30 ms integration time over 1200 consecutive frames) were acquired using an ImagEM EMCCD camera and MetaView software (Meta Imaging 7.7). Cells were imaged within 45 min after pre-incubation with appropriate drugs.

QD tracking and trajectory reconstruction were performed with custom Matlab routines, as described (1, 3). For each imaged neuron, one or two dendritic subregions were quantified. Mean square displacement (MSD) versus time plots were calculated as described and diffusion coefficients (D) were calculated by fitting the first four points of the MSD versus time curves with the equation: $MSD(n\tau) = 4Dn\tau + b$, where b is a constant that reflects the accuracy of spot localization. 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 with paraformaldehyde (PFA, 4% w/v in PBS) for 15 min at room temperature (RT). Cells were then washed in PBS, permeabilized with 10% Triton X-100 for 4 min at RT and then exposed to a blocking solution containing goat serum (20% v/v; Invitrogen) and 0.1% Triton X-100 diluted in PBS. Neurons were incubated with rabbit

KCC2 antibody (07-432; Millipore; 1:500) and mouse MAP2 antibody (MAB378; Chemicon; 1:500) for 1 hour at RT. Neurons were then incubated 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) for 45 minutes at RT. 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 captured using a 63× 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 cluster detection, the exposure time was adjusted to obtain the best fluorescence-to-noise ratio and to avoid pixel saturation. This exposure time was kept constant across cells and conditions. For experiments on non-transfected cells and for each neuron, dendritic sections were selected using MAP2 labeling and then an image was captured with tetramethylrhodamine (TRITC) filter to visualize KCC2 labeling. KCC2 cluster analysis was performed using MetaMorph software (Roper Scientific), as previously described (5). Images were first flatten-background filtered (kernel size, 3×3×2) to enhance cluster outlines, 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 superimposed on the raw images to quantify cluster density (mean number of KCC2 clusters per 10 μm^2), cluster area and integrated cluster intensity (integrated fluorescence pixel intensity within clusters). For each culture, the analysis was performed on 10 cells per condition and approximately 100 clusters per cell.

Immunoprecipitation and immunoblot

Male Sprague-Dawley rats, 8-weeks old, 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, NaH_2PO_4 1.2, $NaHCO_3$ 30, HEPES 20, D-glucose 20, ascorbic acid 5, sodium pyruvate 3, $MgSO_4$ 10 and $CaCl_2$ 0.5 (300-310 mOsm, pH7.4). Brains were removed and transverse hippocampal-cortices slices (400 µm thick) were prepared in the same solution using a vibratome (HM650V, Microm). The slices were then incubated for 2 hours with DMSO, KCC2 enhancers (CLP-257, PCPZ), WNK463, or sodium orthovanadate in an interface chamber containing artificial cerebrospinal fluid (ACSF) composed of (in mM): D-glucose 10, KCl 3.5, $NaHCO_3$ 26, NaH_2PO_4 1.25, NaCl 126, $CaCl_2$ 1.6 and $MgCl_2$ 1.2 (290 mOsm), equilibrated with 5% CO_2 in 95% O_2. After the treatments, the slices were washed with cold PBS, snap frozen with liquid nitrogen, and stored at -80°C. Slices were mechanically lysed on ice, using a 2 ml 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, the samples were centrifuged (16,000 g at 4°C for 10 min) and the supernatant was collected. Protein quantification was performed using the Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific) with BSA as a standard. The following phosphorylation site-specific antibodies: anti-KCC3A phospho Thr1048 (0.35mg/ml, sheep, [S0961C] 1st bleed, Dundee), anti-KCC3A phospho Thr991 (0.26mg/ml, sheep, [S959C] 1st bleed, Dundee) were first incubated with the corresponding non-phosphorylated peptide (10mg/ml, Dundee) at 4°C for 30 min. 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 15 µg of antibody per 100 µl beads, for 2 hours at 4°C without agitation. 1.5 mg of clarified cell lysate was incubated with the antibody-coupled bead suspension, overnight at 4 °C with gentle agitation. The supernatant was collected after centrifugation, and the beads were washed twice with NaCl solution (0.25 M NaCl in 1× PBS) and twice with PBS alone. Bound proteins were eluted with 2× LDS sample buffer (Invitrogen) containing 0.5 % (v/v) 2-mercaptoethanol and denatured at 75°C for 20 min (IP with phospho-antibodies) or 37°C for 1 h (IP with anti-KCC2 antibodies) before centrifugation (13,000 g 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. The 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 (clone TuJ-1; MAB1195; R&D System; 1:1000) overnight at 4 °C. They were then washed three times with distilled water, three times with TBST milk solution, and incubated for 1 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). The membranes were then washed three times with TBST and once with TBS.

Fluorescence was detected and the relative intensities of immunoblot bands were determined using the 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, 1:1000) and sheep anti-phospho-SPAK (Ser373)/ phospho-OSR1 (Ser325) antibodies (S670B, second bleed, Dundee, 1:1000).

Kinase profiling assays

Kinase activity profiling was performed by Eurofins using radiometric assays to measure kinase catalytic activity for PCPZ concentrations ranging from 0.1-500 µM in DMSO or CLP-257 concentrations ranging from 0.1-1000 µM in DMSO, in the presence of 70 µM ATP. Equimolar concentrations of DMSO were used as controls. Additional information on the kinase profiler assay can be obtained from the contractor's website.

Human tissue and multi-electrode recordings

Cortical samples obtained in the operating room were immediately transferred to ice-cold (0-4°C), oxygenated solution (O_2/CO_2 95/5%) containing (in mM): N-methyl-d-glucamine 93, KCl 2.5, NaH_2PO_4 1.2, $NaHCO_3$ 30, HEPES 20, D-glucose 20, ascorbic acid 5, sodium pyruvate 3, $MgSO_4$ 10 and $CaCl_2$ 0.5 (300-310 mOsm, pH7.4) and transported to the laboratory within 15 to 20 minutes. Transverse hippocampo-subicular slices (400 µm thick) were prepared in the same solution using a vibratome (HM650V, Microm). The slices were maintained at 37°C in an interface chamber containing artificial cerebrospinal fluid (ACSF) consisting of (in mM): D-glucose 10, KCl 3.5, $NaHCO_3$ 26, NaH_2PO_4 1.25, NaCl 126, $CaCl_2$ 1.6 and $MgCl_2$ 1.2 (290 mOsm), equilibrated with 5% CO_2 in 95% O_2.

For testing the effects of PCPZ and CLP-257, we opted for a two-hour preincubation of the slices to ensure reliable effects on KCC2 clustering and trafficking. This prolonged duration was necessary because our prior observations showed that CLP-257 and PCPZ only induce stable KCC2 changes after prolonged exposure (2 h), not after short applications (30 min)(**Fig. S6**). Testing a range of incubation times was not feasible due to the limited availability of human mTLE tissue.

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, 1 mm vertical and 1.5 mm horizontal spacing). Slices were held in the recording chamber by a homemade 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 stage (MEA-VMT1, MultiChannel Systems) in order to register the position of the electrodes relative to the slice. Extracellular signals were acquired at 10 kHz using the MultiChannel Experimenter (MultiChannel Systems) and analyzed offline using custom software (Matlab, The Mathworks). Semi-automated IILD detection was performed according to a standard procedure (6). Briefly, the signal was denoised, filtered in the 1-40 Hz range, squared and then normalized over the entire recording. IILD detection was then semi-automated using a user-defined threshold.

Mouse model of temporal lobe epilepsy and ECoG recordings

8-week-old male C57Bl6/J mice were used in a lithium-pilocarpine based model of temporal lobe epilepsy as described (7). Briefly, animals received an intraperitoneal (i.p.) injection of LiCl (423 mg/kg) and scopolamine (1 mg/kg) 18-24 h and 1 h, respectively, before pilocarpine. Pilocarpine (75 mg/kg) was then injected i.p. and the mice were continuously monitored for the onset of *status epilepticus* (SE). The induction of status epilepticus (SE) was confirmed behaviorally by continuous stage 4-5 seizures according to Racine scale. Mice in which the first injection of pilocarpine did not trigger SE after one hour were given a second injection of 20 mg/kg. One hour after onset, SE was terminated by i.p. injection of diazepam and ketamine (both at 10 mg/kg). All animals received a subcutaneous (s.c.) injection of 500 µl of NaCl 0.9% 1 hour and 4 hours after the termination of SE to minimize dehydration. They were monitored daily for weight and behavior and were provided with enriched liquid chow (Fortimel Energy®) for the first 5-7

days after SE. Mice with >20% weight loss for more than 3 consecutive days were killed and discarded from further analysis.

For chronic PCPZ treatment, control and epileptic mice received two daily i.p. injections of either NaCl 0.9% or PCPZ (2 mg/kg in NaCl 0.9%). For CLP-290 treatment, epileptic mice received two daily i.p. injections of either (2-hydroxypropyl)-β-cyclodextrin (HPCD, 20% in water, pH 4.0) or CLP-290 (100 mg/kg in 20% HPCD). Injections were given 10 hours apart (typically 9 AM and 7 PM).

ECoG probe implantation was performed 28 days after 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 on 2-2.5%. For PCPZ experiments, 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 through holes drilled above the right hippocampus (1.94 mm posterior and 1.25 mm lateral with respect to the bregma) and above the cerebellum for reference. Screws were attached to the skull with dental cement. Mice received an s.c. of buprenorphine injection (0.05 mg/kg) 1 hour prior to surgery, an s.c. injection of lidocaine (0.5 mg/kg) immediately prior to the surgery, and two s.c. injections of metacam (5 mg/kg, immediately and 24 hours after the surgery) in order to minimize pain. One week after implantation, the ECoG signal (0.3-160 Hz) was recorded continuously using an Octal telemetric data receiver (Open Source Instruments) and LWDAQ software (Neuroarchiver, Open Source Instruments). The signal was amplified 100-fold and digitized at 512 Hz. Recordings were analyzed offline using custom 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 5 s). For high frequency oscillations (HFOs) and interictal discharges (IIDs), the ECoG signal was filtered with a minimum order high pass (>80 Hz) and low

pass (<20 Hz) filter, respectively, and processed with a Walsh transform. Events were then detected from the transformed signal using a user-defined threshold. Due to the characteristics of our telemetric ECoG recordings, HFO analysis was restricted to frequencies between 80 Hz and 160 Hz, thereby limiting the detection of higher frequency oscillations such as fast ripples (>250 Hz). While HFOs in this range are recognized as biomarkers of epileptiform activity, this frequency band may also encompass physiological ripple activity.

CLP-290 experiments (Fig. 6) were performed on a different recording system. Custom-made enamel-coated stainless-steel ECoG electrodes (#791000; A-M Systems, Sequim, WA) were implanted bilaterally above the hippocampus (1.8 mm posterior and 1.2 mm lateral to the bregma) and the motor cortex (1.8 mm anterior and 1.8 mm lateral to the bregma), and a reference and ground electrode were placed on the cerebellum. Electrode coordinates were derived and adjusted according to the Franklin and Paxinos atlas. After a 1-week recovery period, freely moving implanted mice were connected to an analog-to-digital converter amplifier (Natus Quantum or Brainbox EEG-1166) as part of video ECoG acquisition systems (Neurowork or Deltamed, Natus Medical Incorporated, Pleasanton, CA). EEG signals were recorded at a sampling rate of 2048 Hz and passband filtered between 0.5 and 70 Hz. Simultaneously, video recordings were synchronized with the electrophysiological signals and recorded at 25 frames per second using an Axis night vision camera. Mice were recorded continuously (5 days per week) for up to 3 weeks. One experimenter, blinded to the drug administration protocol, analyzed the ECoG recordings. Seizure detection was performed manually from a sliding window of 20-30 seconds based on specific criteria: abrupt onset and termination of events, amplitude threshold significantly above baseline activity (at least three standard deviations), and/or abnormal changes in background rhythm.

Immunohistochemistry

Mice were sacrificed 50 days after SE induction to assess histologic markers of epileptogenesis. Briefly, mice were deeply anesthetized by i.p. injection of Euthasol (180 mg/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, NaH_2PO_4 1.2, $NaHCO_3$ 30, HEPES 20, D-glucose 20, ascorbic acid 5, sodium pyruvate 3, $MgSO_4$ 10 and $CaCl_2$ 0.5 (300-310 mOsm, pH 7.4). Brains were removed, fixed in 4% PFA for 14-24 hours and stored in PBS solution containing 30 % sucrose and 0.01 % NaN_3. Coronal sections (40 µm thick) were cut with a cryotome (HM450, Microm) at -30°C, collected in PBS and stored at -20°C in Amaral's cryoprotective solution.

Labeling 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. After removal from Amaral, the slices were rinsed three times for 1 hour in PBS and then permeabilized for 4 hours 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 three times for one hour in PBS and incubated for 4 hours at RT with donkey anti-rabbit Cy3 secondary antibodies (711-165-152; Jackson Labs; 1:400) diluted in the same blocking solution as above. Slices were rinsed in PB (twice for 15 minutes), labeled with DAPI (1:2000), and incubated with PB overnight. Finally, the slices were mounted with Mowiol. Slices were imaged using a Leica SP5 confocal microscope. The distance between each focal plane was 1 µm and the objective used was 40× (N.A. 1.4).

Supplementary References

1. I. Chamma *et al.*, Activity-dependent regulation of the K/Cl transporter KCC2 membrane diffusion, clustering, and function in hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **33**, 15488-15503 (2013).
2. G. Gauvain *et al.*, The neuronal K-Cl cotransporter KCC2 influences postsynaptic AMPA receptor content and lateral diffusion in dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci* **108**, 15474-15479 (2011).
3. M. Heubl *et al.*, GABAA receptor dependent synaptic inhibition rapidly tunes KCC2 activity via the Cl−-sensitive WNK1 kinase. *Nature communications* **8**, 1776 (2017).
4. S. Khirug *et al.*, GABAergic depolarization of the axon initial segment in cortical principal neurons is caused by the Na-K-2Cl cotransporter NKCC1. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **28**, 4635-4639 (2008).
5. S. Al Awabdh *et al.*, Gephyrin Interacts with the K-Cl Cotransporter KCC2 to Regulate Its Surface Expression and Function in Cortical Neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **42**, 166-182 (2022).
6. J. Pallud *et al.*, Cortical GABAergic excitation contributes to epileptic activities around human glioma. *Science translational medicine* **6**, 244ra289 (2014).
7. G. Foffani, Y. G. Uzcategui, B. Gal, L. Menendez de la Prida, Reduced spike-timing reliability correlates with the emergence of fast ripples in the rat epileptic hippocampus. *Neuron* **55**, 930-941 (2007).

Patient ID	Neuropathology	Sex	Age at surgery	Age at seizure onset (years)	Seizure frequency	SEEG-video	Engel score	Medication	IILD-generating area (*in vitro*)
1	Hippocampal sclerosis, ILAE type 1	F	43	childhood (precise date unknown)	monthly	no	IC	LCS, LEV, LTG	undefined
2	Hippocampal sclerosis, ILAE type 1	F	49	11	weekly	no	IA	LCS, LEV	undefined
3	Hippocampal sclerosis, ILAE type 1	F	36	23	monthly	no	IA	LEV, OXC, PRP	DG, Sub.
4	Unconfirmed diagnosis of hippocampal sclerosis. Atrophy visible on MRI + malformation of cortical development.	F	37	18	monthly	yes	IV	LTG, ESC, CLB, ESCIT	DG, undefined
5	Hippocampal sclerosis, ILAE type 1	F	63	3	monthly	no	IA	CBZ, GBP, PB	undefined
6	Hippocampal sclerosis, ILAE type 3	M	58	40	monthly	no	ID	CBZ, LCS, CLB, R	DG, Sub.
7	Hippocampal sclerosis, ILAE type 1	F	16	12	monthly	yes	III	LEV, LTG	Sub. only
8	Hippocampal sclerosis, ILAE type 2	M	41	8	monthly	no	IC	LCS, LTG	Sub., undefined
9	No neuronal loss, ganglioglioma with BRAF mutation	F	45	20	weekly	yes	IA	TPM, PRP, CLB	DG, Sub.
10	Hippocampal sclerosis, ILAE type 1	M	37	29	weekly	yes	IA	ZNS, CBZ, LTG	undefined
11	Hippocampal sclerosis, not classifiable	F	32	12	monthly	yes	IIIA	LTG, PRP, TAC, AZT, EPZ, NVL, PRED, MEL	DG, Sub.
12	Hippocampal sclerosis, ILAE type 1	F	22	12	weekly	no	ID	CBZ, LCS, LTG, PRP	DG only
13	Hippocampal sclerosis, ILAE type 2	M	54	12-13	weekly	yes	IA	CBZ, TPM, ZNS	DG only

Supplementary Table 1. Clinical, neuropathological and pharmacological features of the patient cohort. Abbreviations: AZT: Azathioprine; CBZ: Carbamazepine; CLB: Clobazam; ESCIT: Escitalopram; ESC: Eslicarbazepine; EPZ: Esomeprazole; GBP: Gabapentine; LCS: Lacosamide; LTG: Lamotrigine; LEV: Levetiracetam; MEL: Melatonine; NVL: Nebivolol; OXC: Oxcarbazepine; PRP: Perampanel; PB: Phenobarbital; PRED: Prednisone; R: Ropinirole; TAC: Tacrolimus; TPM: Topimarate; ZNS: Zonesamide. DG: Dentate gyrus. Sub.: subiculum. Grey background indicates patients for which no significant effect of PCPZ or CLP-257 on interictal-like activity was observed *in vitro*.

Supplementary figures

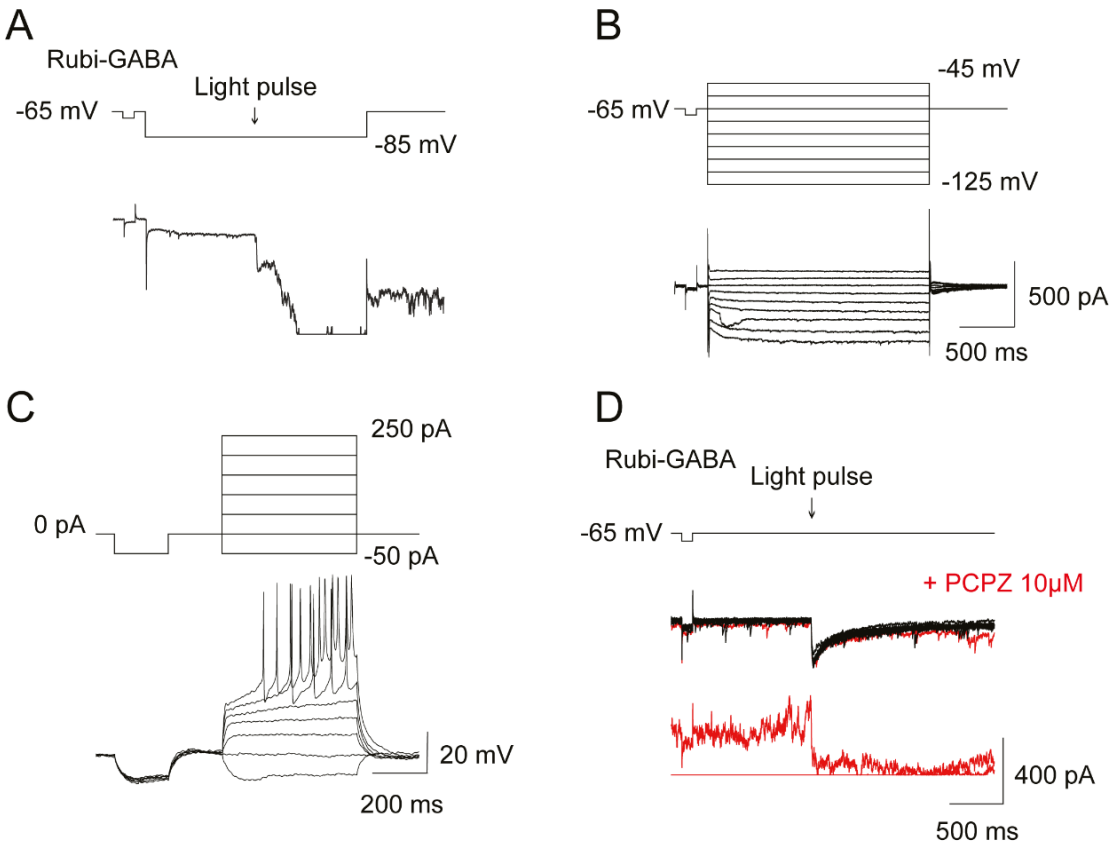


Figure S1. PCPZ induces UV light phototoxicity in hippocampal neurons *in vitro.* (A) Representative current evoked at -85mV by focal uncaging of Rubi-GABA (arrow, 30 µM) on the soma of hippocampal neurons, during application of 10 µM PCPZ. The signal is lost after emission of the 405 nm light pulse. (**B)** Representative voltage-clamp recordings of a neuron at different potentials (from -125 to -45 mV), in the presence of PCPZ (10 µM). The recording is stable over time in the absence of the light pulse. (**C)** Representative current-clamp recordings from the same neuron as in B. A normal firing pattern is observed after the application of PCPZ. (**D)** Superimposition 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).

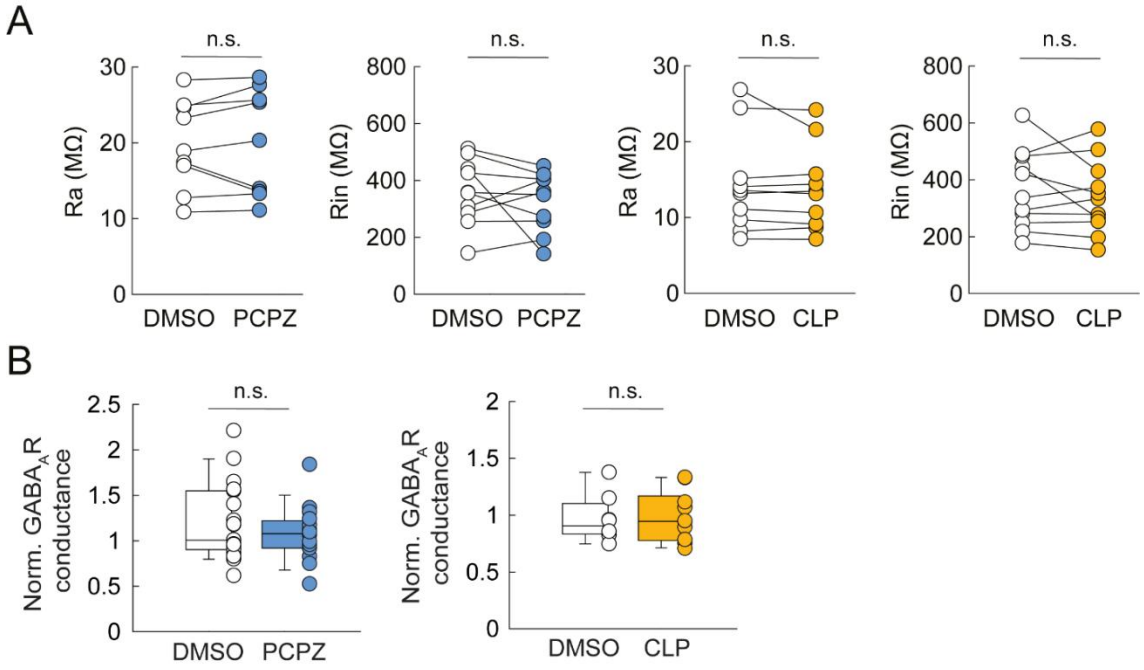


Figure S2. PCPZ and CLP-257 do not affect membrane properties or $GABA_A$ receptor conductance. (A) Summary plots showing the lack of significant effect of PCPZ or CLP-257 application on series (Ra) or membrane (Rin) resistance (n=10 and n=11 neurons, respectively, from 2 independent cultures. Wilcoxon test, n.s.: not significant). **(B)** Summary graph showing normalized $GABA_AR$ conductance in control vs PCPZ (n=19 and n=16 neurons, respectively, from 5 independent cultures) or control vs. CLP-257-treated neurons (n=8 and n=10 neurons, respectively, from 4 independent cultures. Wilcoxon test, n.s.: not significant).

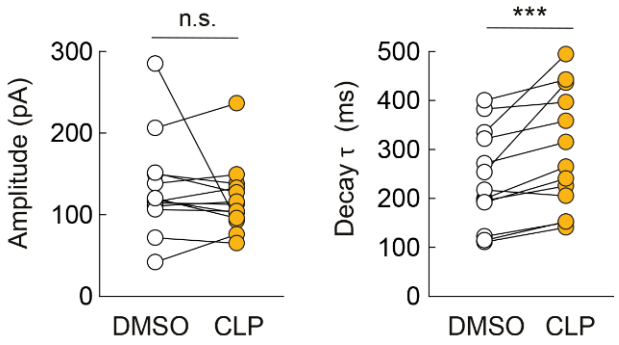


Figure S3. CLP-257 modulates $GABA_A$ receptor function at submicromolar concentrations. Summary plots showing the effect of 0.7 μM CLP-257 on the peak amplitude (left) and decay time constant (right) of currents evoked by focal uncaging of Rubi-GABA (30 μM) on hippocampal neurons in vitro (n=13 neurons from 3 independent cultures each. *** Wilcoxon test, $p<0.001$, n.s.: not significant).

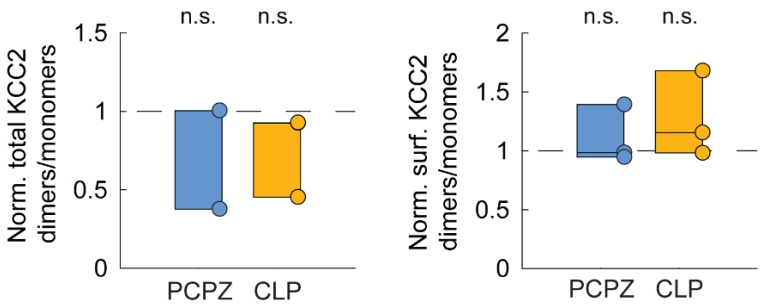


Figure S4. PCPZ and CLP-257 do not affect KCC2 dimerization. Summary graphs showing the fractions (normalized to control) of total (left) and surface (right) KCC2 dimers to monomers. No significant effect was observed after treatment with PCPZ or CLP-257 (n=3 independent cultures. t-test, n.s.: not significant).

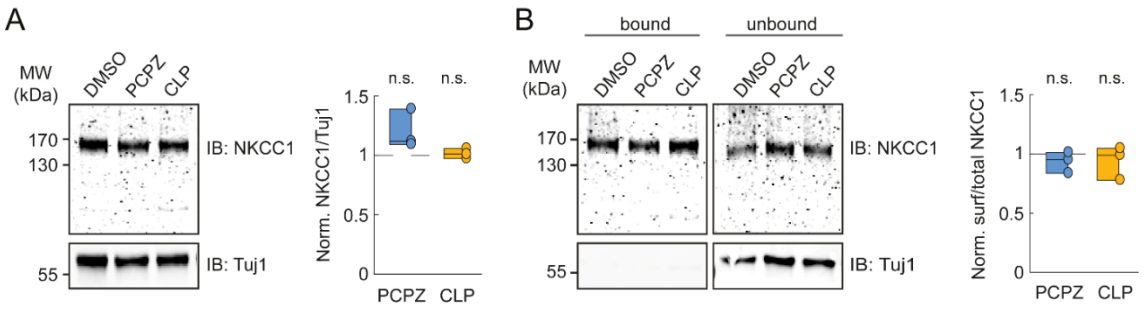


Figure S5. PCPZ and CLP-257 do not affect total or plasmalemmal expression levels of NKCC1. (A) Representative immunoblots (left) of protein extracts from hippocampal cultures incubated for 2 hours with either PCPZ (10 µM in DMSO), CLP-257 (7 µM in DMSO), or DMSO alone. Right, quantification of 3 independent experiments. No significant change in total NKCC1 expression was detected upon PCPZ or CLP-257 treatment as compared to control (t-test, n.s.: not significant). (**B)** Immunoblots (left) and quantification (right) showing that the biotinylated surface NKCC1 fraction (bound/total) was also unaffected by incubation with PCPZ or CLP-257 (n=3 independent cultures. t-test, n.s.: not significant).

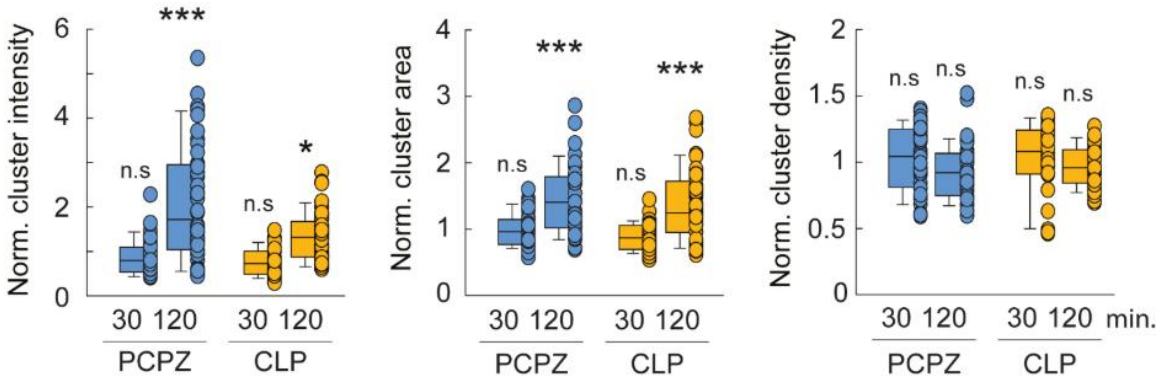


Figure S6. Time dependence of PCPZ- and CLP-257- induced changes in KCC2 clustering. Boxplots showing the distributions of the integrated intensity, area and density of KCC2 clusters in control neurons and in neurons exposed to either PCPZ or CLP-257, for 30 minutes or 2 hours. Note that significant effects of both drugs are observed only after 2 hours of treatment, while no significant changes are detected after 30 minutes. n = 10 neurons per condition per culture, 4 independent cultures per condition, except for CLP-257 at 2 hours (3 independent cultures). Statistical significance was assessed using t-test or Mann–Whitney test: *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

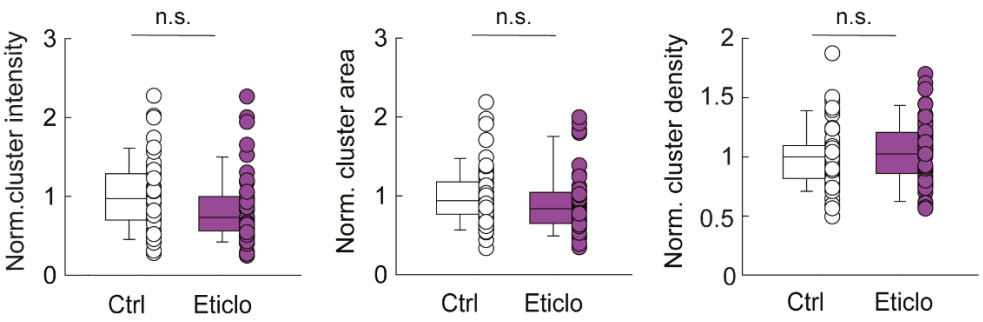


Figure S7. The D2R antagonist eticlopride does not affect KCC2 clustering in hippocampal neurons. Box plots showing the distribution of normalized integrated intensity (left), area (middle), and density (right) of KCC2 clusters in control neurons and neurons incubated with 2 µM eticlopride for 2 hours. No significant difference was found between control and eticlopride-treated neurons (n=10 neurons per condition per culture, and 5 independent cultures per condition, Mann-Whitney test, n.s.: not significant).

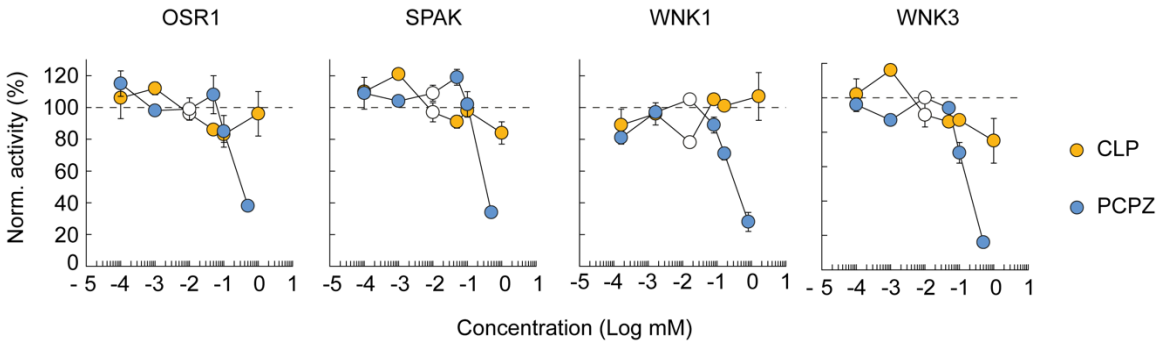


Figure S8. PCPZ and CLP-257 do not inhibit WNK/SPAK/OSR1 kinase activity. Kinase activity profile of recombinant human OSR1, STK39 (SPAK), WNK1 and WNK3 in the presence of PCPZ (blue symbols) or CLP-257 (orange symbols) concentrations ranging from 0.1-500 and 1-1000 μM, respectively. Means±SD of 2 replicates were normalized to control (DMSO). Open symbols represent the closest concentration of PCPZ and CLP-257 used in all other in vitro assays in our study (10 and 7 μM, respectively). No detectable inhibition of any kinase was observed at these concentrations.

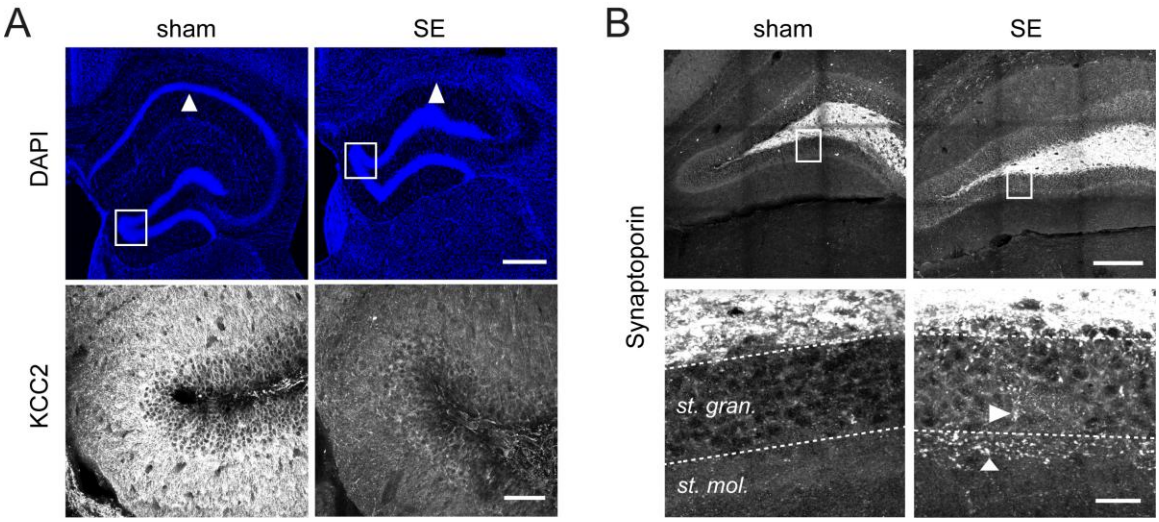


Figure S9. Lithium-pilocarpine epileptic mice display characteristic hippocampal histological features of mesial temporal epilepsy with hippocampal sclerosis (enlarged illustrations from Figure 6). **(A)** Top, representative confocal fluorescent micrographs of DAPI staining of hippocampal slices from naïve (no SE) and epileptic mice. Arrowheads indicate the CA1 region, which is largely sclerotic in the epileptic mouse. Also note the dispersion of the dentate gyrus granule cells. Scale: 400 µm. Bottom, confocal fluorescent micrographs of KCC2 immunolabelling in dentate gyrus, from the regions boxed in top panels, showing reduced KCC2 immunofluorescence in the dentate gyrus of the epileptic mouse. Scale: 60 µm **(B)** Top, representative confocal fluorescent micrographs of synaptoporin immunolabelling of the dentate gyrus of control and epileptic mice. Scale: 200 µm. Bottom, magnification of the regions boxed in top panels, showing ectopic synaptoporin-immunopositive mossy fibers in the stratum granulosum and stratum moleculare only in the epileptic mouse. Scale: 20 µm.

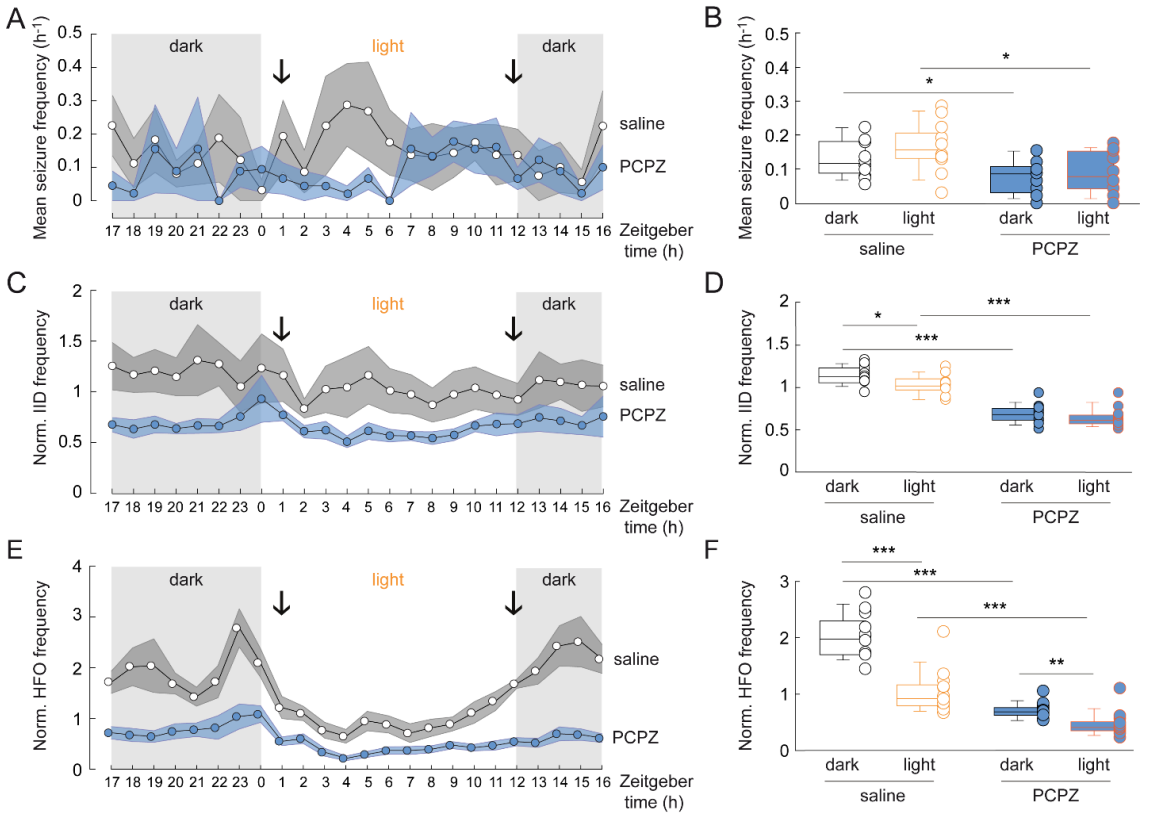


Figure S10. PCPZ reduces seizure frequency and interictal activity independent of their circadian modulation. (A) Summary plot showing averaged seizure frequency during the day (number of seizures per hour/number of recording days, mean±SEM) during the test period (days 40 to 44 post-SE), for mice injected twice daily (black arrows) with saline (gray, n=8) or PCPZ (2 mg/kg, blue, n=9). Light and dark periods are indicated. The time scale is the Zeitgeber time. ZT0=time when light is turned on (8 AM in our conditions). **(B)** Box plots showing the distributions of mean seizure frequency for dark and light periods of animals treated with saline or PCPZ. *t-test $p<0.05$. **(C)** Summary plot as in A showing the averaged IID frequency during the daytime, during the test period. Data are normalized to the averaged IID frequency during the control period. **(D)** Same as in B, showing reduced IID frequency in PCPZ-treated mice during both light and dark periods. t-test *$p<0.05$, ***$p<0.001$. **(E)** Summary plot as in C, showing the averaged and normalized HFO frequency during the day, during the test period. **(F)** Same as in D, showing normalized averaged HFO frequency. t-test *$p<0.05$ **$p<0.01$ ***$p<0.001$.

Conclusion

Cette étude, basée sur un ensemble de modèles expérimentaux, démontre l'intérêt thérapeutique de deux molécules qui potentialisent la fonction de KCC2 (le CLP-257 et la PCPZ) dans le traitement de l'épilepsie du lobe temporal mésial. Nous avons démontré que ces deux composés régulent la fonction de KCC2 en favorisant son agrégation au sein de la membrane plasmique, un phénomène qui a précédemment été corrélé à une augmentation du transport de chlorure (Chamma et al., 2013; Watanabe et al., 2009). Nous avons aussi démontré que le CLP-257, en plus de son action sur KCC2, potentialise la fonction des récepteurs GABA-A extra-synaptiques. Cela nous a permis de résoudre la controverse quant au mode d'action de cette molécule (Cardarelli et al., 2017; M. Gagnon et al., 2013). Contrairement à ce qui a été démontré dans différents modèles de pathologies (M. Gagnon et al., 2013; Liabeuf et al., 2017), nous n'avons pas observé d'effet des composés étudiés sur l'expression, l'enrichissement membranaire ainsi que la phosphorylation des résidus du domaine C-terminal de KCC2. Cette discordance repose probablement sur l'utilisation de différents modèles expérimentaux, et notamment sur le fait que nous ayons étudié le mode d'action de ces molécules dans des neurones sains. L'utilisation de composés qui augmentent la fonction des protéines KCC2 endogènes est particulièrement utile dans le cadre de l'épilepsie. Une alternative pourrait consister à promouvoir la surexpression du transporteur, comme cela a été envisagé pour d'autres pathologies (Tang et al., 2019; Yeo et al., 2021). Toutefois, l'activité épileptique, du moins lors d'un *status epilepticus*, entraine une activation de la voie WNK-SPAK décrite précédemment (Heubl et al., 2017; voir Discussion partie II). Il est donc probable que l'effet d'une telle surexpression de KCC2 soit compromis par une réduction de sa stabilité membranaire.

En conclusion, cette étude a révélé que le CLP-257 et la PCPZ suppriment presque complètement les décharges intericales au sein de tranches d'hippocampe provenant de patients épileptiques. Similairement, elle a démontré que ces composés diminuent la fréquence des crises épileptiques dans un modèle murin d'ELTm, la PCPZ réduisant également différents types d'activités intericales. Il est néanmoins intéressant de remarquer que la PCPZ ne diminue ni la durée des crises ni la puissance du signal électrophysiologique qui leur est associé (ces paramètres n'ont pas été mesurés dans le cas du CLP-290). Cela suggère que l'effet dépolarisant du GABA serait mis en jeu dans l'initiation des crises plutôt que dans leur maintien.

Résultats additionnels

Au cours de ma thèse, j'ai participé à un consortium ayant pour objectif d'étudier l'implication des neurones Cajal-Retzius dans l'épilepsie. Ce projet, qui nous a posé ainsi qu'à nos collaborateurs, de nombreuses difficultés techniques, n'est pas finalisé à ce jour. Il m'a néanmoins permis de mettre au point une stratégie d'expression stable et spécifique de transgènes dans les neurones Cajal-Retzius hippocampiques, une population dont le ciblage restait un obstacle technique. Ces outils, ainsi que les paramètres expérimentaux que j'ai caractérisés, pourront être exploités au-delà de ma thèse pour étudier le rôle de KCC2 dans le devenir de ces neurones. Je vais donc présenter dans ces résultats additionnels le contexte du projet, les outils que j'ai développés, les expériences que j'ai réalisées, et les difficultés que j'ai rencontrées.

Les cellules Cajal-Retzius sont des neurones transitoires localisés dans la strate la plus superficielle du néocortex (L1) ainsi que dans l'hippocampe, autour de la fissure hippocampique (Causeret et al., 2021; Del Río et al., 1995; voir partie II.3.1 de l'introduction). Dans l'hippocampe sain, environ 80% des CRs sont éliminés lors de la seconde vague apoptotique développementale chez la souris (Moan et al., 2025; Riva et al., 2023; voir Introduction partie II.3.3). Le devenir des neurones Cajal-Retzius dans l'hippocampe des patients présentant une épilepsie du lobe temporal est controversé. En effet, une étude initiale a rapporté une augmentation de la quantité de neurones positifs pour la calrétinine dans la couche lacuneuse moléculaire de la corne d'Ammon de patients atteints d'ELT avec sclérose temporale mésiale en comparaison d'individus contrôles (Blümcke et al., 1999). Ces neurones ont été identifiés comme des cellules Cajal-Retzius sur la base de leur localisation et de leur morphologie bipolaire (Blümcke et al., 1999). Par la suite, une autre équipe a analysé le devenir des neurones immunopositifs pour la calrétinine lors du phénomène de sclérose hippocampique (Toth et al., 2010). Les auteurs ont, à l'inverse, observé une diminution de la densité des cellules positives à la calrétinine dans la couche lacuneuse moléculaire de la corne d'Ammon de patients épileptiques avec et sans sclérose temporale mésiale en comparaison d'individus contrôles dont le tissu a été fixé après un bref délai post-mortem (Toth et al., 2010). La question du devenir des neurones Cajal-Retzius dans l'hippocampe de patients avec une ELT est donc encore en suspens. L'objectif de notre consortium était de déterminer s'il existe une modification de la survie des CRs dans l'hippocampe de patients atteints d'épilepsie du lobe temporal et si tel est le cas, si cette modification provient d'un défaut dans l'apoptose neurodéveloppementale physiologique de ces cellules. Notre hypothèse était que l'ELT serait associée à une inhibition de l'apoptose développementale des neurones Cajal-Retzius,

résultant en une augmentation de leur survie dans l'hippocampe adulte et en leur insertion dans les réseaux hippocampiques dysfonctionnels.

Dans le cadre de ce projet, mon objectif était de caractériser plus en détail les déterminants physiologiques de l'apoptose des neurones Cajal-Retzius dans l'hippocampe sain. Comme nous l'avons détaillé dans l'introduction (partie II.3.3), les CRs meurent lors du développement cortical selon un phénomène d'apoptose qui est déclenché par la transmission GABAergique dépolarisante (Blanquie et al., 2016; Riva et al., 2019). Or, ces neurones sont caractérisés par une absence d'augmentation de l'expression de KCC2 lors du développement périnatal, qui est un phénomène essentiel à la transition entre une réponse dépolarisante et une réponse hyperpolarisante au GABA (Pozas et al., 2008; Riva et al., 2019; Rivera et al., 1999; Szrinivasan et al., 2025). De plus, les CRs hippocampiques meurent majoritairement lors des deux premières semaines après la naissance, ce qui correspond à la fenêtre de temps au cours de laquelle KCC2 commence à s'exprimer fortement dans les autres types de neurones (Moan et al., 2025). Nous avons donc voulu tester le rôle de l'absence d'expression de KCC2 dans le devenir des neurones Cajal-Retzius en surexprimant le transporteur spécifiquement dans ces cellules au cours du développement. Pour cela, j'ai utilisé des méthodes d'infection virale *in utero* et néonatale afin de tenter de surexprimer une protéine KCC2 exogène dans les CRs pendant une période définie.

L'infection virale *in utero* permet une expression stable et efficace de transgènes dans les neurones Cajal-Retzius

Avant de surexprimer KCC2 dans les cellules Cajal-Retzius, j'ai voulu vérifier que l'infection *in utero* permettait une expression efficace et de longue durée des transgènes dans ces neurones. Pour cela, j'ai injecté un virus adéno-associé (AAV) AAV2/9-CAG-FLEX(tdTomato) dans les ventricules latéraux d'embryons de la lignée murine ΔNp73-Cre-IRES-GFP (ci-après nommée ΔNp73-Cre). L'utilisation d'un virus dont le génome contient le gène de la tdTomato inversé et entouré de sites Lox permet la recombinaison du génome viral et l'expression de la tdTomato uniquement dans les cellules qui expriment la Cre-recombinase dans la lignée ΔNp73-Cre, que sont les neurones Cajal-Retzius, les cellules épithéliales des plexus choroïdes ainsi que quelques autres types de neurones, plus éloignés de l'hippocampe (Tissir et al., 2009). Les embryons ont été injectés à E13.5 car cela correspond à la fin de la période de différenciation des CRs (X. Gu et al., 2011; Hevner et al., 2003). Il est en effet préférable de réserver les AAVs à des cellules post-mitotiques car ces virus sont non-intégratifs (He et al., 2021). Leur génome est par conséquent dilué entre les cellules filles à chaque division et n'est donc maintenu stable que dans des cellules qui ne se divisent plus (He et al., 2021).

Dans un premier temps, j'ai prélevé le cerveau de deux embryons à E18.5 (**Fig.1A-B**). Les tranches ont été marquées avec un anticorps contre la tdTomato issue du virus, et contre la GFP exprimée de façon endogène par la lignée murine dans les cellules qui expriment ΔNp73 (**Fig.1B**). Nous pouvons observer une déformation du cortex au niveau du site d'injection, un artéfact probablement dû à un problème lors de la chirurgie (**Fig.1B**). De nombreux neurones, localisés autour du gyrus denté en formation et avec une morphologie caractéristique des neurones Cajal-Retzius, expriment la tdTomato (**Fig.1B**). Parmi les tranches des deux animaux analysés, le taux d'infection des CRs (nombre de cellules Tdt+ et GFP+ parmi les cellules GFP+) est de 54% et aucun autre type de neurone ne semble avoir été infecté (**Fig.1B**). L'infection virale *in utero* permet donc l'expression spécifique et efficace de transgènes dans les neurones Cajal-Retzius lors du développement.

J'ai ensuite à nouveau infecté des embryons avec le virus AAV2/9-CAG-FLEX(tdTomato) et je les ai laissés se développer pendant trois semaines après la naissance afin de déterminer si cette méthode permet une expression de longue durée des transgènes (**Fig.1A, C ;** 2 animaux). A P30, de nombreux neurones localisés autour de la fissure hippocampique expriment la tdTomato (**Fig.1C**). Ces neurones présentent eux aussi la morphologie caractéristique des CRs (**Fig.1C**). Notre méthode permet donc une expression stable de transgènes dans les neurones Cajal-Retzius. Néanmoins, j'ai également observé que la tdTomato est exprimée dans quelques cellules en grain du gyrus denté dans certaines tranches d'hippocampe. Cela est vraisemblablement dû à l'expression sporadique de ΔNp73 par certaines cellules en grain à partir de la troisième semaine après la naissance chez la souris (van Bruggen et al., 2023). L'effet de l'expression de KCC2 sur les cellules Cajal-Retzius étant probablement individuel pour chaque neurone, cela n'est *a priori* pas gênant pour notre analyse.

Utilisation d'un système TetOn afin de contrôler l'expression de transgènes dans le temps

J'ai réalisé les expériences impliquant le système TetOn, en collaboration avec Beatrice Questori, qui a réalisé son stage de Master 2 dans l'équipe sous ma responsabilité. La période temporelle lors de laquelle KCC2 commence à s'exprimer est déterminante pour la maturation des neurones lors du développement. En effet, une expression précoce du transporteur entraine des défauts de morphogénèse des neurones pyramidaux du cortex (e.g., Awad et al., 2018; Cancedda et al., 2007) et altère la migration des interneurones (Bortone & Polleux, 2009). J'ai donc conçu un génome viral dans lequel l'expression du transgène, en plus d'être

dépendante de l'expression de la Cre-recombinase, est sous le contrôle d'un mécanisme TetOn. Dans ce type de système, le transgène est inséré en aval d'un promoteur sensible à la tétracycline (TRE), qui est activé en présence de doxycycline (**Fig.1D**, voir Matériel et méthodes). Afin de réduire le stress infligé aux animaux lors de la période post-natale, nous nous sommes inspirés de différents protocoles afin de diluer la doxycycline dans l'eau de boisson de la mère pour qu'elle transmette l'antibiotique à ses petits par la lactation (Redelsperger et al., 2016; R. Sun et al., 2012).

Nous avons injecté le virus AAV2/9-TetOn-FLEX(mCherry) dans les ventricules cérébraux des embryons à E13.5. Puis, nous avons dilué différentes doses de doxycycline (500 µg/ml ou 2 mg/ml) dans l'eau de boisson des mères allaitantes de P13 à P23. Aucun neurone positif pour la mCherry n'a été détecté à P23 chez les souris traitées avec 500 µg/ml de doxycycline (résultats non montrés) et seulement quelques neurones exprimant le transgène ont été observés chez les animaux ayant reçu 2 mg/ml d'antibiotique (**Fig.1E**). Afin de déterminer si ces résultats traduisent une faible ingestion de doxycycline par les mères lors de l'abreuvement ou une mauvaise transmission lors de la lactation, nous avons injecté 50 mg/kg de doxycycline à des femelles gestantes de E15.5 à E18.5 par voie sous-cutanée. Le cerveau des embryons a été extrait à E18.5 et nous n'avons à nouveau pas observé de neurones exprimant la mCherry (résultats non montrés). Etant donné que nous ne sommes pas parvenues à faire fonctionner cette stratégie afin de contrôler l'expression de transgènes dans les neurones Cajal-Retzius, je me suis orientée vers d'autres méthodes.

Par ailleurs, j'ai pris conscience que les AAVs sont particulièrement limités dans la taille de leur génome. En effet, l'encapsidation de plasmides de taille supérieure à 5 kb dans des AAVs entraine une forte diminution de l'expression du transgène par les cellules infectées (Z. Wu et al., 2010). La séquence codante de KCC2 fait environ 3.4 kb, par conséquent un plasmide contenant la construction FLEX(KCC2Flag-P2A-mCherry) ainsi que les séquences nécessaires à la réplication de l'ADN viral se trouve au-dessus de la taille maximale recommandée pour ces virus. J'ai donc poursuivi mes expériences avec des lentivirus, qui ont la capacité d'encapsider de plus larges séquences nucléotidiques que les AAVs (jusqu'à 10 kb) (Sweeney & Vink, 2021). Contrairement aux AAVs, les lentivirus insèrent la portion de leur génome qui est localisée entre les séquences LTR dans l'ADN des cellules qu'ils infectent (Poletti & Mavilio, 2021). Ce caractère intégratif confère une expression stable à leurs transgènes malgré les divisions cellulaires (Poletti & Mavilio, 2021).

L'injection intraventriculaire *in utero* est plus efficace que l'injection néo-natale de lentivirus pour cibler les neurones Cajal-Retzius hippocampiques

Puisque notre méthode pour contrôler l'expression de la mCherry dans les CRs avec la doxycycline n'a pas fonctionné, j'ai voulu tester si une injection post-natale de lentivirus permettrait l'expression d'un transgène dans l'hippocampe à partir de la première semaine après la naissance. J'ai injecté un lentivirus test (LV-U6-shNT-PGK-EGFP) dans l'un des ventricules latéraux de souris P2 WT. J'ai ensuite perfusé les souris à P22 afin d'analyser la diffusion du virus dans leur cerveau (**Fig.2A**). Chez l'ensemble des trois animaux infectés, de nombreuses cellules exprimant la GFP sont visibles autour des ventricules (cellules des plexus choroïdes ou cellules épendymaires) ainsi que dans le cortex entorhinal mais il y a très peu de neurones infectés dans l'hippocampe (**Fig.2B**). Cela suggère que les lentivirus ne diffusent pas suffisamment dans le cerveau à P2 pour atteindre l'hippocampe. L'existence d'une faible diffusion de ces virus lors d'injections néonatales a en outre été précédemment rapportée (Watson et al., 2005).

J'ai donc réalisé de nouvelles injections afin de déterminer le stade développemental le plus tardif auquel je pourrais infecter les embryons afin d'obtenir un taux d'infection maximal des neurones Cajal-Retzius. Différentes portées de souris ont été injectées avec le lentivirus LV-EF1a-FLEX(mCherry) à E13.5 ou E14.5 et perfusées à P15 (**Fig.2C-D**). J'ai observé une nette différence dans la quantité de neurones infectés entre les deux stades de développement. En effet, la souris infectée à E13.5 présente une proportion largement plus importante de neurones Cajal-Retzius positifs pour la mCherry que les souris infectées à E14.5 (**Fig.2D**). Il semblerait donc que seule une injection virale précoce permette d'obtenir une infection efficace des CRs par notre lentivirus. Or, comme nous l'avons détaillé précédemment, une expression précoce de KCC2 lors du développement peut s'avérer délétère pour les neurones. J'ai donc déterminé à quel stade développemental le transgène commence à s'exprimer lorsque les embryons sont infectés à E13.5. Pour cela, j'ai injecté le virus contrôle LV-EF1a-FLEX(mCherry) à E13.5 et ai collecté les embryons de mères différentes à 3, 5 et 7 jours (E16.5, E18.5 et P0) post-infection (**Fig.2E-G**). Nous détectons la présence de cellules p73 positives exprimant la mCherry (hors cellules des plexus choroïdes) dès E16.5 (**Fig.2F-G**). Néanmoins, ces cellules sont peu nombreuses et représentent moins de 5% des CRs à E16.5 et E18.5 (**Fig.2G**). La quantité de neurones Cajal-Retzius qui expriment le transgène double entre E18.5 et P0 (**Fig.2G**) et continue probablement d'augmenter lors des deux premières semaines après la naissance au vu du ratio de cellules infectées à P15 (**Fig.2D**). Ainsi, cette méthode entraine l'expression du transgène dans quelques cellules Cajal-Retzius dès E16.5, mais ce n'est que lors de la période post-natale que la majorité des CRs infectés commencent

à exprimer le gène d'intérêt. Cette technique semble donc relativement satisfaisante pour mimer l'augmentation de l'expression de KCC2 après la naissance.

Comparaison de la survie des neurones Cajal-Retzius en fonction de l'expression de KCC2

Afin de tester l'effet de l'expression de KCC2 recombinant sur l'apoptose des cellules Cajal-Retzius, j'ai conçu un nouveau lentivirus LV-EF1a-FLEX(KCC2Flag-P2A-mCherry). Une fois intégrée dans le génome de la cellule hôte, cette construction code pour un ARNm polycistronique qui forme les protéines KCC2-3xFlag et mCherry par le biais d'un mécanisme de saut du ribosome sur le P2A entrainant la séparation des deux protéines dès la traduction (Z. Liu et al., 2017). KCC2-Flag est une protéine KCC2 recombinante de souris dans laquelle un tag 3xFlag (DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK) a été inséré dans la seconde boucle extracellulaire, comme dans l'étude décrite précédemment (Matériel et méthodes MM.1 ; Article principal). J'ai infecté des cellules HEK-293 avec ce virus (ci-après nommé KCC2) ou avec le lentivirus contrôle correspondant (LV-EF1a-FLEX(mCherry)), avec ou sans virus *helper* exprimant la Cre-recombinase (AAV2/1-CMV-HI-eGFP-Cre-WPRE-SV40) (**Fig.3A-C**). J'ai ensuite analysé l'expression des transgènes 72h après l'infection en réalisant un Western blot (**Fig.3A-C**). Les cellules infectées avec l'un des deux lentivirus et sans l'AAV *helper* n'expriment pas les gènes d'intérêt (**Fig.3A-C**). Cela démontre que l'expression des transgènes requiert la présence de la Cre-recombinase. Les cellules infectées avec le virus *helper* et le lentivirus KCC2 expriment la mCherry ainsi que KCC2-Flag (**Fig.3A-C**). Les deux virus semblent donc exprimer efficacement et spécifiquement les gènes d'intérêt. Nous pouvons cependant noter que les cellules infectées avec le virus contrôle expriment plus de deux fois plus la mCherry que celles infectées avec le virus KCC2 (**Fig.3A-C**). Il n'était néanmoins pas possible, à ce stade de l'analyse, de déterminer s'il s'agissait d'un artéfact propre à cette expérience.

J'ai ensuite voulu tester notre hypothèse de départ, selon laquelle l'expression de KCC2 favoriserait la survie des neurones Cajal-Retzius. Pour cela, j'ai injecté les deux lentivirus précédemment décrits dans les ventricules cérébraux d'embryons de la lignée ΔNp73-Cre à E13.5 (**Fig.3D-F**). Le titre et le volume d'injection des deux virus ont été maintenus identiques ($8{,}58.10^8$ TU/ml, 1.5 µl) afin que les neurones soient au contact de la même quantité de particules virales, indépendamment de la condition expérimentale. Les souris ont été perfusées à P30 et les cellules positives pour p73 et pour la mCherry ont été dénombrées (**Fig.3E-F**). Malheureusement, en accord avec les données obtenues sur les cellules hétérologues, le virus contrôle présente un taux d'infection/d'expression de la mCherry

(mesuré par le nombre de cellules mCherry+ et p73+ parmi les cellules p73+) entre 2 et 5 fois supérieur à celui du virus exprimant KCC2 selon la région hippocampique étudiée (**Fig.3E-F**). Ce phénomène n'est pas dû à une disparition massive des neurones Cajal-Retzius lorsqu'ils expriment KCC2 car nous pouvons observer de nombreuses cellules positives pour p73 dans cette condition (fissure hippocampique : environ 340 (contrôle) *vs.* 310 (KCC2) cellules p73+ par hippocampe ; gyrus denté : environ 120 (contrôle) *vs*. 150 (KCC2) cellules p73+ par hippocampe ; **Fig.3E** ; quantification non montrée). Le comptage des cellules p73 révèle que l'infection avec le virus exprimant KCC2 semble entrainer une diminution de 12% du nombre de CRs autour de la fissure hippocampique et une augmentation de 25% du nombre de CRs dans le *stratum moleculare* du feuillet infrapyramidal du gyrus denté (**Fig.3E** ; quantification non montrée). Nous n'avons cependant pas suffisamment d'animaux pour réaliser des tests statistiques. Cela pourrait suggérer une régulation différentielle de l'apoptose des neurones Cajal-Retzius en fonction de leur localisation dans l'hippocampe. Néanmoins, la forte différence d''expression de la mCherry entre les deux virus nous empêche pour l'heure de conclure de façon définitive quant à l'effet d'une surexpression de KCC2 sur l'apoptose des cellules Cajal-Retzius. Ces expériences devront donc être répliquées afin d'assurer une puissance statistique acceptable.

Ainsi, l'injection virale intraventriculaire *in utero* (avec des AAVs ou des lentivirus) est une méthode particulièrement efficace pour exprimer un transgène de façon stable dans une large portion des neurones Cajal-Retzius hippocampiques. Néanmoins, j'ai rencontré un ensemble de problèmes techniques lors de ce projet, qui sont essentiellement liés aux vecteurs viraux que j'ai utilisés. En effet, l'utilisation d'un vecteur de type TetOn ne m'a pas permis d'obtenir une quantité suffisante de neurones exprimant le gène d'intérêt. Étant donné l'efficacité des autres AAVs pour infecter les neurones Cajal-Retzius, il s'agit probablement d'un problème lié à la doxycycline, dont la dose diminue certainement à chaque étape de sa transmission et qui traverse assez faiblement la barrière hémato-encéphalique.

L'injection intraventriculaire de lentivirus à P2 ne permet pas une infection efficace de l'hippocampe. Cela est en accord avec une autre étude qui a démontré que les lentivirus sont beaucoup moins efficaces que les AAVs lors d'infections néonatales (Watson et al., 2005). En effet, tandis que l'injection intraventriculaire d'AAVs à P0 permet une infection efficace de l'hippocampe (Chakrabarty et al., 2013; J.-Y. Kim et al., 2014), l'injection de lentivirus au même âge semble permettre l'infection des cellules épendymaires et des cellules épithéliales des plexus choroïdes, qui sont directement au contact des ventricules, mais pas d'autres structures cérébrales (Watson et al., 2005).

Enfin, bien que l'injection intraventriculaire d'un lentivirus contrôle exprimant la mCherry à E13.5 permette une infection particulièrement efficace des neurones Cajal-Retzius, l'injection

d’un virus similaire exprimant additionnellement KCC2-Flag entraine une infection beaucoup moins performante. Cela pourrait être dû à une moindre infectivité ou à une faible efficacité de la transcription inversée du génome viral à cause de sa plus grande taille. Dans tous les cas, cela nous empêche, à ce jour, de conclure de façon définitive quant au rôle de l’absence d’expression de KCC2 dans l’apoptose des neurones Cajal-Retzius. Ces expériences devront donc être répliquées afin d’assurer une puissance statistique acceptable.

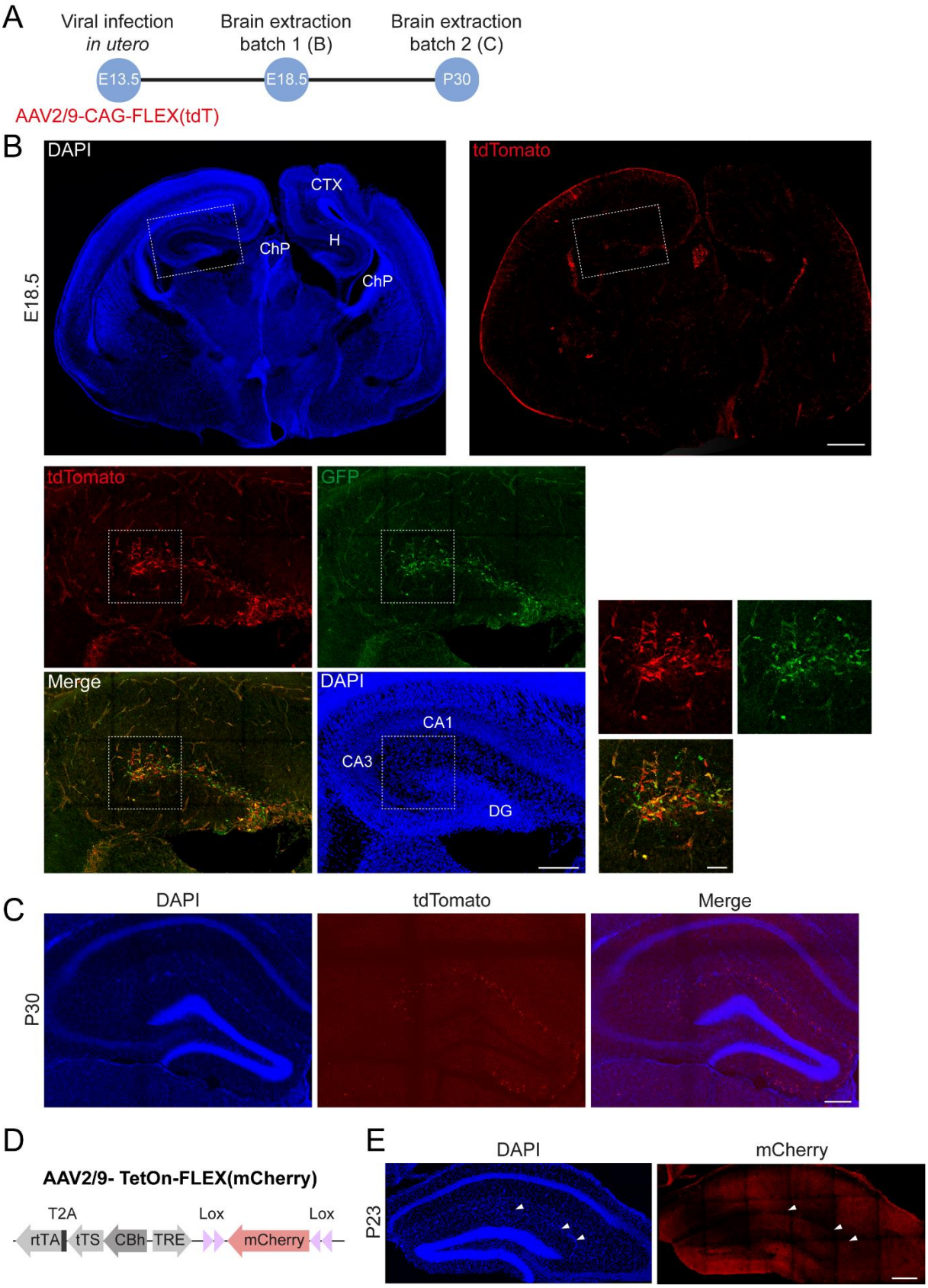


Figure 1. L'infection virale *in utero* permet l'expression stable des transgènes dans les neurones Cajal-Retzius. A, Chronologie des expériences. **B**, Images représentatives de la projection maximale d'une tranche de cerveau d'embryon ΔNp73-Cre-IRES-GFP (E18.5) ayant subi une injection virale intraventriculaire (AAV2/9-CAG-Flex(tdTomato)) à E13.5. Les

tranches ont été marquées avec un anticorps contre la tdTomato, issue du génome viral, et contre la GFP, issue de la lignée murine. Notez la déformation du cortex due à un souci d'injection. CA : corne d'Ammon, ChP : plexus choroïdes, CTX : cortex, DG : gyrus denté, H : hippocampe. Barre d'échelle : 500 µm, Barre d'échelle zoom 1 : 500 µm, Barre d'échelle zoom 2 : 45 µm. **C**, Images représentatives de la projection maximale d'une tranche de cerveau de souris ΔNp73-Cre (P30) ayant subi une injection virale intraventriculaire (AAV2/9-CAG-Flex(tdTomato)) à E13.5. Les tranches ont été marquées avec un anticorps contre la tdTomato. Barre d'échelle : 200 µm. **D**, Design du génome du virus (AAV2/9-TetOn-FLEX(mCherry)) utilisé pour exprimer la mCherry dans les cellules ΔNp73 lors de l'administration de doxycycline. **E**, Images représentatives de la projection maximale d'une tranche de cerveau de souris ΔNp73-Cre (P23) ayant subi une injection virale intraventriculaire (AAV2/9-TetOn-FLEX(mCherry)) à E13.5. De la doxycycline (2 mg/ml) a été ajoutée dans l'eau de boisson de P13 à P23. Les tranches ont été marquées avec un anticorps contre la tdTomato. Notez l'absence quasiment totale de neurones positifs pour la mCherry. Barre d'échelle : 200 µm.

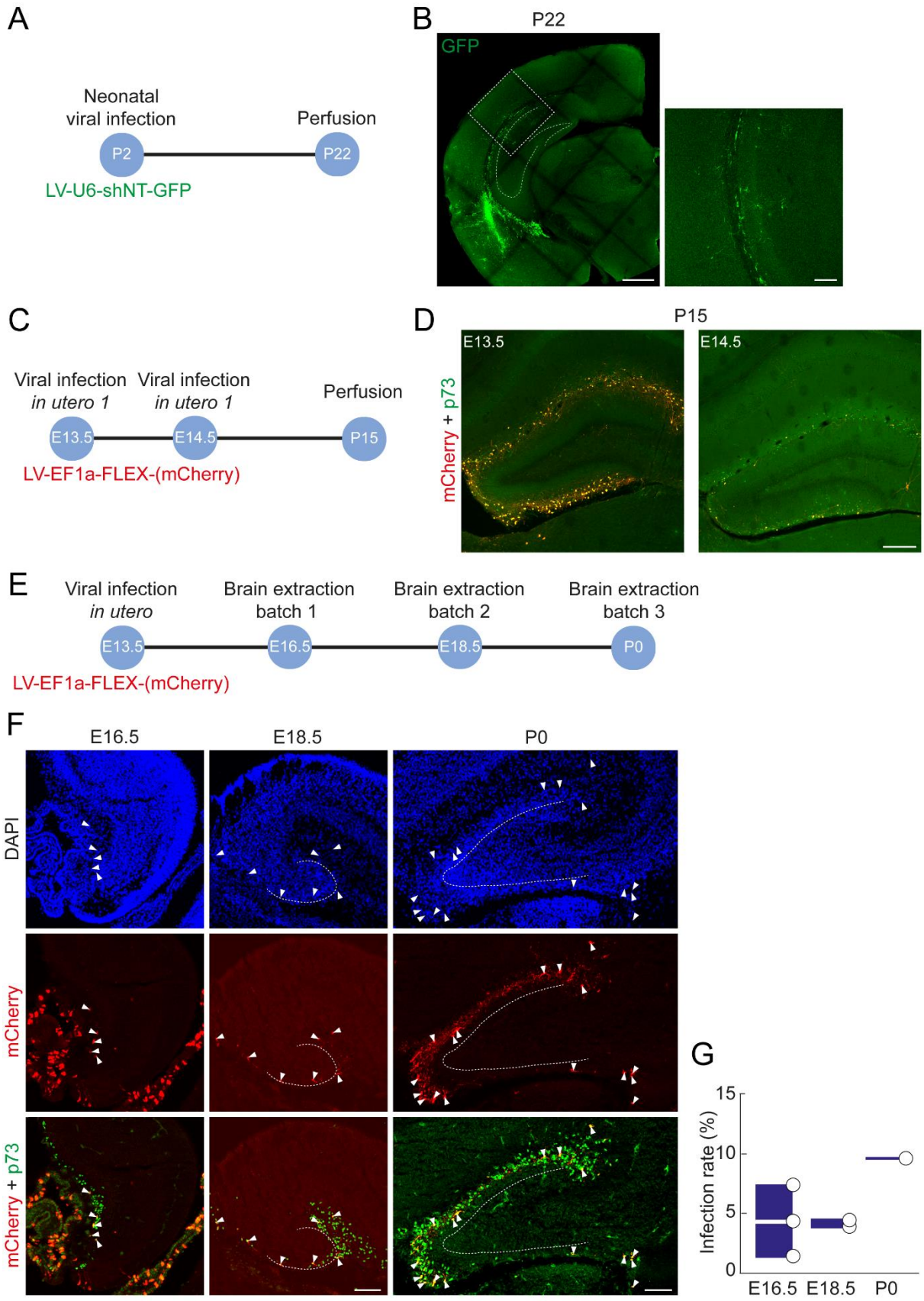


Figure 2. Comparaison de l'injection intraventriculaire de lentivirus *in utero* versus chez le nouveau-né pour infecter les cellules Cajal-Retzius. A, Chronologie des expériences. **B**, Images représentatives de la projection maximale d'une tranche de cerveau de souris ΔNp73-Cre (P22) ayant subi une injection virale intraventriculaire (LV-U6-shNT-GFP) à P2. Les

tranches ont été marquées avec un anticorps contre la GFP, issue du génome viral. Barre d'échelle : 1 mm, Barre d'échelle zoom : 200 µm. **C**, Chronologie des expériences. **D**, Images représentatives de la projection maximale de tranches de cerveau de souris ΔNp73-Cre (P15) ayant subi une injection virale intraventriculaire (LV-EF1a-Flex(mCherry)) à E13.5 ou E14.5. Les tranches ont été marquées avec un anticorps contre la mCherry et contre p73. Barres d'échelle : 200 µm. **E**, Chronologie des expériences. **F**, Images représentatives de la projection maximale de tranches de cerveau de souris ΔNp73-Cre à différents stades de développement (E16.5, E18.5, P0) ayant subi une injection virale intraventriculaire (LV-EF1a-Flex(mCherry)) à E13.5. Les tranches ont été marquées avec un anticorps contre la mCherry et contre p73. Barres d'échelle : 100 µm. **G**, Boxplot illustrant le ratio de la quantité de cellules positives pour mCherry et p73 sur la quantité de cellules positives pour p73 (les cellules des plexus choroïdes sont exclues de cette analyse). n = 2 (E18.5, P0), n = 3 (E16.5) animaux.

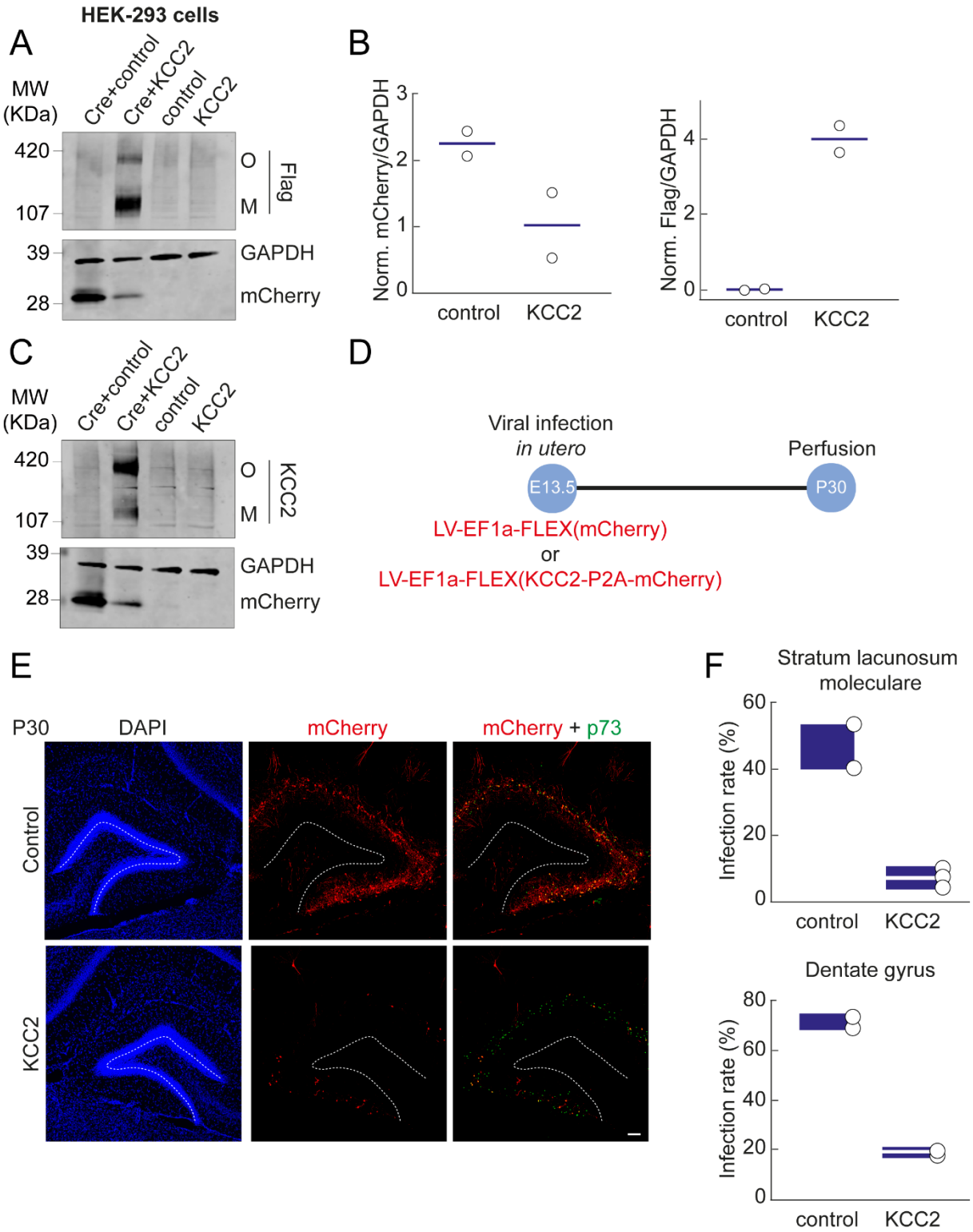


Figure 3. Comparaison de l'efficacité de l'infection virale *in utero* avec deux lentivirus. **A**, Western blot à partir d'extraits protéiques issus de cellules HEK-293 infectées avec l'une de ces combinaisons virales : AAV2/1-CMV-eGFP-Cre + LV-EF1a-Flex(mCherry) (contrôle), AAV2/1-CMV-eGFP-Cre + LV-EF1a-Flex(KCC2Flag-P2A-mCherry) (KCC2), LV-EF1a-Flex(mCherry) seul, LV-EF1a-Flex(KCC2Flag-P2A-mCherry) seul. La membrane est marquée avec des anticorps contre le peptide Flag, la mCherry et la GAPDH. **B**, Boxplots illustrant les ratios entre la fluorescence de la mCherry et de la GAPDH ou du Flag et de la GAPDH. n = 2 cultures indépendantes. **C**, Similaire à (B) mais la membrane est marquée pour KCC2 au lieu

de Flag. **D**, Chronologie des expériences. **E**, Images représentatives de la projection maximale de tranches de cerveau de souris ΔNp73-Cre (P30) ayant subi une injection virale intraventriculaire avec le virus LV-EF1a-Flex(mCherry) (contrôle) ou LV-EF1a-Flex(KCC2Flag-P2A-mCherry) (KCC2) à E13.5. Les tranches ont été marquées avec un anticorps contre la mCherry et contre p73. Barres d'échelle : 200 µm. **F**, Boxplots illustrant le ratio de la quantité de cellules positives pour mCherry et p73 sur la quantité de cellules positives pour p73 (les cellules des plexus choroïdes sont exclus de cette analyse) chez les souris infectées avec le virus contrôle ou KCC2. n = 2 (contrôle), n = 3 (KCC2) animaux.

Discussion

Lors de ma thèse, j'ai étudié l'évolution de la régulation et de la fonction du co-transporteur potassium/chlorure de type 2 (KCC2) au cours du développement dans différents types neuronaux.

D'une part, je me suis intéressée au rôle de l'isoforme minoritaire du transporteur, KCC2a, dans le néocortex et l'hippocampe au cours du développement. En réalisant des expériences de RT-qPCR, j'ai confirmé que l'expression de KCC2a reste relativement stable au cours de la maturation neuronale dans différents modèles d'étude (Markkanen et al., 2017; Uvarov et al., 2007, 2009). J'ai démontré que KCC2a est enrichie, relativement à KCC2b, dans les dendrites secondaires ainsi que dans les agrégats de KCC2, deux structures subcellulaires présentant une forte densité du transporteur (Báldi et al., 2010; Chamma et al., 2013; Markkanen et al., 2017). J'ai ensuite utilisé une combinaison d'ARNs interférents afin de diminuer l'expression de KCC2a dans des neurones matures en culture. La perte d'expression de KCC2a induit une diminution de l'expression protéique et de l'agrégation de KCC2, qu'il soit endogène ou qu'il s'agisse d'une protéine KCC2-3xFlag surexprimée. Cela entraine aussi une perte de l'expression relative de KCC2-Flag à la membrane plasmique ainsi qu'une forte diminution de la capacité des neurones transfectés à exporter le chlorure. KCC2a stabilise donc l'expression protéique et membranaire de KCC2b et assure ainsi le maintien de sa fonction de transporteur. J'ai ensuite étudié le mécanisme selon lequel KCC2a régule l'expression et la fonction de KCC2b dans les neurones matures. J'ai démontré que l'altération de l'expression protéique de KCC2 en réponse à la perte de KCC2a est abolie par l'inhibition de la voie ubiquitine/protéasome. Similairement, l'expression membranaire de KCC2b-Flag, qui est diminuée lors de la perte de KCC2a, est restaurée lors du blocage de l'endocytose. KCC2a protège donc KCC2b de l'endocytose ainsi que de sa dégradation par le protéasome.

Ensuite, j'ai testé l'implication de KCC2a dans la régulation de KCC2b par la voie WNK-SPAK en utilisant une lignée murine spécifiquement délétée pour cette isoforme (Dubois et al., 2018; Markkanen et al., 2014). J'ai observé que la délétion de KCC2a ne semble pas affecter l'expression et la phosphorylation de KCC2 chez les souris adultes. Néanmoins, KCC2a est nécessaire pour la régulation de l'expression membranaire de KCC2b par la voie WNK-SPAK lorsque celle-ci est réactivée dans des neurones matures en culture. La délétion de KCC2a provoque une diminution drastique de la phosphorylation de la thréonine 1007 de KCC2b chez les jeunes souris KCC2a KO. Ces résultats mettent en évidence l'existence d'une fonction spécifique à KCC2a dans les neurones du néocortex et de l'hippocampe. Ils démontrent que

KCC2a régule différentiellement l'expression protéique et membranaire de KCC2b en fonction de la maturation neuronale et de l'activation de la voie WNK-SPAK.

D'autre part, j'ai voulu étudier l'influence de l'absence d'expression de KCC2 sur l'apoptose développementale des cellules Cajal-Retzius. J'ai pour cela développé un ensemble de techniques basées sur de l'infection virale *in utero* afin de surexprimer KCC2 spécifiquement dans ces neurones lors de la période post-natale. À cause d'un ensemble de problèmes techniques relatifs à la lignée murine ainsi qu'aux virus utilisés qui seront évoqués dans cette discussion, je n'ai pas pu déterminer l'implication de l'absence d'expression de KCC2 sur la mort programmée des neurones Cajal-Retzius. Ce projet m'a néanmoins permis de mettre au point diverses techniques d'injection virale afin d'exprimer des transgènes dans une population neuronale spécifique de l'hippocampe.

Enfin, j'ai contribué à un projet lors duquel nous avons caractérisé le mécanisme d'action de deux potentialisateurs de KCC2 (le CLP-257 et la PCPZ) et avons démontré leur efficacité antiépileptique sur plusieurs modèles (Donneger et al., 2026). Nous avons prouvé que ces composés augmentent la fonction de KCC2 en favorisant son agrégation et en diminuant sa diffusion membranaire (Donneger et al., 2026), deux mécanismes précédemment associés à un renforcement de l'extrusion de chlorure (Chamma et al., 2013; Watanabe et al., 2009). Nous avons ensuite établi que l'augmentation de la fonction de KCC2 induite par ces molécules réduit l'occurrence de décharges de type intericales dans du tissu cérébral issu de patients épileptiques et diminue la fréquence des crises dans un modèle de souris avec une épilepsie chronique (Donneger et al., 2026).

L'ensemble de ces projets soulève de nouvelles questions que nous allons aborder lors de cette discussion : i) Quels mécanismes moléculaires sont à l'origine de la régulation de KCC2b par KCC2a ? Comment ces mécanismes évoluent-ils lors du développement ? ii) Quelle est l'implication de KCC2a dans l'épilepsie ? Comment les différentes fonctions de cette isoforme pourraient-elles être exploitées dans le cadre du développement de nouveaux traitements antiépileptiques ? iii) Pourquoi surexprimer KCC2 dans les cellules Cajal-Retzius est un défi et quelles alternatives pourraient être mises en œuvre pour étudier l'influence de l'absence du transporteur dans l'apoptose de ces neurones ?

I. Mécanismes par lesquels KCC2a régule KCC2b

1. Régulation dans les neurones matures

1.1. Mécanisme d'interaction entre les isoformes de KCC2

Au cours de ma thèse, j'ai démontré que KCC2a assure le maintien de l'expression protéique, de la stabilité membranaire et de l'agrégation de KCC2b dans des neurones matures en culture (Article principal). Ces résultats peuvent de prime abord paraître surprenants car j'ai aussi observé, en accord avec plusieurs études précédentes, que KCC2a ne représente que 5% de l'ARNm de KCC2 total (Article principal, Fig. 1; Uvarov et al., 2007, 2009). Afin de mieux comprendre cette apparente contradiction, j'ai analysé la répartition de KCC2a et de KCC2 total au sein des neurones en culture. J'ai observé que l'isoforme minoritaire du transporteur est particulièrement enrichie dans les dendrites, un compartiment caractérisé par une forte expression de KCC2 (Article principal, Fig. 1; Báldi et al., 2010; Markkanen et al., 2014, 2017). Relativement à KCC2 total, une plus grande fraction de KCC2a est aussi présente dans les agrégats de transporteur qui sont caractérisés par une densité élevée de KCC2 (Article principal, Fig. 1). En outre, KCC2a semble complètement absente des épines dendritiques (Article principal, Fig. 1), des structures où KCC2 interagit structurellement avec différentes protéines et joue un rôle non-canonique (Chevy et al., 2015; Gauvain et al., 2011; Llano et al., 2015). KCC2b est donc probablement la seule isoforme du transporteur à présenter des fonctions non-canoniques. Il semblerait ainsi qu'il y ait une optimisation de la localisation de KCC2a au sein des neurones, lui permettant probablement d'interagir avec de nombreuses protéines KCC2b. Néanmoins, les paramètres de ces interactions ne sont pas encore entièrement établis.

Des expériences de co-immunoprécipitation ont permis d'observer que les deux isoformes du transporteur interagissent dans le tronc cérébral de rat à E18.5 et lorsqu'elles sont surexprimées dans un système hétérologue (Uvarov et al., 2009). De plus, des Western blots réalisés avec des protéines non dénaturées ont démontré que KCC2a et KCC2b forment chacune des dimères *in vivo* et constituent ensemble des hétéro-oligomères qui contiennent jusqu'à quatre protéines lorsqu'elles sont surexprimées dans des cellules HEK-293 (Uvarov et al., 2009). Les deux isoformes de KCC2 interagissent donc structurellement entre elles et forment des hétérodimères, voire des hétéro-oligomères. Bien qu'il soit probable que, similairement à ce qui a été observé dans le cas d'homodimères, KCC2a et KCC2b forment des hétérodimères en interagissant par le biais de leurs domaines transmembranaires 11 et 12 et de leur région C-terminale (Xie et al., 2020; S. Zhang et al., 2021; voir Introduction partie I.1.2), cela n'a jamais été démontré.

L'enrichissement de KCC2a dans les agrégats de KCC2 lui permet aussi potentiellement d'interagir avec plusieurs protéines KCC2b à la fois. Les agrégats de transporteurs ont une taille moyenne d'environ 1 μm^2 (Chamma et al., 2013), ils sont donc probablement constitués de nombreux monomères de KCC2 ainsi que de protéines qui les stabilisent telles que 4.1N et les filaments d'actine. Néanmoins, le nombre de protéines KCC2 au sein des agrégats ainsi que la façon dont elles s'y organisent sont encore inconnus. Il a précédemment été mis en évidence que ces derniers sont majoritairement localisés à proximité des synapses excitatrices et inhibitrices (Chamma et al., 2013). Or, j'ai démontré lors de ma thèse que KCC2a n'est pas exprimée au niveau des épines dendritiques (Article principal, Fig. 1). Cela pourrait signifier que cette isoforme est enrichie à proximité des synapses inhibitrices, où la régulation de la fonction de transporteur de KCC2 est essentielle. Cependant KCC2a pourrait aussi être enrichie au niveau des synapses excitatrices établies sur le tronc dendritique.

1.2. Mécanisme de régulation de la stabilité de KCC2b

En réalisant des expériences basées sur divers traitements pharmacologiques, j'ai démontré que KCC2a stabilise KCC2b en inhibant son endocytose ainsi que sa dégradation par la voie ubiquitine/protéasome (Article principal, Fig. 5). Il a récemment été démontré, dans le cadre de l'exposition à des substances anesthésiques, que la phosphorylation de la thréonine 1007 de KCC2 entraine le recrutement de Fbxl4, une protéine qui fait partie d'un complexe d'ubiquitine ligase E3 et qui médie la poly-ubiquitination du transporteur (Hu et al., 2023). La perte d'expression de FAF1 (Fas-associated factor 1), une protéine qui agit en aval de Fbxl4 dans la voie ubiquitine/protéasome, restaure l'expression membranaire de KCC2 induite par divers anesthésiques (P. Chen et al., 2025). Cela indique que Fbxl4 poly-ubiquitine probablement la fraction membranaire de KCC2, ce qui provoque ensuite son endocytose et sa dégradation par le protéasome (P. Chen et al., 2025; Hu et al., 2023).

Similairement, nous pouvons supposer que la régulation de la stabilité membranaire et de l'expression protéique de KCC2b par KCC2a sont liées. KCC2a protègerait alors uniquement KCC2b de la poly-ubiquitination par le complexe d'ubiquitine ligase, ce qui empêcherait l'endocytose et la dégradation subséquente du transporteur par le protéasome. Il serait intéressant de tester cette hypothèse en déterminant si l'inhibition de l'enzyme d'activation de l'ubiquitine E1, par exemple avec le composé PYR-41, permet de restaurer l'expression membranaire de KCC2b-Flag après la perte d'expression de KCC2a. Dans le cas où la régulation trans-isoforme de KCC2 dans les neurones matures dépend effectivement de

l'inhibition de la poly-ubiquitination de KCC2b par KCC2a, il serait aussi utile de déterminer selon quel mécanisme. L'interaction des deux isoformes sous la forme d'hétérodimères pourrait, par exemple, empêcher la fixation du complexe d'ubiquitine ligase E3 à KCC2b ou entraver le transfert des ubiquitines sur le transporteur. Néanmoins, nous ne connaissons actuellement ni le domaine de fixation du complexe E3 SCF à KCC2, ni les lysines du transporteur qui sont poly-ubiquitinées. J'ai aussi démontré lors de ma thèse que KCC2a favorise l'agrégation de KCC2 (Article principal, Fig. 3). Il est donc possible que l'assemblage des protéines KCC2b en agrégats les rende moins accessibles pour la machinerie de poly-ubiquitination et inhibe ainsi leur endocytose.

Lors des expériences pour élucider le mécanisme de régulation de KCC2b par KCC2a (Article principal, Fig. 5), j'ai incubé des neurones en culture avec le composé MG132 à 2.5 µM, une concentration à laquelle il inhibe le protéasome (IC_{50} = 100 nM) mais aussi les calpaïnes (IC_{50} = 1.2 µM). Nous ne pouvons donc pas exclure que la perte d'expression de KCC2a favorise le clivage de KCC2b par ces protéases. Néanmoins, cela parait peu probable pour deux raisons principales. D'une part, chez les neurones exprimant peu KCC2a, l'inhibition des enzymes d'activation de l'ubiquitine E1 avec le composé PYR-41 entraine un effet quasiment similaire au blocage du protéasome avec le MG132 (Article principal, Fig. 5). Or, PYR-41 n'inhibe pas les calpaïnes, et hormis certains cas particuliers (Piatkov et al., 2014), le clivage par les calpaïnes et la poly-ubiquitination sont deux signaux de dégradation des protéines relativement distincts. L'obtention de résultats similaires avec le PYR-41 et le MG132 suggère donc que KCC2a régule l'entrée de KCC2b dans la voie ubiquitine/protéasome. D'autre part, les calpaïnes sont activées par le calcium et leur rôle dans la dégradation de KCC2 n'a été démontré que lors d'une forte activité neuronale (Chamma et al., 2013; Puskarjov et al., 2012; H.-Y. Zhou et al., 2012). Il est donc peu probable qu'elles soient impliquées dans la dégradation du transporteur lorsque les neurones présentent une activité basale. L'hypothèse la plus probable est donc que KCC2a inhibe la dégradation de KCC2b par le protéasome, sans que les calpaïnes ne soient impliquées dans ce processus.

1.3. Discordance entre les résultats *in vitro* et *ex vivo*

Comme nous l'avons discuté précédemment, j'ai démontré au cours de ma thèse que la perte de KCC2a provoque une diminution de l'expression protéique de KCC2b-Flag ainsi que de KCC2 total *in vitro* (Article principal, Fig. 3). Néanmoins, je n'ai pas observé de diminution de l'expression de KCC2 total *ex vivo,* chez les souris KCC2a KO (Article principal, Fig. 6). Cette discordance peut avoir deux causes : i) l'absence de KCC2a induit une diminution de la

quantité de protéines KCC2 total chez les souris KCC2a KO mais mes paramètres expérimentaux n'ont pas permis de la détecter, ii) la perte de KCC2a n'altère pas l'expression de KCC2b *in vivo*. La première hypothèse pourrait être due au fait que j'ai réalisé les Western blots sur des extraits protéiques d'hémisphères cérébraux entiers (sans le tronc cérébral) tandis que lors des expériences *in vitro*, j'ai spécifiquement choisi les neurones pyramidaux analysés. J'ai donc inclus dans mes Western blots de nombreux neurones n'exprimant pas KCC2a (observés en culture, voir Fig. 1), ce qui entraine probablement une forte dilution de l'effet observé sur les cultures de neurones. Un argument en faveur de cette hypothèse est que la délétion du transcrit codant pour KCC2a semble entrainer une diminution de l'expression de KCC2 mais cet effet est accompagné d'une forte variabilité dans l'expression du transporteur chez les souris KCC2a KO adultes (Article principal, Fig. 6). Il est donc possible qu'en utilisant un échantillon légèrement plus grand, nous détections une différence significative entre les conditions. Alternativement, nous pourrions aussi quantifier l'expression de KCC2 spécifiquement dans l'hippocampe de souris KCC2a KO et WT après un immunomarquage.

La seconde hypothèse est aussi probable et pourrait reposer sur l'existence de mécanismes de compensation de la perte de KCC2a dans les neurones. L'effet observé en culture résulte d'une diminution relativement aigüe de l'expression de KCC2a (environ une semaine) tandis que les souris KCC2a KO présentent une ablation totale de l'isoforme dès le début de leur développement. Les neurones de ces souris ont donc possiblement compensé l'absence de KCC2a en stabilisant KCC2b par le biais d'autres mécanismes. L'implication de KCC2a dans la stabilisation de l'expression protéique de KCC2b pourrait être testée *in vivo* chez l'adulte s'il existait une lignée murine permettant la délétion conditionnelle du transcrit codant pour KCC2a (exon 1a floxé). Nous pourrions alors induire la délétion de l'exon 1a de *Slc12a5* spécifiquement chez l'adulte en injectant un virus exprimant la Cre-recombinase dans l'hippocampe/le néocortex de ces animaux ou en les croisant avec une lignée Cre-ERT2 et en leur injectant du tamoxifène.

2. Régulation dans les neurones immatures

Dans les neurones immatures, la fonction de transporteur de KCC2 est fortement réprimée par la phosphorylation de ses thréonines 906 et 1007 par la voie WNK-SPAK/OSR1 (Friedel et al., 2017; voir Introduction partie I.4.4). Les résultats que j'ai obtenus démontrent que l'absence d'expression de KCC2a réduit drastiquement la phosphorylation de la thréonine

1007 chez de jeunes souris (Article principal, Fig. 6). KCC2a semble donc particulièrement importante pour permettre la phosphorylation de KCC2 par SPAK. De façon plus surprenante, les jeunes souris délétées pour le transcrit codant pour KCC2a présentent aussi une forte diminution de la phosphorylation de la serine 383 de SPAK, reconnue par l'anticorps de mouton anti-SPAKpS373 humain (Article principal, Fig. 6; Heubl et al., 2017). La sérine 383 (373 chez l'Homme) et la thréonine 243 (233 chez l'Homme) de SPAK sont toutes les deux phosphorylées par la kinase WNK1 lorsque cette dernière est activée (Vitari et al., 2005; Zagórska et al., 2007). Néanmoins, seule la phosphorylation de la thréonine 243/233 semble à l'origine de l'activation de SPAK et l'effet de la phosphorylation de la sérine 383/373 n'est pas connu (Zagórska et al., 2007). Il serait donc intéressant de mesurer la phosphorylation de la thréonine 243/233 de SPAK dans mes extraits protéiques afin de déterminer si KCC2a facilite effectivement l'activation de cette kinase par WNK.

KCC2a possède un motif consensus de liaison de SPAK (RFTV) dans son domaine N-terminal qui est absent de la séquence de KCC2b (Uvarov et al., 2007). J'ai donc émis l'hypothèse que KCC2a permettrait le recrutement de la kinase SPAK au niveau des hétérodimères KCC2a-KCC2b, permettant la phosphorylation de KCC2b par SPAK. La formation d'un complexe protéique comprenant KCC2a, KCC2b et SPAK pourrait aussi permettre la stabilisation de l'interaction entre WNK1 et SPAK et favoriser la phosphorylation de SPAK. J'ai testé l'hypothèse selon laquelle KCC2a serait nécessaire pour l'interaction structurelle entre SPAK et KCC2b en précipitant SPAK dans des extraits protéiques issus de souris WT et KCC2a KO et en marquant KCC2b à l'aide d'un anticorps spécifique contre cette isoforme à la suite d'un Western blot. Cette expérience ne m'a pas permis de conclure quant à l'interaction entre KCC2a, KCC2b et SPAK pour deux raisons : i) dans mes conditions expérimentales, l'anticorps contre KCC2b était peu spécifique lorsqu'il était utilisé sur des extraits protéiques issus de jeunes souris. ii) Je n'ai obtenu qu'une faible précipitation de SPAK dans les extraits protéiques issus de souris adultes et je n'ai pas observé de co-immunoprécipitation de KCC2a ou de KCC2b avec la kinase. Ce résultat est surprenant car il a déjà été démontré que KCC2a interagit avec SPAK dans des cellules hétérologues (Markkanen et al., 2017; Uvarov et al., 2009). Il est donc probablement le reflet de la difficulté à co-précipiter KCC2 et SPAK dans des extraits protéiques cérébraux plutôt que d'une absence d'interaction entre les isoformes du transporteur et la kinase. En effet, plusieurs études qui ont analysé l'interactome de KCC2 en utilisant de la spectrométrie de masse ne sont pas non plus parvenues à co-précipiter KCC2 et SPAK (Al Awabdh et al., 2022; Mahadevan et al., 2017; mais voir Friedel et al., 2015).

La difficulté pour co-précipiter les deux protéines à partir d'extraits de cerveau vient probablement de l'association d'un ensemble de facteurs : i) les kinases présentent

généralement des interactions transitoires avec leur substrat, qui sont souvent difficiles à détecter (Jorgensen & Linding, 2008). Ce point vient en revanche contredire l'hypothèse selon laquelle KCC2a permettrait la formation d'un complexe avec KCC2b et SPAK. ii) SPAK est faiblement exprimée dans les neurones en comparaison d'autres cellules du cerveau telles que les cellules épithéliales des plexus choroïdes et les oligodendrocytes (The Human Protein Atlas). En précipitant cette protéine, nous avons donc potentiellement récupéré une forte proportion de kinases SPAK non-neuronales qui n'interagissent par conséquent pas avec KCC2. iii) Il existe de très nombreuses protéines présentant un domaine RFxV/I et pouvant, en théorie, interagir avec SPAK (Delpire & Gagnon, 2007). Dans les neurones, KCC2 ne représente probablement qu'une infime partie de ces protéines, ce qui réduit encore la probabilité de détection de l'interaction entre KCC2 et SPAK.

A défaut de parvenir à démontrer que KCC2a est requise pour l'interaction entre KCC2b et SPAK *ex vivo*, nous pourrions le tester dans un système hétérologue. En effet, bien qu'il ait déjà été observé que KCC2a (mais pas KCC2b) interagit structurellement avec la kinase dans des cellules HEK-293 (Markkanen et al., 2017; Uvarov et al., 2009), il n'a pas été démontré que la présence de KCC2a est nécessaire pour permettre l'interaction entre SPAK et KCC2b. Pour cela, nous pourrions surexprimer KCC2b et SPAK ou les deux isoformes de KCC2 et la kinase dans des cellules HEK-293, qui n'expriment pas ou peu KCC2 (voir transport de chlorure quasi nul dans ces cellules dans : Payne, 1997). Si notre hypothèse est vraie, KCC2b ne devrait précipiter avec SPAK que lorsqu'il est coexprimé avec KCC2a. Il est toutefois utile de noter que plusieurs propriétés de KCC2 sont régulées différemment lorsqu'il est exprimé de façon endogène dans les neurones et lorsqu'il est surexprimé dans des cellules hétérologues (Kok et al., 2024).

3. Mécanisme à l'origine du changement de régulation de KCC2b par KCC2a lors de la maturation neuronale

J'ai mis en évidence qu'il existe un changement dans la régulation exercée par KCC2a sur KCC2b au cours de la maturation neuronale (Article principal). Dans les neurones immatures, KCC2a est nécessaire pour la phosphorylation de KCC2b par la voie WNK-SPAK et contribue ainsi probablement à l'inhibition de sa fonction de transporteur. A l'inverse, dans les neurones matures, l'isoforme minoritaire de KCC2 inhibe l'endocytose et la dégradation de KCC2b, ce qui contribue à sa stabilité et à sa fonctionnalité. Nous pouvons néanmoins nous interroger quant au mécanisme moléculaire qui permet ce changement de fonction de KCC2a au cours de la maturation des neurones.

Plusieurs paramètres changent au cours du développement et pourraient expliquer la régulation différentielle de KCC2b par KCC2a dont : l'expression relative des isoformes, la localisation de KCC2a et KCC2b au sein des neurones et l'activation de la voie WNK-SPAK. L'expression relative de KCC2a par rapport à KCC2b diminue drastiquement dans le néocortex et l'hippocampe lors du développement (Article principal, Fig. 1; Uvarov et al., 2007, 2009), ce qui entraine probablement une modification de la stœchiométrie des isoformes au sein des oligomères et des agrégats de KCC2. Par ailleurs, la proportion d'oligomères formés par le transporteur augmente lors de la maturation neuronale (Blaesse et al., 2006; Liabeuf et al., 2026). Nous pourrions donc supposer que l'effet stabilisant de KCC2a ne prédomine que lorsqu'elle s'associe à de nombreuses protéines KCC2b au sein d'oligomères ou d'agrégats. Comme nous l'avons vu précédemment (Introduction partie I.2.5), la localisation subcellulaire de KCC2 dans les neurones évolue aussi lors du développement ce qui pourrait contribuer au changement de la stœchiométrie des isoformes au sein des oligomères/agrégats. Il est néanmoins difficile de discuter ce point car la répartition de KCC2a au sein des neurones immatures n'est pas connue.

Enfin, la voie WNK-SPAK présente transitoirement une forte activité lors de la période néonatale (Friedel et al., 2015; Introduction partie I.4.4). Il est donc possible que l'effet de KCC2a sur la stabilité de KCC2b soit majoritairement déterminé par l'activation de cette voie. Dans ce cas, KCC2a pourrait permettre la phosphorylation de KCC2b par SPAK et inhiberait sa poly-ubiquitination indépendamment du stade de développement. Cette hypothèse est appuyée par l'une de mes expériences qui démontre que KCC2a est nécessaire pour la régulation de l'expression membranaire de KCC2b par WNK1 lorsque cette dernière est constitutivement activée dans les neurones matures (Article principal, Fig. 7). Par ailleurs, il a été démontré que la phosphorylation de la thréonine 1007 de KCC2 recrute Fbxl4 et provoque la poly-ubiquitination de KCC2 (Hu et al., 2023). KCC2a n'inhibe donc probablement pas la poly-ubiquitination de KCC2b lorsque cette dernière est phosphorylée. Nous pouvons donc supposer qu'en absence de phosphorylation de la thréonine 1007 de KCC2b, son interaction avec KCC2a empêche sa poly-ubiquitination ; tandis que la phosphorylation de KCC2b modifie son interaction avec KCC2a (par exemple en changeant la conformation de leur hétérodimère) et permet sa poly-ubiquitination. Cette hypothèse pourrait être testée en comparant l'effet de l'activation de la voie WNK-SPAK (en exprimant WNK1-CA) sur l'expression membranaire de KCC2b-Flag et KCC2b(T1007A)-Flag en présence de KCC2a. Si KCC2a protège KCC2b de la poly-ubiquitination uniquement lorsque ce dernier n'est pas phosphorylé, alors l'activation WNK1 ne devrait pas avoir d'effet sur l'expression membranaire du mutant

déphosphomimétique KCC2b(T1007A), tandis que nous avons déjà démontré qu'elle a un effet sur KCC2b-Flag.

II. Implication de la régulation de KCC2b par KCC2a dans l'épilepsie et dans le développement de composés antiépileptiques

Les patients atteints d'épilepsie du lobe temporal mésial présentent une diminution de l'expression de l'ARNm et des protéines de KCC2 dans certaines régions parahippocampiques telles que le subiculum (Huberfeld et al., 2007; Muñoz et al., 2007; Palma et al., 2006; voir Article 2). Similairement, les modèles murins d'épilepsie chronique ont une diminution de l'expression transcriptionnelle et protéique du transporteur dans diverses régions de l'hippocampe telles que CA1 et le gyrus denté (Donneger et al., 2026; X. Li et al., 2008; mais voir Pathak et al., 2007 qui n'observe plus de différences après l'épiléptogénèse). L'ELTm est donc caractérisée par une diminution chronique de l'expression de KCC2, probablement en partie due à une répression transcriptionnelle de l'expression de *Slc12a5*.

Plusieurs articles ont démontré que l'induction d'une activité pathologique aigüe, de type épileptique, dans le cerveau de rongeurs induit une diminution de l'expression transcriptionnelle et protéique de KCC2 dans les neurones de la corne d'Ammon et du gyrus denté (Pathak et al., 2007; Rivera et al., 2002). L'expression de KCC2 diminue entre 20 minutes et 6 heures après l'induction et commence à réaugmenter entre 6 et 24 heures (Rivera et al., 2002). L'expression du transporteur peut néanmoins être altérée jusqu'à deux semaines après l'induction si cette dernière est à l'origine d'un *status epilepticus* (SE, i.e. chez les rongeurs, une période d'activité épileptique entrainant une crise convulsive de grade 3 ou plus sur l'échelle de Racine pendant plus de trente minutes) (Pathak et al., 2007; Sharma et al., 2018). La diminution de l'expression de KCC2 est associée à une perte de son expression membranaire, à une diminution de la phosphorylation de sa sérine 940 ainsi qu'à une augmentation de la phosphorylation de sa thréonine 1007 dans l'hippocampe (P. Chen et al., 2025; Heubl et al., 2017). L'activité épileptique induit donc une perte d'expression aigüe de KCC2 qui semble résulter d'une modification de sa régulation transcriptionnelle et post-traductionnelle.

Chez la souris, l'injection de pentylènetétrazole (PTZ), un antagoniste des récepteurs GABA-A utilisé comme substance chimio-convulsivante, provoque une augmentation de la phosphorylation de la sérine 382 de WNK1 et de la sérine 383 de SPAK (Heubl et al., 2017).

Par ailleurs, l'inhibition de la voie WNK-SPAK semble diminuer la sévérité du *status epilepticus* induit par l'administration d'acide kaïnique (K. L. Lee et al., 2022). L'activité épileptique aigüe induit donc l'activation de la voie WNK-SPAK, ce qui contribue probablement à l'aggravation du phénotype épileptique en inhibant KCC2 et en altérant l'inhibition synaptique rapide. La dynamique d'activation de cette voie dans le cadre de l'épilepsie chronique n'est en revanche pas connue.
Comme nous l'avons détaillé dans la partie précédente (Discussion partie I.3), l'effet de KCC2a sur la régulation de KCC2b semble dépendre du niveau d'activation de la voie WNK-SPAK. Ainsi, lors d'un *status epilepticus*, pendant lequel la voie WNK-SPAK est fortement activée, KCC2a favorise probablement la phosphorylation de KCC2b par SPAK, contribuant à son inhibition et à l'entretien du SE. Cette hypothèse pourrait être testée en comparant la sévérité du *status epilepticus* lorsque celui-ci est induit chez des souris WT ou KCC2a KO. Si KCC2a favorise effectivement la phosphorylation de KCC2b par SPAK lors du SE, les souris KCC2a KO devraient présenter un SE moins sévère que les souris WT. Dans ce cas, il serait intéressant de développer un composé qui inhibe la liaison de SPAK à KCC2a ou qui promeut transitoirement la dégradation de KCC2a.

Depuis quelques années, de nouveaux composés thérapeutiques basés sur la dégradation ciblée de protéines suscitent un vif intérêt (Lai & Crews, 2017). Parmi ces composés, les chimères ciblant la protéolyse ou PROTACs (Proteolysis-targeting chimaeras) sont des molécules synthétiques composées d'un domaine de liaison (généralement une petite molécule mais il peut aussi s'agir d'un anticorps) à une protéine cible connecté à un ligand permettant le recrutement d'une ubiquitine ligase E3 spécifique (Lai & Crews, 2017; Y. Zhao et al., 2025). Les PROTACs reconnaissent ainsi la protéine cible et recrutent une ubiquitine ligase E3 à proximité de cette dernière, ce qui entraine sa poly-ubiquitination et sa dégradation par le protéasome (Lai & Crews, 2017; Y. Zhao et al., 2025). Certaines PROTACs permettent alternativement la dégradation de protéines membranaires par la voie lysosomale (H. Zhang et al., 2021). Le développement de PROTACs permettant la dégradation de KCC2a pourrait présenter une stratégie particulièrement intéressante dans la prise en charge aigüe du *status epilepticus* pour plusieurs raisons : i) Il a été démontré que KCC2 peut être dégradé par la voie ubiquitine/protéasome ainsi que par les lysosomes, deux voies vers lesquelles les PROTACs peuvent adresser les protéines (Lai & Crews, 2017; H. Zhang et al., 2021). KCC2 étant une protéine membranaire, son adressage vers les lysosomes est probablement plus pertinent mais cela reste à déterminer. ii) Les PROTACs présentent une interaction transitoire avec leur protéine cible et permettent donc la poly-ubiquitination successive de plusieurs protéines (Lai & Crews, 2017). iii) Bien que la cinétique varie en fonction de la protéine cible et de la chimère utilisée, la dégradation de la protéine semble débuter en quelques dizaines de minutes et la

restauration de son expression prend plusieurs heures à plusieurs jours (Riching et al., 2022). Cette cinétique est intéressante dans le cas de KCC2a car elle permettrait d'assurer une faible expression de l'isoforme pendant plusieurs jours après le SE, pendant lesquels la voie WNK-SPAK est potentiellement encore activée.

Néanmoins, plusieurs points nécessitent d'être résolus avant l'utilisation d'une telle stratégie : i) afin d'être efficaces, les PROTACs ciblant KCC2a doivent pouvoir traverser la barrière hémato-encéphalique. Or, hormis certaines exceptions, la majorité d'entre elles n'en sont pas capables du fait de leur poids moléculaire élevé (Thomas et al., 2023). ii) Le seul domaine qui est distinct entre les deux isoformes de KCC2 est leur extrémité N-terminale, qui est intracellulaire (Uvarov et al., 2007). La reconnaissance spécifique de KCC2a par des PROTACs nécessite donc que ces dernières puissent passer au travers de la membrane plasmique, ce qui élimine la possibilité d'utiliser des chimères basées sur des anticorps. Il serait alors intéressant de développer des PROTACs reconnaissant KCC2a par le biais d'un petit domaine (nanobody, peptide) qui serait capable de traverser la membrane plasmique, ce qui semble actuellement être un défi.

La question de l'implication de KCC2a dans l'épilepsie chronique est plus complexe. En effet, la voie WNK-SPAK est potentiellement activée lors de chaque crise et nous ne savons pas si son activité diminue lors des périodes intericales. Il serait particulièrement intéressant d'élucider ce point en mesurant la phosphorylation de WNK, SPAK et KCC2 à divers temps après l'occurrence de crises spontanées dans un modèle murin d'épilepsie chronique. Si WNK1 maintient un niveau de phosphorylation basal élevé lors des périodes intericales, KCC2a contribue probablement à l'inhibition chronique de KCC2b et aggrave le phénotype épileptique. Il serait alors pertinent de tester si l'administration régulière de PROTACs contre KCC2a ou si une thérapie génique basée sur l'injection de vecteurs viraux visant à diminuer l'expression de l'isoforme (par exemple des AAVs dont le génome code pour des microARNs/shmiARN contre KCC2a, Borel et al., 2014) réduit la fréquence et la sévérité des crises chez des souris présentant une épilepsie chronique. Si, à l'inverse, WNK1 n'est activée que lors des crises, il est possible que KCC2a stabilise l'expression protéique et membranaire de KCC2b lors des périodes intericales et inhibe ainsi l'apparition de nouvelles crises. Nous pourrions alors tester si une thérapie génique basée sur la surexpression de KCC2a dans l'hippocampe de souris épileptiques permettrait d'améliorer leur phénotype. La surexpression de l'isoforme minoritaire de KCC2 pourrait néanmoins augmenter la sévérité des crises en favorisant la phosphorylation de KCC2b lors de ces dernières.

Enfin, lors de ma thèse, j'ai contribué à caractériser le mécanisme d'action de potentialisateurs de KCC2 (le CLP-257 et la PCPZ) et à tester leur potentiel antiépileptique (Donneger et al., 2026). Nous avons observé que ces composés augmentent le transport de chlorure par KCC2 en favorisant son agrégation au sein de la membrane plasmique (Donneger et al., 2026). Par ailleurs, le CLP-290 et la PCPZ diminuent la fréquence des crises dans un modèle murin d'ELTm (Donneger et al., 2026). Sachant que KCC2a joue un rôle important dans la stabilité membranaire de KCC2b, notamment en favorisant son agrégation (Article principal, Fig. 3), il serait intéressant de tester si l'effet de ces composés repose sur la régulation de KCC2b par KCC2a. Pour cela, nous pourrions utiliser des cultures primaires de neurones afin de tester l'effet du CLP-257 et de la PCPZ sur l'agrégation de KCC2 selon que les cellules expriment ou non KCC2a. Si l'effet de ces composés repose effectivement sur cette isoforme, ils ne devraient pas modifier l'agrégation du transporteur lorsque les neurones ont une faible expression de KCC2a.

III. Implication de l'absence de KCC2 dans l'apoptose des neurones Cajal-Retzius

1. Surexprimer KCC2 dans les cellules Cajal-Retzius *in vivo* est un défi

Au cours de ma thèse, j'ai souhaité étudier l'implication de l'absence d'expression de KCC2 dans l'apoptose des neurones Cajal-Retzius. Lors de ce projet, j'ai rencontré un ensemble de problèmes techniques et scientifiques que je vais discuter dans cette partie.

1.1. Problèmes liés à la lignée murine ΔNp73-Cre

J'ai initialement choisi d'étudier les déterminants de l'apoptose des CRs hippocampiques en utilisant la lignée murine ΔNp73-Cre car cette dernière exprime la Cre-recombinase dans la majorité des lignages de neurones Cajal-Retzius (i.e. CRs issus de l'hème cortical, du septum et de l'éminence thalamique) (Causeret et al., 2021). Elle permet ainsi de cibler la majorité des CRs qui sont localisés dans l'hippocampe après la naissance (Riva et al., 2023; Tissir et al., 2009). ΔNp73 semblait aussi relativement spécifique aux neurones Cajal-Retzius dans l'hippocampe (Anstötz et al., 2022; Riva et al., 2023). Néanmoins, l'utilisation de cette lignée m'a posé plusieurs problèmes.

D'une part, nous avons découvert ces dernières années que l'expression de ΔNp73 n'est pas restreinte aux neurones Cajal-Retzius dans l'hippocampe post-natal. En effet, il a été mis en

évidence que ΔNp73 est exprimé sporadiquement par les cellules en grain du gyrus denté à partir de la troisième semaine après la naissance chez la souris (van Bruggen et al., 2023). Mes expériences ont confirmé ce résultat et ont additionnellement révélé une expression sporadique de ΔNp73 dans divers types neuronaux de l'ensemble du cerveau, et notamment de l'hippocampe, dès P15 (Résultats additionnels, Fig. 2 et 3). ΔNp73 ayant un rôle anti-apoptotique, il n'est pas surprenant que le promoteur correspondant soit spontanément activé par de nombreux neurones au cours de leur vie. Néanmoins, cette propriété rend la lignée ΔNp73-Cre hautement non-spécifique des neurones Cajal-Retzius. Dans le cadre de mes expériences, cela a entrainé l'expression non contrôlée des transgènes utilisés, dont KCC2-Flag, dans différents neurones de l'hippocampe. Etant donné la faible quantité de neurones hippocampiques concernés, cela n'a *a priori* pas eu d'incidence sur mes expériences mais nous ne pouvons pas entièrement exclure que cela affecte la survie des neurones Cajal-Retzius.

D'autre part, j'ai observé un taux anormalement élevé de souris présentant une hydrocéphalie au sein de la lignée ΔNp73-Cre, à la fois parmi les animaux ayant subi une infection virale *in utero* et parmi les animaux n'ayant pas subi d'injection. Bien que nous ne puissions pas éliminer la possibilité d'un effet des injections intraventriculaires sur ce phénotype, l'existence de souris hydrocéphales non injectées suggère que la délétion de l'une des copies de ΔNp73 est délétère. Il a précédemment été démontré que ΔNp73 est une protéine importante pour la survie des cellules épithéliales des plexus choroïdes (Tissir et al., 2009). De plus, la présence d'une hydrocéphalie sévère a été rapportée chez les souris double mutantes $p73^{-/-}$ (délétion des isoformes TAp73 et ΔNp73) (Cabrera-Socorro et al., 2006). Cela démontre un rôle important des isoformes de p73 dans la survie des cellules épithéliales des plexus choroïdes, ce qui leur confère probablement un rôle dans la régulation de la production du liquide céphalo-rachidien. Néanmoins, aucun phénotype d'hydrocéphalie n'avait été rapporté chez les souris $\Delta Np73^{+/-}$ ou $\Delta Np73^{-/-}$. La présence de nombreux animaux $\Delta Np73^{+/-}$ hydrocéphales au sein de ma colonie pose non seulement un problème éthique de bien-être animal mais a aussi représenté une perte considérable d'animaux qui ont été injectés et qui n'ont pas pu être inclus dans la suite des expériences.

1.2. Problèmes liés aux virus

Lors de ce projet, j'ai aussi rencontré plusieurs difficultés liées aux vecteurs viraux utilisés. Je souhaitais initialement contrôler temporellement l'expression de KCC2 dans les cellules Cajal-Retzius en utilisant un système TetOn dans lequel l'expression du gène d'intérêt est activée

par les antibiotiques de la famille des tétracyclines tels que la doxycycline (T. Das et al., 2016). Nous avons initialement dilué la doxycycline dans l'eau de boisson des mères allaitantes à différentes concentrations, dont 2 mg/ml, la concentration maximale généralement utilisée pour une administration *per os* et rapportée comme efficace (Redelsperger et al., 2016; Rodríguez-Matellán et al., 2020; P. Zhu et al., 2007). Nous n'avons observé que quelques très rares CRs exprimant le transgène chez les petits des mères traitées avec 2 mg/ml de doxycycline (Résultats complémentaires, Fig. 1). Afin de déterminer si la faible expression du transgène était due à la transmission d'une dose suboptimale de l'antibiotique des mères aux petits, nous avons injecté des femelles gestantes avec de la doxycycline pendant plusieurs jours et avons prélevé les embryons avant la naissance. Nous n'avons pas non plus observé d'expression du transgène dans les CRs, ce qui suggère que la prise *per os* et la lactation ne sont pas les seuls facteurs empêchant la transmission de l'antibiotique aux nouveau-nés. Néanmoins, lorsque j'ai incubé des cellules HEK-293, précédemment infectées avec le même virus, en présence de doxycycline pendant plusieurs jours, j'ai observé une expression du transgène.

Les problèmes que nous avons rencontrés lors des expériences *in vivo* proviennent donc probablement de la faible capacité de la doxycycline à traverser la barrière hémato-encéphalique (Andersson & Alestig, 1976; Haddad et al., 2022). Cette propriété, associée à la transmission peu efficace de l'antibiotique par la lactation (Morganti et al., 1968), résulterait en l'obtention d'une dose de doxycycline suboptimale et insuffisante pour activer le système TetOn dans le cerveau des jeunes souris. Une solution serait d'utiliser un vecteur viral exprimant un domaine transactivateur (rtTA) modifié avec une sensibilité accrue aux tétracyclines, tel que le système Tet3G, afin de contrebalancer la faible concentration intracérébrale de l'antibiotique (X. Zhou et al., 2006).

Enfin, j'ai observé, *in vivo* et *in vitro*, une forte différence d'expression de la mCherry entre mon lentivirus contrôle et celui exprimant KCC2 (Résultats complémentaires, Fig. 3). Cela peut provenir : i) d'une moindre expression de la mCherry par les cellules infectées avec le virus exprimant KCC2, ii) d'une infectivité différente entre les deux virus, iii) d'un problème d'intégration dans le génome ou d'expression du transgène du virus exprimant KCC2.

Il a été démontré que les gènes situés en aval des séquences P2A présentent une expression protéique fortement réduite par rapport aux gènes situés en amont du peptide (Z. Liu et al., 2017). Cela va dans le sens de notre première hypothèse et suggère que la mCherry du virus LV-FLEX(KCC2Flag-P2A-mCherry) serait moins exprimée que la protéine KCC2 au sein de la même construction. Le fluorophore du virus exprimant KCC2 serait aussi moins exprimé que

la mCherry du virus contrôle. Néanmoins, il serait surprenant que je n'aie pas détecté les neurones exprimant la protéine fluorescente dans la condition KCC2, même s'ils présentaient de faibles niveaux d'expression, car j'ai systématiquement amplifié la mCherry lors de mes expériences d'immunohistochimie.

L'existence d'une différence d'infectivité entre les deux virus est peu probable mais ne peut pas être écartée. Pour me prémunir de ce problème, j'ai conçu des lentivirus avec une enveloppe identique et j'ai infecté tous les embryons avec une quantité similaire de particules infectieuses. Il est cependant possible que la mesure initiale de leur titre soit imprécise.

L'une des hypothèses les plus probables est celle d'un problème lors de la transcription inversée de l'ARN du virus KCC2 ou lors de la traduction des transcrits formés. En effet, il a été démontré qu'une taille élevée de l'ARN viral diminue fortement sa transcription inversée ainsi que l'intégration de l'ADN correspondant dans le génome de la cellule infectée (Han et al., 2021; Urbinati et al., 2009). Dans l'étude de Han *et al*., un lentivirus avec un génome viral de taille relativement similaire à celle du LV-FLEX(KCC2Flag-P2A-mCherry) transduit une quantité de cellules particulièrement faible en comparaison d'un virus avec un génome restreint, notamment lorsqu'il est utilisé avec un titre élevé (Han et al., 2021). Des défauts lors du saut du ribosome sur la séquence P2A, qui entrainent l'expression d'une protéine de fusion non-fonctionnelle, ont aussi déjà été rapportés mais sont rares (Z. Liu et al., 2017). Par ailleurs, cette hypothèse est écartée par mes données de Western blot (Résultats complémentaires, Fig. 3) qui ne montrent pas de signal mCherry de haut poids moléculaire qui résulterait de la présence d'une protéine de fusion KCC2-mCherry.

2. Méthodes alternatives pour étudier l'implication de l'absence de KCC2 dans l'apoptose des neurones Cajal-Retzius

Comme nous venons de le détailler, surexprimer KCC2 dans les CRs *in vivo* en suivant une temporalité précise est particulièrement complexe. Il pourrait donc être pertinent de caractériser l'effet de la surexpression du transporteur dans ces neurones en utilisant d'autres modèles expérimentaux. Quelques articles ont étudié les propriétés des cellules Cajal-Retzius dans des cultures primaires de neurones néocorticaux ou hippocampiques (Blanquie et al., 2016; Ringstedt et al., 1998; Scotti & Herrmann, 2002). Il s'agit néanmoins d'un modèle relativement peu adapté car, comme cela a été observé à plusieurs reprises, les cultures neuronales ne contiennent que très peu de CRs (Blanquie et al., 2016; Scotti & Herrmann, 2002). La quantité de neurones Cajal-Retzius devient par ailleurs de plus en plus faible au cours de la maturation des cultures, en raison de l'apoptose développementale caractéristique de ces cellules (Blanquie et al., 2016; Scotti & Herrmann, 2002). La faible quantité de CRs au

sein de ce modèle complique les analyses quantitatives. De plus, la majorité des marqueurs de neurones Cajal-Retzius sont peu spécifiques et sont exprimés par d'autres neurones hippocampiques et néocorticaux (Discussion partie III.1.1). Cela complexifie l'identification des CRs dans les cultures, où les cellules sont dissociées et dans lesquelles l'information cruciale de la localisation des neurones est perdue (Scotti & Herrmann, 2002), entrainant l'inclusion potentielle d'autres types neuronaux dans les analyses (Blanquie et al., 2016).

Les cultures organotypiques de tranches d'hippocampe et de néocortex représentent une autre alternative dans le cadre de l'étude des neurones Cajal-Retzius (Blanquie et al., 2016; Del Río et al., 1997; Del Río et al., 1996). Dans les tranches de néocortex, une diminution progressive de la densité de neurones identifiés comme des CRs a été observée au cours du temps (Blanquie et al., 2016). Les tranches d'hippocampe ne présentent en revanche une perte de la quantité de neurones Cajal-Retzius que lorsqu'elles sont co-incubées avec un explant de cortex entorhinal (Del Río et al., 1996). Ainsi, il serait intéressant de tester l'effet de la surexpression de KCC2 sur la survie des CRs hippocampiques au sein de co-cultures d'hippocampe et de cortex entorhinal. Afin de nous affranchir des difficultés liées à l'infection virale, des tranches issues de souris $\Delta Np73^{+/-}$ prélevées à P0-1 pourraient être mises en culture, électroporées avec des plasmides de type FLEX-mCherry et FLEX-KCC2-IRES-mCherry après environ cinq jours *in vitro*, puis replacées en culture pendant plusieurs semaines avant d'être analysées. Si notre hypothèse est correcte, les tranches exprimant KCC2 devraient présenter une plus forte densité de neurones Cajal-Retzius que celles exprimant uniquement la mCherry.

L'analyse de la fonction d'une protéine par le biais de sa surexpression est complexe et nécessite des contrôles adaptés. En effet, une augmentation de la survie des neurones Cajal-Retzius en réponse à l'expression d'une protéine KCC2 exogène ne signifie pas nécessairement que l'absence d'expression du transporteur est responsable de leur apoptose. Il a précédemment été démontré que différentes modifications affectant l'excitabilité des CRs modifient leur survie (Blanquie et al., 2016; Riva et al., 2019). Il est donc probable que ce soit aussi le cas lorsque KCC2 est surexprimé, sans que cela ne prouve son implication directe dans leur apoptose. Si l'expression de KCC2 entraine un effet sur la survie des CRs, plusieurs expériences supplémentaires seront donc nécessaires afin de pouvoir proposer un rôle causal de l'absence de transporteur dans la mort programmée des neurones Cajal-Retzius. D'une part, il serait intéressant de surexprimer une protéine KCC2 déficiente pour le transport de chlorure mais qui ne présente pas d'altération de son expression membranaire, telle que KCC2 (C287L, C302S, C322S, C331L) ou KCC2 L675A dans les CRs (Döding et al., 2012; A.-M. Hartmann et al., 2010). Cela permettrait de déterminer si la survie des neurones Cajal-Retzius

est due à une diminution de leur excitabilité en réponse à l'expression de KCC2 ou si elle repose sur l'interaction structurale du transporteur avec d'autres protéines, comme cela a été démontré pour certains neurones corticaux de projection (Mavrovic et al., 2020). Dans ce cadre, l'utilisation du mutant KCC2 C568A, utilisé dans de nombreuses autres études, n'est pas optimale car il a été démontré que ce dernier présente une interaction altérée avec 4.1N (Horn et al., 2010).
D'autre part, il est important de réaliser des expériences corrélatives entre le niveau d'expression de KCC2 et l'apparition de marqueurs d'apoptose chez les CRs, comme cela a été réalisé dans le cadre d'autres fonctions du transporteur (Bortone & Polleux, 2009; Szrinivasan et al., 2025). Pour cela, des tranches organotypiques d'hippocampe pourraient être fixées à différents temps après leur mise en culture et marquées avec un anticorps contre KCC2. En parallèle, un marquage TUNEL permettant de détecter la fragmentation de l'ADN, caractéristique de l'apoptose, serait réalisé. La preuve d'une plus faible expression de KCC2 parmi les cellules Cajal-Retzius présentant des signes de mort cellulaire serait un argument supplémentaire en faveur de l'implication de l'absence d'expression du transporteur dans l'apoptose de ces neurones.

Ainsi, l'ensemble des problèmes techniques rencontrés au cours de ce projet nous empêchent actuellement de conclure quant au rôle de l'absence d'expression de KCC2 dans l'apoptose des neurones Cajal-Retzius. Néanmoins, j'ai développé plusieurs stratégies qui pourront être exploitées dans le futur afin d'étudier le rôle de KCC2 dans le devenir de ces neurones. De plus, mes résultats préliminaires (Résultats additionnels, Fig. 3) semblent indiquer que la surexpression de KCC2 entraine une augmentation de 25% du nombre de CRs dans le *stratum moleculare* du feuillet infrapyramidal du gyrus denté à P30. Cela est particulièrement intéressant car il a précédemment été démontré que l'apoptose des cellules Cajal-Retzius du gyrus denté est régulée par un mécanisme différent de celui mis en jeu dans l'apoptose des CRs de la fissure hippocampique (Riva et al., 2023). L'absence d'expression du transporteur pourrait donc avoir un effet différentiel sur la mort cellulaire des CRs selon leur localisation dans l'hippocampe. Néanmoins, ces expériences nécessitent d'être répliquées, si possible avec des virus présentant une expression similaire de leur gène rapporteur ou avec l'une des méthodes alternatives évoquées, pour que nous puissions conclure sur le rôle de KCC2 dans le devenir des CRs hippocampiques.
L'étude des déterminants de l'apoptose des cellules Cajal-Retzius est cruciale. En effet, la survie des CRs semble être modifiée chez des patients présentant une épilepsie du lobe temporal mésial (Blümcke et al., 1999; Toth et al., 2010). De plus, l'inhibition de l'apoptose de ces neurones, notamment dans l'hippocampe, augmente la gravité du *status epilepticus* chez la souris (Riva et al., 2023). Le maintien de nombreux CRs dans l'hippocampe adulte pourrait

donc à la fois être une conséquence et un facteur aggravant dans le cadre de l'ELTm. Par conséquent, il est important d'identifier précisément les voies qui régulent l'apoptose des neurones Cajal-Retzius dans un contexte physiologique afin de pouvoir déterminer comment la pathologie les altère.

Conclusion générale

Au cours de ma thèse, j'ai étudié deux exceptions à l'augmentation développementale de l'expression de KCC2 : l'isoforme KCC2a, dont l'expression reste relativement constante dans le cerveau, et les neurones Cajal-Retzius, qui présentent une expression quasiment nulle du transporteur, même chez l'adulte. Mes résultats ont révélé que KCC2a exerce une forte régulation sur la stabilité protéique et membranaire de KCC2b. Cette régulation varie au cours du développement et en fonction du niveau d'activité de la voie WNK-SPAK. Ainsi, en plus de favoriser l'expression membranaire de KCC2b dans les neurones matures et de lui permettre d'exporter efficacement du chlorure, KCC2a participerait à l'inhibition de la fonction canonique du transporteur lors de la période périnatale ou lors de la réactivation de la voie WNK-SPAK. Ces propriétés font de KCC2a une cible de choix pour le développement de traitements ciblant des pathologies associées à une perte d'expression de KCC2. En particulier, mes résultats suggèrent que la suppression de KCC2a ou de son interaction avec SPAK pourrait atténuer la gravité du *status epilepticus*. Par ailleurs, j'ai développé diverses stratégies qui pourront être utilisées dans le futur afin d'étudier le rôle de l'absence d'expression de KCC2 dans la mort cellulaire des cellules Cajal-Retzius. L'apoptose de ces neurones semble altérée chez les patients souffrant d'épilepsie du lobe temporal mésial mais ce phénomène n'a que très peu été étudié. Une meilleure compréhension des déterminants de l'apoptose des CRs dans un cadre physiologique permettra d'étudier l'implication de ces voies dans l'épilepsie.

Bibliographie

Achilles, K., Okabe, A., Ikeda, M., Shimizu-Okabe, C., Yamada, J., Fukuda, A., Luhmann, H. J., & Kilb, W. (2007). Kinetic Properties of Cl^- Uptake Mediated by Na^+ -Dependent K^+ -$2Cl^-$ Cotransport in Immature Rat Neocortical Neurons. *The Journal of Neuroscience*, *27*(32), 8616-8627. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5041-06.2007

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. *Journal of Neuroscience*, *32*(25), 8746-8751. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6089-11.2012

Adragna, N. C., Ravilla, N. B., Lauf, P. K., Begum, G., Khanna, A. R., Sun, D., & Kahle, K. T. (2015). Regulated phosphorylation of the K-Cl cotransporter KCC3 is a molecular switch of intracellular potassium content and cell volume homeostasis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *9*. https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00255

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. *Scientific Reports*, *7*(1), 16452. https://doi.org/10.1038/s41598-017-15739-1

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*(7), 1267-1280. https://doi.org/10.1242/dev.00351

Aickin, C. C., Deisz, R. A., & Lux, H. D. (1984). Mechanisms of chloride transport in crayfish stretch receptor neurones and guinea pig vas deferens : Implications for inhibition mediated by GABA. *Neuroscience Letters*, *47*(3), Article 3. https://doi.org/10.1016/0304-3940(84)90520-2

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. *The Journal of Neuroscience*, *42*(2), Article 2. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2926-20.2021

Allen, J. A., Halverson-Tamboli, R. A., & Rasenick, M. M. (2007). Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nature Reviews Neuroscience*, *8*(2), 128-140. https://doi.org/10.1038/nrn2059

Andersson, H., & Alestig, K. (1976). The penetration of doxycycline into CSF. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases. Supplementum*, (9), 17-19.

Andrew, R. D., Labron, M. W., Boehnke, S. E., Carnduff, L., & Kirov, S. A. (2006). Physiological Evidence That Pyramidal Neurons Lack Functional Water Channels. *Cerebral Cortex*, *17*(4), 787-802. https://doi.org/10.1093/cercor/bhk032

Anstötz, M., Lee, S. K., & Maccaferri, G. (2022). Glutamate released by Cajal-Retzius cells impacts specific hippocampal circuits and behaviors. *Cell Reports*, *39*(7), Article 7. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110822

Araki, T., Kiyama, H., & Tohyama, M. (1992). GABAA Receptor subunit messenger RNAs show differential expression during cortical development in the rat brain. *Neuroscience*, *51*(3), 583-591. https://doi.org/10.1016/0306-4522(92)90298-G

Arosio, D., Ricci, F., Marchetti, L., Gualdani, R., Albertazzi, L., & Beltram, F. (2010). Simultaneous intracellular chloride and pH measurements using a GFP-based sensor. *Nature Methods*, *7*(7), 516-518. https://doi.org/10.1038/nmeth.1471

Arroyo, J. P., Kahle, K. T., & Gamba, G. (2013). The SLC12 family of electroneutral cation-coupled chloride cotransporters. *Molecular Aspects of Medicine*, *34*(2-3), 288-298. https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.05.002

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*(2), 103751. https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.103751

Avila, A., Nguyen, L., & Rigo, J.-M. (2013). Glycine receptors and brain development. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *7*. https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00184

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. *Cerebral Cortex*, *28*(11), Article 11. https://doi.org/10.1093/cercor/bhy198

Báldi, R., Varga, C., & Tamás, G. (2010). Differential distribution of KCC2 along the axo-somato-dendritic axis of hippocampal principal cells. *European Journal of Neuroscience*, *32*(8), 1319-1325. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07361.x

Baltz, T. (2010). Contribution of GABAergic interneurons to the development of spontaneous activity patterns in cultured neocortical networks. *Frontiers in Cellullar Neuroscience*. https://doi.org/10.3389/fncel.2010.00015

Banke, T. G., & Gegelashvili, G. (2008). Tonic activation of group I mGluRs modulates inhibitory synaptic strength by regulating KCC2 activity. *The Journal of Physiology*, *586*(20), 4925-4934. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.157024

Barbin, G., Pollard, H., Gaïarsa, J. L., & Ben-Ari, Y. (1993). Involvement of GABAA receptors in the outgrowth of cultured hippocampal neurons. *Neuroscience Letters*, *152*(1-2), 150-154. https://doi.org/10.1016/0304-3940(93)90505-F

Barthó, P., Payne, J. A., Freund, T. F., & Acsády, L. (2004). Differential distribution of the KCl cotransporter KCC2 in thalamic relay and reticular nuclei. *European Journal of Neuroscience*, *20*(4), 965-975. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03562.x

Baudry, M., Chou, M. M., & Bi, X. (2013). Targeting calpain in synaptic plasticity. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, *17*(5), 579-592. https://doi.org/10.1517/14728222.2013.766169

Beattie, R., & Hippenmeyer, S. (2017). Mechanisms of radial glia progenitor cell lineage progression. *FEBS Letters*, *591*(24), 3993-4008. https://doi.org/10.1002/1873-3468.12906

Behar, T., Li, Y., Tran, H., Ma, W., Dunlap, V., Scott, C., & Barker, J. (1996). GABA stimulates chemotaxis and chemokinesis of embryonic cortical neurons via calcium-dependent mechanisms. *The Journal of Neuroscience*, *16*(5), 1808-1818. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-05-01808.1996

Behar, T. N. (2000). GABA Receptor Antagonists Modulate Postmitotic Cell Migration in Slice Cultures of Embryonic Rat Cortex. *Cerebral Cortex*, *10*(9), 899-909. https://doi.org/10.1093/cercor/10.9.899

Behar, T. N., Schaffner, A. E., Scott, C. A., O'Connell, C., & Barker, J. L. (1998). Differential Response of Cortical Plate and Ventricular Zone Cells to GABA as a Migration Stimulus. *The Journal of Neuroscience*, *18*(16), 6378-6387. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-16-06378.1998

Belenky, M. A., Yarom, Y., & Pickard, G. E. (2008). Heterogeneous expression of γ-aminobutyric acid and γ-aminobutyric acid-associated receptors and transporters in the rat suprachiasmatic nucleus. *Journal of Comparative Neurology*, *506*(4), 708-732. https://doi.org/10.1002/cne.21553

Bellot-Saez, A., Kékesi, O., Morley, J. W., & Buskila, Y. (2017). Astrocytic modulation of neuronal excitability through K + spatial buffering. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *77*, 87-97. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.03.002

Belyi, V. A., Ak, P., Markert, E., Wang, H., Hu, W., Puzio-Kuter, A., & Levine, A. J. (2010). The Origins and Evolution of the p53 Family of Genes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *2*(6), a001198-a001198. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001198

Benardo, L. S. (1994). Separate activation of fast and slow inhibitory postsynaptic potentials in rat neocortex in vitro. *The Journal of Physiology*, *476*(2), 203-215. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1994.sp020124

Ben-Ari, Y. (2002). Excitatory actions of gaba during development : The nature of the nurture. *Nature Reviews Neuroscience*, *3*(9), 728-739. https://doi.org/10.1038/nrn920

Ben-Ari, Y., Cherubini, E., Corradetti, R., & Gaiarsa, J. L. (1989). Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *The Journal of Physiology*, *416*(1), 303-325. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1989.sp017762

Ben-Ari, Y., Gaiarsa, J.-L., Tyzio, R., & Khazipov, R. (2007). GABA : A Pioneer Transmitter That Excites Immature Neurons and Generates Primitive Oscillations. *Physiological Reviews*, *87*(4), 1215-1284. https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2006

Bernhardt, B. C., Hong, S., Bernasconi, A., & Bernasconi, N. (2013). Imaging structural and functional brain networks in temporal lobe epilepsy. *Frontiers in Human Neuroscience*, *7*. https://doi.org/10.3389/fnhum.2013.00624

Berninger, B., Marty, S., Zafra, F., Berzaghi, M. D. P., Thoenen, H., & Lindholm, D. (1995). GABAergic stimulation switches from enhancing to repressing BDNF expression in rat hippocampal neurons during maturation in vitro. *Development*, *121*(8), 2327-2335. https://doi.org/10.1242/dev.121.8.2327

Bernstein, B. W., & Bamburg, J. R. (2010). ADF/Cofilin : A functional node in cell biology. *Trends in Cell Biology*, *20*(4), 187-195. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.01.001

Bhakar, A. L., Howell, J. L., Paul, C. E., Salehi, A. H., Becker, E. B. E., Said, F., Bonni, A., & Barker, P. A. (2003). Apoptosis Induced by p75NTR Overexpression Requires Jun Kinase-Dependent Phosphorylation of Bad. *The Journal of Neuroscience*, *23*(36), Article 36. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-36-11373.2003

Biscoe, T. J., & Duchen, M. R. (1985). AN INTRACELLULAR STUDY OF DENTATE, CA1 AND CA3 NEURONES IN THE MOUSE HIPPOCAMPAL SLICE. *Quarterly Journal of Experimental Physiology*, *70*(2), 189-202. https://doi.org/10.1113/expphysiol.1985.sp002902

Blaesse, P., Airaksinen, M. S., Rivera, C., & Kaila, K. (2009). Cation-Chloride Cotransporters and Neuronal Function. *Neuron*, *61*(6), 820-838. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.03.003

Blaesse, P., Guillemin, I., Schindler, J., Schweizer, M., Delpire, E., Khiroug, L., Friauf, E., & Nothwang, H. G. (2006). Oligomerization of KCC2 Correlates with Development of Inhibitory Neurotransmission. *The Journal of Neuroscience*, *26*(41), 10407-10419. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3257-06.2006

Blanquie, O., Liebmann, L., Hübner, C. A., Luhmann, H. J., & Sinning, A. (2016). NKCC1-Mediated GABAergic Signaling Promotes Postnatal Cell Death in Neocortical Cajal–Retzius Cells. *Cerebral Cortex*, bhw004. https://doi.org/10.1093/cercor/bhw004

Blanquie, O., Yang, J.-W., Kilb, W., Sharopov, S., Sinning, A., & Luhmann, H. J. (2017). Electrical activity controls area-specific expression of neuronal apoptosis in the mouse developing cerebral cortex. *ELife*, *6*, e27696. https://doi.org/10.7554/eLife.27696

Blaschke, A. J., Weiner, J. A., & Chun, J. (1998). Programmed cell death is a universal feature of embryonic and postnatal neuroproliferative regions throughout the central nervous system. *The Journal of Comparative*

Neurology, *396*(1), 39-50. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19980622)396:1<39::AID-CNE4>3.0.CO;2-J

Blümcke, I., Beck, H., Suter, B., Hoffmann, D., Födisch, H. J., Wolf, H. K., Schramm, J., Elger, C. E., & Wiestler, O. D. (1999). An increase of hippocampal calretinin-immunoreactive neurons correlates with early febrile seizures in temporal lobe epilepsy. *Acta Neuropathologica*, *97*(1), 31-39. https://doi.org/10.1007/s004010050952

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., … Avanzini, G. (2017). Histopathological Findings in Brain Tissue Obtained during Epilepsy Surgery. *New England Journal of Medicine*, *377*(17), 1648-1656. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1703784

Boffi, J. C., Knabbe, J., Kaiser, M., & Kuner, T. (2018). KCC2-dependent Steady-state Intracellular Chloride Concentration and pH in Cortical Layer 2/3 Neurons of Anesthetized and Awake Mice. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *12*, 7. https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00007

Bolea, S., Avignone, E., Berretta, N., Sanchez-Andres, J. V., & Cherubini, E. (1999). Glutamate Controls the Induction of GABA-Mediated Giant Depolarizing Potentials Through AMPA Receptors in Neonatal Rat Hippocampal Slices. *Journal of Neurophysiology*, *81*(5), 2095-2102. https://doi.org/10.1152/jn.1999.81.5.2095

Borel, F., Kay, M. A., & Mueller, C. (2014). Recombinant AAV as a platform for translating the therapeutic potential of RNA interference. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, *22*(4), 692-701. https://doi.org/10.1038/mt.2013.285

Bormann, J., Hamill, O. P., & Sakmann, B. (1987). Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and gamma-aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones. *The Journal of Physiology*, *385*(1), 243-286. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1987.sp016493

Borodinsky, L. N., & Fiszman, M. L. (1998). Extracellular potassium concentration regulates proliferation of immature cerebellar granule cells. *Developmental Brain Research*, *107*(1), 43-48. https://doi.org/10.1016/S0165-3806(97)00217-4

Borodinsky, L. N., O'Leary, D., Neale, J. H., Vicini, S., Coso, O. A., & Fiszman, M. L. (2003). GABA-induced neurite outgrowth of cerebellar granule cells is mediated by $GABA_A$ receptor activation, calcium influx and CaMKII and erk1/2 pathways. *Journal of Neurochemistry*, *84*(6), 1411-1420. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01638.x

Bortone, D., & Polleux, F. (2009). KCC2 Expression Promotes the Termination of Cortical Interneuron Migration in a Voltage-Sensitive Calcium-Dependent Manner. *Neuron*, *62*(1), 53-71. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.01.034

Bostanjoglo, M., Reeves, W. B., Reilly, R. F., Velázquez, H., Robertson, N., Litwack, G., Morsing, P., Dørup, J., Bachmann, S., Ellison, D. H., & Bostonjoglo, M. (1998). 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase, mineralocorticoid receptor, and thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter expression by distal tubules. *Journal of the American Society of Nephrology*, *9*(8), 1347-1358. https://doi.org/10.1681/ASN.V981347

Böttner, M., Krieglstein, K., & Unsicker, K. (2000). The Transforming Growth Factor-βs : Structure, Signaling, and Roles in Nervous System Development and Functions. *Journal of Neurochemistry*, *75*(6), 2227-2240. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0752227.x

Brady, M. L., Pilli, J., Lorenz-Guertin, J. M., Das, S., Moon, C. E., Graff, N., & Jacob, T. C. (2018). Depolarizing, inhibitory GABA type A receptor activity regulates GABAergic synapse plasticity via ERK and BDNF signaling. *Neuropharmacology*, *128*, 324-339. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.10.022

Bregestovski, P., & Bernard, C. (2012). Excitatory GABA : How a Correct Observation May Turn Out to be an Experimental Artifact. *Frontiers in Pharmacology*, *3*. https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00065

Brigadski, T., & Leßmann, V. (2020). The physiology of regulated BDNF release. *Cell and Tissue Research*, *382*(1), 15-45. https://doi.org/10.1007/s00441-020-03253-2

Britten, J. S., & Blank, M. (1968). Thallium activation of the (Na+-K+)-activated ATPase of rabbit kidney. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, *159*(1), 160-166. https://doi.org/10.1016/0005-2744(68)90254-4

Brugnara, C. (2001). Therapeutic Strategies for Prevention of Sickle Cell Dehydration. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, *27*(1), 71-80. https://doi.org/10.1006/bcmd.2000.0366

Byvaltcev, E., Behbood, M., Schleimer, J.-H., Gensch, T., Semyanov, A., Schreiber, S., & Strauss, U. (2023). KCC2 reverse mode helps to clear postsynaptically released potassium at glutamatergic synapses. *Cell Reports*, *42*(8), 112934. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112934

Cabrera-Socorro, A., Morlans, M. P., Sola, M. L. S., Delgado, F. J. G., Castañeyra-Perdomo, A., Marin, M. C., & Meyer, G. (2006). Multiple isoforms of the tumor protein p73 are expressed in the adult human telencephalon and choroid plexus and present in the cerebrospinal fluid. *European Journal of Neuroscience*, *23*(8), 2109-2118. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04750.x

Caillard, O., Ben-Ari, Y., & Gaiarsa, J. (1999). Long-term potentiation of GABAergic synaptic transmission in neonatal rat hippocampus. *The Journal of Physiology*, *518*(1), 109-119. https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.0109r.x

Caillard, O., Ben-Ari, Y., & Gaïarsa, J.-L. (1999). Mechanisms of Induction and Expression of Long-Term Depression at GABAergic Synapses in the Neonatal Rat Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, *19*(17), 7568-7577. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-17-07568.1999

Calella, A. M., Nerlov, C., Lopez, R. G., Sciarretta, C., Von Bohlen Und Halbach, O., Bereshchenko, O., & Minichiello, L. (2007). Neurotrophin/Trk receptor signaling mediates C/EBPα, -β and NeuroD recruitment to immediate-early gene promoters in neuronal cells and requires C/EBPs to induce immediate-early gene transcription. *Neural Development*, *2*(1), 4. https://doi.org/10.1186/1749-8104-2-4

Callender, J. A., & Newton, A. C. (2017). Conventional protein kinase C in the brain : 40 years later. *Neuronal Signaling*, *1*(2), NS20160005. https://doi.org/10.1042/NS20160005

Cancedda, L., Fiumelli, H., Chen, K., & Poo, M. (2007). Excitatory GABA Action Is Essential for Morphological Maturation of Cortical Neurons *In Vivo*. *The Journal of Neuroscience*, *27*(19), 5224-5235. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5169-06.2007

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., MacDonald, J. F., & Orser, B. A. (2004). Tonic inhibition in mouse hippocampal CA1 pyramidal neurons is mediated by α5 subunit-containing γ-aminobutyric acid type A receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(10), 3662-3667. https://doi.org/10.1073/pnas.0307231101

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., … 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. *Nature Medicine*, *23*(12), 1394-1396. https://doi.org/10.1038/nm.4442

Carmona, M. A., Pozas, E., Martínez, A., Espinosa-Parrilla, J. F., Soriano, E., & Aguado, F. (2006). Age-dependent Spontaneous Hyperexcitability and Impairment of GABAergic Function in the Hippocampus of Mice Lacking trkB. *Cerebral Cortex*, *16*(1), 47-63. https://doi.org/10.1093/cercor/bhi083

Caron, L., Rousseau, F., Gagnon, É., & Isenring, P. (2000). Cloning and Functional Characterization of a Cation-Cl− Cotransporter-interacting Protein. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(41), 32027-32036. https://doi.org/10.1074/jbc.M000108200

Castrop, H., & Schießl, I. M. (2014). Physiology and pathophysiology of the renal Na-K-2Cl cotransporter (NKCC2). *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, *307*(9), F991-F1002. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00432.2014

Castrop, H., & Schnermann, J. (2008). Isoforms of renal Na-K-2Cl cotransporter NKCC2 : Expression and functional significance. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, *295*(4), F859-F866. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00106.2008

Causeret, F., Moreau, M. X., Pierani, A., & Blanquie, O. (2021). The multiple facets of Cajal-Retzius neurons. *Development*, *148*(11), Article 11. https://doi.org/10.1242/dev.199409

Chai, X., & Frotscher, M. (2016). How does Reelin signaling regulate the neuronal cytoskeleton during migration? *Neurogenesis*, *3*(1), e1242455. https://doi.org/10.1080/23262133.2016.1242455

Chakrabarty, P., Rosario, A., Cruz, P., Siemienski, Z., Ceballos-Diaz, C., Crosby, K., Jansen, K., Borchelt, D. R., Kim, J.-Y., Jankowsky, J. L., Golde, T. E., & Levites, Y. (2013). Capsid Serotype and Timing of Injection Determines AAV Transduction in the Neonatal Mice Brain. *PLoS ONE*, *8*(6), e67680. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067680

Chamma, I., Chevy, Q., Poncer, J. C., & Lévi, S. (2012). Role of the neuronal K-Cl co-transporter KCC2 in inhibitory and excitatory neurotransmission. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *6*. https://doi.org/10.3389/fncel.2012.00005

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. *The Journal of Neuroscience*, *33*(39), Article 39. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5889-12.2013

Chen, H., Kintner, D. B., Jones, M., Matsuda, T., Baba, A., Kiedrowski, L., & Sun, D. (2007). AMPA-mediated excitotoxicity in oligodendrocytes : Role for Na^+ –K^+ –Cl^- co-transport and reversal of Na^+ /Ca^{2+} exchanger. *Journal of Neurochemistry*, *102*(6), 1783-1795. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04638.x

Chen, P., Hu, J.-J., Liu, Y., Cao, B., & Song, X.-J. (2025). VCP controls KCC2 degradation through FAF1 recruitment and accelerates emergence from anesthesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *122*(1), e2414016122. https://doi.org/10.1073/pnas.2414016122

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. *The Journal of Neuroscience*, *35*(48), 15772-15786. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1735-15.2015

Chi, G., Ebenhoch, R., Man, H., Tang, H., Tremblay, L. E., Reggiano, G., Qiu, X., Bohstedt, T., Liko, I., Almeida, F. G., Garneau, A. P., Wang, D., McKinley, G., Moreau, C. P., Bountra, K. D., Abrusci, P., Mukhopadhyay, S. M. M., Fernandez-Cid, A., Slimani, S., … Dürr, K. L. (2021). Phospho-regulation, nucleotide binding and ion access control in potassium-chloride cotransporters. *The EMBO Journal*, *40*(14), EMBJ2020107294. https://doi.org/10.15252/embj.2020107294

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 Research*, *31*(4), 482-484. https://doi.org/10.1038/s41422-020-00437-x

Chipperfield, A. R., & Harper, A. A. (2000). Chloride in smooth muscle. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *74*(3-5), 175-221. https://doi.org/10.1016/S0079-6107(00)00024-9

Cho, I. H., Lee, M. J., Kim, D. H., Kim, B., Bae, J., Choi, K. Y., Kim, S.-M., Huh, Y. H., Lee, K. H., Kim, C.-H., & Song, W. K. (2013). SPIN90 dephosphorylation is required for cofilin-mediated actin depolymerization in NMDA-stimulated hippocampal neurons. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *70*(22), 4369-4383. https://doi.org/10.1007/s00018-013-1391-4

Choii, G., & Ko, J. (2015). Gephyrin : A central GABAergic synapse organizer. *Experimental & Molecular Medicine*, *47*(4), e158-e158. https://doi.org/10.1038/emm.2015.5

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. *The Journal of Neuroscience*, *31*(36), 12916-12926. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2205-11.2011

Christianson, J. C., Jarosch, E., & Sommer, T. (2023). Mechanisms of substrate processing during ER-associated protein degradation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *24*(11), 777-796. https://doi.org/10.1038/s41580-023-00633-8

Chrysafides, S. M., Bordes, S. J., & Sharma, S. (2026). Physiology, Resting Potential. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538338/

Chua, B. T., Volbracht, C., Tan, K. O., Li, R., Yu, V. C., & Li, P. (2003). Mitochondrial translocation of cofilin is an early step in apoptosis induction. *Nature Cell Biology*, *5*(12), 1083-1089. https://doi.org/10.1038/ncb1070

Côme, E., Heubl, M., Schwartz, E. J., Poncer, J. C., & Lévi, S. (2019). Reciprocal Regulation of KCC2 Trafficking and Synaptic Activity. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *13*, 48. https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00048

Constam, D. B., Schmid, P., Aguzzi, A., Schachner, M., & Fontana, A. (1994). Transient Production of TGF-β_2 by Postnatal Cerebellar Neurons and its Effect on Neuroblast Proliferation. *European Journal of Neuroscience*, *6*(5), 766-778. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1994.tb00988.x

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. *Journal of Biological Chemistry*, *293*(44), 16984-16993. https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004349

Croall, D. E., & DeMartino, G. N. (1991). Calcium-activated neutral protease (calpain) system : Structure, function, and regulation. *Physiological Reviews*, *71*(3), 813-847. https://doi.org/10.1152/physrev.1991.71.3.813

Crosby, S. D., Veile, R. A., Donis-Keller, H., Baraban, J. M., Bhat, R. V., Simburger, K. S., & Milbrandt, J. (1992). Neural-specific expression, genomic structure, and chromosomal localization of the gene encoding the zinc-finger transcription factor NGFI-C. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *89*(10), 4739-4743. https://doi.org/10.1073/pnas.89.10.4739

Cserép, C., Szabadits, E., Szőnyi, A., Watanabe, M., Freund, T. F., & Nyiri, G. (2012). NMDA Receptors in GABAergic Synapses during Postnatal Development. *PLoS ONE*, *7*(5), e37753. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037753

Cui, H., & Bulleit, R. F. (1998). Potassium chloride inhibits proliferation of cerebellar granule neuron progenitors. *Developmental Brain Research*, *106*(1-2), 129-135. https://doi.org/10.1016/S0165-3806(97)00204-6

Cuzon, V. C., Yeh, P. W., Cheng, Q., & Yeh, H. H. (2006). Ambient GABA Promotes Cortical Entry of Tangentially Migrating Cells Derived from the Medial Ganglionic Eminence. *Cerebral Cortex*, *16*(10), 1377-1388. https://doi.org/10.1093/cercor/bhj084

Daigle, N. D., Carpentier, G. A., Frenette-Cotton, R., Simard, M. G., Lefoll, M., 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. *Journal of Cellular Physiology*, *220*(3), 680-689. https://doi.org/10.1002/jcp.21814

D'Arcangelo, G. (2005). The Reeler Mouse : Anatomy of a Mutant. In *International Review of Neurobiology* (Vol. 71, p. 383-417). Elsevier. https://doi.org/10.1016/S0074-7742(05)71016-3

D'Arcangelo, G., G. Miao, G., Chen, S.-C., Scares, H. D., Morgan, J. I., & Curran, T. (1995). A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature*, *374*(6524), Article 6524. https://doi.org/10.1038/374719a0

D'Arcangelo, G., Homayouni, R., Keshvara, L., Rice, D. S., Sheldon, M., & Curran, T. (1999). Reelin Is a Ligand for Lipoprotein Receptors. *Neuron*, *24*(2), 471-479. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80860-0

De Los Heros, P. (2018). Role of WNK Kinases in the Modulation of Cell Volume. In *Current Topics in Membranes* (Vol. 81, p. 207-235). Elsevier. https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2018.08.002

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. *Biochemical Journal*, *458*(3), Article 3. https://doi.org/10.1042/BJ20131478

DeFazio, R. A., Keros, S., Quick, M. W., & Hablitz, J. J. (2000). Potassium-Coupled Chloride Cotransport Controls Intracellular Chloride in Rat Neocortical Pyramidal Neurons. *The Journal of Neuroscience*, *20*(21), 8069-8076. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-21-08069.2000

Dehal, P., & Boore, J. L. (2005). Two Rounds of Whole Genome Duplication in the Ancestral Vertebrate. *PLoS Biology*, *3*(10), e314. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030314

Deisz, R. A., & Dose, M. (1983). Comparison of GABA analogues at the crayfish stretch receptor neurone. *Brain Research Bulletin*, *11*(3), 283-288. https://doi.org/10.1016/0361-9230(83)90161-2

Del Río, J. A., Heimrich, B., Borrell, V., Förster, E., Drakew, A., Alcántara, S., Nakajima, K., Miyata, T., Ogawa, M., Mikoshiba, K., Derer, P., Frotscher, M., & Soriano, E. (1997). A role for Cajal–Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connections. *Nature*, *385*(6611), 70-74. https://doi.org/10.1038/385070a0

Del Río, J. A., Martinez, A., Fonseca, M., Auladell, C., & Soriano, E. (1995). Glutamate-like Immunoreactivity and Fate of Cajal-Retzius Cells in the Murine Cortex as Identified with Calretinin Antibody. *Cerebral Cortex*, *5*(1), 13-21. https://doi.org/10.1093/cercor/5.1.13

Del Río, J. A., Heimrich, B., Supèr, H., Borrell, V., Frotscher, M., & Soriano, E. (1996). Differential Survival of Cajal–Retzius Cells in Organotypic Cultures of Hippocampus and Neocortex. *The Journal of Neuroscience*, *16*(21), 6896-6907. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-21-06896.1996

Delorme-Walker, V. D., Peterson, J. R., Chernoff, J., Waterman, C. M., Danuser, G., DerMardirossian, C., & Bokoch, G. M. (2011). Pak1 regulates focal adhesion strength, myosin IIA distribution, and actin dynamics to optimize cell migration. *Journal of Cell Biology*, *193*(7), 1289-1303. https://doi.org/10.1083/jcb.201010059

Delpire, E., & Gagnon, K. B. (2018). Na^+ -K^+ -2Cl^- Cotransporter (NKCC) Physiological Function in Nonpolarized Cells and Transporting Epithelia. In R. Terjung (Éd.), *Comprehensive Physiology* (1re éd., p. 871-901). Wiley. https://doi.org/10.1002/cphy.c170018

Delpire, E., & Gagnon, K. B. E. (2007). Genome-wide analysis of SPAK/OSR1 binding motifs. *Physiological Genomics*, *28*(2), 223-231. https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00173.2006

Demarque, M., Represa, A., Becq, H., Khalilov, I., Ben-Ari, Y., & Aniksztejn, L. (2002). Paracrine Intercellular Communication by a Ca2+- and SNARE-Independent Release of GABA and Glutamate Prior to Synapse Formation. *Neuron*, *36*(6), 1051-1061. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)01053-X

Department of Anesthesiology and Neuroscience Graduate Program, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN, USA, Flores, B., & Delpire, E. (2020). Osmotic Response of Dorsal Root Ganglion Neurons Expressing Wild-Type and Mutant KCC3 Transporters. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *54*(4), 577-590. https://doi.org/10.33594/000000241

Derer, P., & Derer, M. (1990). Cajal-retzius cell ontogenesis and death in mouse brain visualized with horseradish peroxidase and electron microscopy. *Neuroscience*, *36*(3), 839-856. https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90027-2

Ding, J., Ponce-Coria, J., & Delpire, E. (2013). A Trafficking-Deficient Mutant of KCC3 Reveals Dominant-Negative Effects on K–Cl Cotransport Function. *PLoS ONE*, *8*(4), e61112. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061112

Döding, A., Hartmann, A.-M., Beyer, T., & Nothwang, H. G. (2012). KCC2 transport activity requires the highly conserved L675 in the C-terminal β1 strand. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *420*(3), 492-497. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.02.147

Dolphin, A. C., & Lee, A. (2020). Presynaptic calcium channels : Specialized control of synaptic neurotransmitter release. *Nature Reviews Neuroscience*, *21*(4), 213-229. https://doi.org/10.1038/s41583-020-0278-2

Dong, X., Wang, Y., & Qin, Z. (2009). Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*, *30*(4), 379-387. https://doi.org/10.1038/aps.2009.24

Donneger, F., Zanin, A., Besson, J., Roussel, D., Kadiri, Y., Pagan, C., Sinha, M., David, N., Russeau, M., Bielle, F., Devaux, B., Mathon, B., Navarro, V., Chassoux, F., & Poncer, J. C. (2026). Enhancing KCC2 function reduces interictal activity and prevents seizures in temporal lobe epilepsy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *123*(10), e2522722123. https://doi.org/10.1073/pnas.2522722123

Doyon, N., Prescott, S. A., Castonguay, A., Godin, A. G., Kröger, H., & De Koninck, Y. (2011). Efficacy of Synaptic Inhibition Depends on Multiple, Dynamically Interacting Mechanisms Implicated in Chloride Homeostasis. *PLoS Computational Biology*, *7*(9), e1002149. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002149

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*(5), Article 5. https://doi.org/10.1523/ENEURO.0264-18.2018

Durand, G. M., Kovalchuk, Y., & Konnerth, A. (1996). Long-term potentiation and functional synapse induction in developing hippocampus. *Nature*, *381*(6577), 71-75. https://doi.org/10.1038/381071a0

Eboli, M. L., Mercanti, D., Ciotti, M. T., Aquino, A., & Castellani, L. (1994). Glutamate-induced protein phosphorylation in cerebellar granule cells : Role of protein kinase C. *Neurochemical Research*, *19*(10), 1257-1264. https://doi.org/10.1007/BF01006815

Edwards, D. C., Sanders, L. C., Bokoch, G. M., & Gill, G. N. (1999). Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nature Cell Biology*, *1*(5), 253-259. https://doi.org/10.1038/12963

Enyedi, P., & Czirják, G. (2010). Molecular Background of Leak K^+ Currents : Two-Pore Domain Potassium Channels. *Physiological Reviews*, *90*(2), 559-605. https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2009

Essrich, C., Lorez, M., Benson, J. A., Fritschy, J.-M., & Lüscher, B. (1998). Postsynaptic clustering of major GABAA receptor subtypes requires the γ2 subunit and gephyrin. *Nature Neuroscience*, *1*(7), 563-571. https://doi.org/10.1038/2798

Ewald, R. C., & Cline, H. T. (2009). NMDA Receptors and Brain Development. In A. M. Van Dongen (Éd.), *Biology of the NMDA Receptor*. CRC Press/Taylor & Francis. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5287/

Fan, M., Zhang, J., Lee, C.-L., Zhang, J., & Feng, L. (2023). Structure and thiazide inhibition mechanism of the human Na–Cl cotransporter. *Nature*, *614*(7949), 788-793. https://doi.org/10.1038/s41586-023-05718-0

Farrant, M., & Kaila, K. (2007). The cellular, molecular and ionic basis of GABAA receptor signalling. In *Progress in Brain Research* (Vol. 160, p. 59-87). Elsevier. https://doi.org/10.1016/S0079-6123(06)60005-8

Farrant, M., & Nusser, Z. (2005). Variations on an inhibitory theme : Phasic and tonic activation of GABAA receptors. *Nature Reviews Neuroscience*, *6*(3), 215-229. https://doi.org/10.1038/nrn1625

Filippi, B. M., De Los Heros, P., Mehellou, Y., Navratilova, I., Gourlay, R., Deak, M., Plater, L., Toth, R., Zeqiraj, E., & Alessi, D. R. (2011). MO25 is a master regulator of SPAK/OSR1 and MST3/MST4/YSK1 protein kinases : MO25 is a master regulator of many STE20 kinases. *The EMBO Journal*, *30*(9), 1730-1741. https://doi.org/10.1038/emboj.2011.78

Fischer, M., Kaech, S., Knutti, D., & Matus, A. (1998). Rapid Actin-Based Plasticity in Dendritic Spines. *Neuron*, *20*(5), 847-854. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80467-5

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*(4), 475-482. https://doi.org/10.1111/epi.12550

Fiszman, M. L., Borodinsky, L. N., & Neale, J. H. (1999). GABA induces proliferation of immature cerebellar granule cells grown in vitro. *Developmental Brain Research*, *115*(1), 1-8. https://doi.org/10.1016/S0165-3806(99)00035-8

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. *Cerebral Cortex*, *23*(2), 378-388. https://doi.org/10.1093/cercor/bhs027

Fiumelli, H., Cancedda, L., & Poo, M. (2005). Modulation of GABAergic Transmission by Activity via Postsynaptic Ca2+-Dependent Regulation of KCC2 Function. *Neuron*, *48*(5), 773-786. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.10.025

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. (2015). WNK1-regulated inhibitory phosphorylation of the KCC2 cotransporter maintains the depolarizing action of GABA in immature neurons. *Science Signaling*, *8*(383), Article 383. https://doi.org/10.1126/scisignal.aaa0354

Friedel, P., Ludwig, A., Pellegrino, C., Agez, M., Jawhari, A., Rivera, C., & Medina, I. (2017). A Novel View on the Role of Intracellular Tails in Surface Delivery of the Potassium-Chloride Cotransporter KCC2. *Eneuro*, *4*(4), Article 4. https://doi.org/10.1523/ENEURO.0055-17.2017

Frostholm, A., & Rotter, A. (1985). Glycine receptor distribution in mouse CNS : Autoradiographic localization of [3H]strychnine binding sites. *Brain Research Bulletin*, *15*(5), 473-486. https://doi.org/10.1016/0361-9230(85)90038-3

Fulda, S., & Debatin, K.-M. (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, *25*(34), 4798-4811. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209608

Gada, K. D., & Logothetis, D. E. (2022). PKC regulation of ion channels : The involvement of PIP2. *Journal of Biological Chemistry*, *298*(6), 102035. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102035

Gagnon, K. B. E., England, R., & Delpire, E. (2007). A Single Binding Motif is Required for SPAK Activation of the Na-K-2Cl Cotransporter. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *20*(1-4), 131-142. https://doi.org/10.1159/000104161

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. *Nature Medicine*, *19*(11), 1524-1528. https://doi.org/10.1038/nm.3356

Gamba, G. (2005). Molecular Physiology and Pathophysiology of Electroneutral Cation-Chloride Cotransporters. *Physiological Reviews*, *85*(2), 423-493. https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2004

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. *The Journal of Biological Chemistry*, *269*(26), 17713-17722.

Ganguly, K., Schinder, A. F., Wong, S. T., & Poo, M. (2001). GABA Itself Promotes the Developmental Switch of Neuronal GABAergic Responses from Excitation to Inhibition. *Cell*, *105*(4), 521-532. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00341-5

Gao, X.-B., & Van Den Pol, A. N. (2001). GABA, Not Glutamate, a Primary Transmitter Driving Action Potentials in Developing Hypothalamic Neurons. *Journal of Neurophysiology*, *85*(1), 425-434. https://doi.org/10.1152/jn.2001.85.1.425

Garneau, A. P., Slimani, S., Tremblay, L. E., Fiola, M. J., Marcoux, A. A., & Isenring, P. (2019). K+-Cl− cotransporter 1 (KCC1) : A housekeeping membrane protein that plays key supplemental roles in hematopoietic and cancer cells. *Journal of Hematology & Oncology*, *12*(1), 74. https://doi.org/10.1186/s13045-019-0766-x

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(37), Article 37. https://doi.org/10.1073/pnas.1107893108

Gavrikov, K. E., Nilson, J. E., Dmitriev, A. V., Zucker, C. L., & Mangel, S. C. (2006). Dendritic compartmentalization of chloride cotransporters underlies directional responses of starburst amacrine cells in retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(49), 18793-18798. https://doi.org/10.1073/pnas.0604551103

Ghit, A., Assal, D., Al-Shami, A. S., & Hussein, D. E. E. (2021). GABAA receptors : Structure, function, pharmacology, and related disorders. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *19*(1), 123. https://doi.org/10.1186/s43141-021-00224-0

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. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(27), 16237-16244. https://doi.org/10.1074/jbc.271.27.16237

Glantz, S. B., Cianci, C. D., Iyer, R., Pradhan, D., Wang, K. K. W., & Morrow, J. S. (2007). Sequential Degradation of αII and βII Spectrin by Calpain in Glutamate or Maitotoxin-Stimulated Cells. *Biochemistry*, *46*(2), 502-513. https://doi.org/10.1021/bi061504y

Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W., & Cong, J. (2003). The Calpain System. *Physiological Reviews*, *83*(3), 731-801. https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2002

Gonzalez-Islas, C., Chub, N., & Wenner, P. (2009). NKCC1 and AE3 Appear to Accumulate Chloride in Embryonic Motoneurons. *Journal of Neurophysiology*, *101*(2), 507-518. https://doi.org/10.1152/jn.90986.2008

Gonzalez-Vicente, A., Saez, F., Monzon, C. M., Asirwatham, J., & Garvin, J. L. (2019). Thick Ascending Limb Sodium Transport in the Pathogenesis of Hypertension. *Physiological Reviews*, *99*(1), 235-309. https://doi.org/10.1152/physrev.00055.2017

Götz, M., & Huttner, W. B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *6*(10), 777-788. https://doi.org/10.1038/nrm1739

Goutierre, M., Al Awabdh, S., Donneger, F., François, E., Gomez-Dominguez, D., Irinopoulou, T., Menendez de la Prida, L., & Poncer, J. C. (2019). KCC2 Regulates Neuronal Excitability and Hippocampal Activity via Interaction with Task-3 Channels. *Cell Reports*, *28*(1), Article 1. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.06.001

Griguoli, M., & Cherubini, E. (2017). Early Correlated Network Activity in the Hippocampus : Its Putative Role in Shaping Neuronal Circuits. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *11*, 255. https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00255

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. *Nature Metabolism*, *1*(1), 47-57. https://doi.org/10.1038/s42255-018-0009-4

Gu, J., Lee, C. W., Fan, Y., Komlos, D., Tang, X., Sun, C., Yu, K., Hartzell, H. C., Chen, G., Bamburg, J. R., & Zheng, J. Q. (2010). ADF/cofilin-mediated actin dynamics regulate AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Nature Neuroscience*, *13*(10), 1208-1215. https://doi.org/10.1038/nn.2634

Gu, X., Liu, B., Wu, X., Yan, Y., Zhang, Y., Wei, Y., Pleasure, S. J., & Zhao, C. (2011). Inducible Genetic Lineage Tracing of Cortical Hem Derived Cajal-Retzius Cells Reveals Novel Properties. *PLoS ONE*, *6*(12), Article 12. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028653

Guay, K. P., Chou, W.-C., Canniff, N. P., Paul, K. B., & Hebert, D. N. (2025). N-glycan-dependent protein maturation and quality control in the ER. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *26*(12), 926-939. https://doi.org/10.1038/s41580-025-00855-y

Gubellini, P., Ben-Ari, Y., & Gaïarsa, J. (2001). Activity- and age-dependent GABAergic synaptic plasticity in the developing rat hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, *14*(12), 1937-1946. https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01823.x

Gulácsi, A., Lee, C. R., Sík, A., Viitanen, T., Kaila, K., Tepper, J. M., & Freund, T. F. (2003). Cell Type-Specific Differences in Chloride-Regulatory Mechanisms and $GABA_A$ Receptor-Mediated Inhibition in Rat Substantia Nigra. *The Journal of Neuroscience*, *23*(23), 8237-8246. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-23-08237.2003

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. *European Journal of Neuroscience*, *13*(12), 2205-2217. https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01600.x

Guo, D., Arnspiger, S., Rensing, N. R., & Wong, M. (2012). Brief seizures cause dendritic injury. *Neurobiology of Disease*, *45*(1), 348-355. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.08.020

Haddad, N., Carr, M., Balian, S., Lannin, J., Kim, Y., Toth, C., & Jarvis, J. (2022). The Blood–Brain Barrier and Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Optimization of Antibiotics for the Treatment of Central Nervous System Infections in Adults. *Antibiotics*, *11*(12), 1843. https://doi.org/10.3390/antibiotics11121843

Hamann, S., Herrera-Perez, J. J., Bundgaard, M., Alvarez-Leefmans, F. J., & Zeuthen, T. (2005). Water permeability of Na^+ –K^+ –2Cl^- cotransporters in mammalian epithelial cells. *The Journal of Physiology*, *568*(1), 123-135. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.093526

Hamze, M., Brier, C., Buhler, E., Zhang, J., Medina, I., & Porcher, C. (2024). Regulation of Neuronal Chloride Homeostasis by Pro- and Mature Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) via KCC2 Cation–Chloride Cotransporters in Rat Cortical Neurons. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(11), 6253. https://doi.org/10.3390/ijms25116253

Han, J., Pluhackova, K., & Böckmann, R. A. (2017). The Multifaceted Role of SNARE Proteins in Membrane Fusion. *Frontiers in Physiology*, *8*. https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00005

Han, J., Tam, K., Ma, F., Tam, C., Aleshe, B., Wang, X., Quintos, J. P., Morselli, M., Pellegrini, M., Hollis, R. P., & Kohn, D. B. (2021). β-Globin Lentiviral Vectors Have Reduced Titers due to Incomplete Vector RNA Genomes and Lowered Virion Production. *Stem Cell Reports*, *16*(1), 198-211. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.10.007

Hannemann, A., & Flatman, P. W. (2011). Phosphorylation and Transport in the Na-K-2Cl Cotransporters, NKCC1 and NKCC2A, Compared in HEK-293 Cells. *PLoS ONE*, *6*(3), e17992. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017992

Hartmann, A., 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. *Journal of Neurochemistry*, *111*(2), 321-331. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06343.x

Hartmann, A.-M., & Nothwang, H. G. (2015). Molecular and evolutionary insights into the structural organization of cation chloride cotransporters. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*. https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00470

Hartmann, A.-M., & Nothwang, H. G. (2022). NKCC1 and KCC2 : Structural insights into phospho-regulation. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *15*, 964488. https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.964488

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. *Molecular Biology and Evolution*, *31*(2), 434-447. https://doi.org/10.1093/molbev/mst225

Hartmann, A.-M., Wenz, M., Mercado, A., Störger, C., Mount, D. B., Friauf, E., & Nothwang, H. G. (2010). Differences in the Large Extracellular Loop between the K+-Cl− Cotransporters KCC2 and KCC4. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(31), 23994-24002. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.144063

Hatanaka, Y., Zhu, Y., Torigoe, M., Kita, Y., & Murakami, F. (2016). From migration to settlement : The pathways, migration modes and dynamics of neurons in the developing brain. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, *92*(1), 1-19. https://doi.org/10.2183/pjab.92.1

Haydar, T. F., Wang, F., Schwartz, M. L., & Rakic, P. (2000). Differential Modulation of Proliferation in the Neocortical Ventricular and Subventricular Zones. *The Journal of Neuroscience*, *20*(15), 5764-5774. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-15-05764.2000

He, X., Urip, B. A., Zhang, Z., Ngan, C. C., & Feng, B. (2021). Evolving AAV-delivered therapeutics towards ultimate cures. *Journal of Molecular Medicine*, *99*(5), 593-617. https://doi.org/10.1007/s00109-020-02034-2

Heck, N., Kilb, W., Reiprich, P., Kubota, H., Furukawa, T., Fukuda, A., & Luhmann, H. J. (2006). GABA-A Receptors Regulate Neocortical Neuronal Migration In Vitro and In Vivo. *Cerebral Cortex*, *17*(1), 138-148. https://doi.org/10.1093/cercor/bhj135

Hennou, S., Khalilov, I., Diabira, D., Ben-Ari, Y., & Gozlan, H. (2002). Early sequential formation of functional $GABA_A$ and glutamatergic synapses on CA1 interneurons of the rat foetal hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, *16*(2), 197-208. https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02073.x

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. *Nature Communications*, *8*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/s41467-017-01749-0

Hevner, R. F., Neogi, T., Englund, C., Daza, R. A. M., & Fink, A. (2003). Cajal–Retzius cells in the mouse : Transcription factors, neurotransmitters, and birthdays suggest a pallial origin. *Developmental Brain Research*, *141*(1-2), 39-53. https://doi.org/10.1016/S0165-3806(02)00641-7

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. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(15), 10661-10667. https://doi.org/10.1074/jbc.274.15.10661

Hinz, L., Torrella Barrufet, J., & Heine, V. M. (2019). KCC2 expression levels are reduced in post mortem brain tissue of Rett syndrome patients. *Acta Neuropathologica Communications*, *7*(1), Article 1. https://doi.org/10.1186/s40478-019-0852-x

Hirota, Y., Kubo, K., Katayama, K., Honda, T., Fujino, T., Yamamoto, T. T., & Nakajima, K. (2015). Reelin receptors ApoER2 and VLDLR are expressed in distinct spatiotemporal patterns in developing mouse cerebral cortex. *Journal of Comparative Neurology*, *523*(3), 463-478. https://doi.org/10.1002/cne.23691

Hoffmann, E. K., Lambert, I. H., & Pedersen, S. F. (2009). Physiology of Cell Volume Regulation in Vertebrates. *Physiological Reviews*, *89*(1), 193-277. https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2007

Honegger, P., Pardo, B., & Monnet-Tschudi, F. (1998). Muscimol-induced death of GABAergic neurons in rat brain aggregating cell cultures. *Developmental Brain Research*, *105*(2), 219-225. https://doi.org/10.1016/S0165-3806(97)00194-6

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. *European Journal of Neuroscience*, *31*(12), 2142-2155. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07258.x

Hotulainen, P., & Hoogenraad, C. C. (2010). Actin in dendritic spines : Connecting dynamics to function. *Journal of Cell Biology*, *189*(4), 619-629. https://doi.org/10.1083/jcb.201003008

Hu, J.-J., Liu, Y., Yao, H., Cao, B., Liao, H., Yang, R., Chen, P., & Song, X.-J. (2023). Emergence of consciousness from anesthesia through ubiquitin degradation of KCC2 in the ventral posteromedial nucleus of the thalamus. *Nature Neuroscience*, *26*(5), Article 5. https://doi.org/10.1038/s41593-023-01290-y

Huang, E. J., & Reichardt, L. F. (2003). Trk Receptors : Roles in Neuronal Signal Transduction. *Annual Review of Biochemistry*, *72*(1), 609-642. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161629

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. *The Journal of Neuroscience*, *27*(37), Article 37. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2761-07.2007

Hübner, C. A., Lorke, D. E., & Hermans-Borgmeyer, I. (2001). Expression of the Na-K-2Cl-cotransporter NKCC1 during mouse development. *Mechanisms of Development*, *102*(1-2), 267-269. https://doi.org/10.1016/S0925-4773(01)00309-4

Hübner, C. A., Schroeder, B. C., & Ehmke, H. (2015). Regulation of vascular tone and arterial blood pressure : Role of chloride transport in vascular smooth muscle. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, *467*(3), 605-614. https://doi.org/10.1007/s00424-014-1684-y

Hübner, C. A., Stein, V., Hermans-Borgmeyer, I., Meyer, T., Ballanyi, K., & Jentsch, T. J. (2001). Disruption of KCC2 Reveals an Essential Role of K-Cl Cotransport Already in Early Synaptic Inhibition. *Neuron*, *30*(2), 515-524. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00297-5

Ibáñez, C. F., & Simi, A. (2012). p75 neurotrophin receptor signaling in nervous system injury and degeneration : Paradox and opportunity. *Trends in Neurosciences*, *35*(7), 431-440. https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.03.007

Inoue, K., Furukawa, T., Kumada, T., Yamada, J., Wang, T., Inoue, R., & Fukuda, A. (2012). Taurine Inhibits K+-Cl− Cotransporter KCC2 to Regulate Embryonic Cl− Homeostasis via With-no-lysine (WNK) Protein Kinase Signaling Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(25), Article 25. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.319418

Isaac, J. T. R., Nicoll, R. A., & Malenka, R. C. (1995). Evidence for silent synapses : Implications for the expression of LTP. *Neuron*, *15*(2), 427-434. https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90046-2

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(9), 3561-3566. https://doi.org/10.1073/pnas.1212907110

Jarolimek, W., Lewen, A., & Misgeld, U. (1999). A Furosemide-Sensitive K^+ –Cl^- Cotransporter Counteracts Intracellular Cl^- Accumulation and Depletion in Cultured Rat Midbrain Neurons. *The Journal of Neuroscience*, *19*(12), 4695-4704. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-12-04695.1999

Jaskolski, F., & Henley, J. M. (2009). Synaptic receptor trafficking : The lateral point of view. *Neuroscience*, *158*(1), 19-24. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.01.075

Jayaraman, S., & Verkman, A. S. (2000). Quenching mechanism of quinolinium-type chloride-sensitive fluorescent indicators. *Biophysical Chemistry*, *85*(1), 49-57. https://doi.org/10.1016/S0301-4622(00)00146-0

Ji, J., Choi, C., Bope, C. E., Dengler, J. S., Moss, S. J., & Smalley, J. L. (2025). KCC2 inhibition and neuronal hyperexcitability promote extrinsic apoptosis dependent upon C1q. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *18*, 1645428. https://doi.org/10.3389/fnmol.2025.1645428

Jiang, G., Akar, F., Cobbs, S. L., Lomashvilli, K., Lakkis, R., Gordon, F. J., Sutliff, R. L., & O'Neill, W. C. (2004). Blood pressure regulates the activity and function of the Na-K-2Cl cotransporter in vascular smooth muscle. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *286*(4), H1552-H1557. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00695.2003

Johansson, S., Friedman, W., & Arhem, P. (1992). Impulses and resting membrane properties of small cultured rat hippocampal neurons. *The Journal of Physiology*, *445*(1), 129-140. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1992.sp018915

Jorgensen, C., & Linding, R. (2008). Directional and quantitative phosphorylation networks. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, *7*(1), 17-26. https://doi.org/10.1093/bfgp/eln001

Jourdain, P., Pavillon, N., Moratal, C., Boss, D., Rappaz, B., Depeursinge, C., Marquet, P., & Magistretti, P. J. (2011). Determination of Transmembrane Water Fluxes in Neurons Elicited by Glutamate Ionotropic Receptors and by the Cotransporters KCC2 and NKCC1 : A Digital Holographic Microscopy Study. *The Journal of Neuroscience*, *31*(33), 11846-11854. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0286-11.2011

Juzekaeva, E., Nasretdinov, A., Mukhtarov, M., Shipkov, D., Valeeva, G., & Khazipov, R. (2024). Comparison of extracellular Giant depolarizing potentials in vitro and early sharp waves in vivo in the CA1 hippocampus of neonatal rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *735*, 150823. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2024.150823

Kahle, K. T., & Delpire, E. (2016). Kinase-KCC2 coupling : Cl^- rheostasis, disease susceptibility, therapeutic target. *Journal of Neurophysiology*, *115*(1), 8-18. https://doi.org/10.1152/jn.00865.2015

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 in Molecular Medicine*, *21*(8), 513-523. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2015.05.008

Kahle, K. T., Rinehart, J., de Los Heros, P., Louvi, A., Meade, P., Vazquez, N., Hebert, S. C., Gamba, G., Gimenez, I., & Lifton, R. P. (2005). WNK3 modulates transport of Cl- in and out of cells : Implications for control of cell volume and neuronal excitability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(46), 16783-16788. https://doi.org/10.1073/pnas.0508307102

Kaila, K., Voipio, J., Paalasmaa, P., Pasternack, M., & Deisz, R. A. (1993). The role of bicarbonate in GABAA receptor-mediated IPSPs of rat neocortical neurones. *The Journal of Physiology*, *464*(1), 273-289. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1993.sp019634

Karadsheh, M. F., Byun, N., Mount, D. B., & Delpire, E. (2004). Localization of the kcc4 potassium–chloride cotransporter in the nervous system. *Neuroscience*, *123*(2), 381-391. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.10.004

Karadsheh, M. F., & Delpire, E. (2001). Neuronal Restrictive Silencing Element Is Found in the KCC2 Gene : Molecular Basis for KCC2-Specific Expression in Neurons. *Journal of Neurophysiology*, *85*(2), 995-997. https://doi.org/10.1152/jn.2001.85.2.995

Karlish, S. J. D., & Stein, W. D. (1982). Effects of ATP or phosphate on passive rubidium fluxes mediated by Na-K-ATPase reconstituted into phospholipid vesicles. *The Journal of Physiology*, *328*(1), 317-331. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1982.sp014266

Kasyanov, A. M., Safiulina, V. F., Voronin, L. L., & Cherubini, E. (2004). GABA-mediated giant depolarizing potentials as coincidence detectors for enhancing synaptic efficacy in the developing hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(11), 3967-3972. https://doi.org/10.1073/pnas.0305974101

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. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.05.029

Kelsch, W., Hormuzdi, S., Straube, E., Lewen, A., Monyer, H., & Misgeld, U. (2001). Insulin-Like Growth Factor 1 and a Cytosolic Tyrosine Kinase Activate Chloride Outward Transport during Maturation of Hippocampal Neurons. *The Journal of Neuroscience*, *21*(21), 8339-8347. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-21-08339.2001

Kelsom, C., & Lu, W. (2013). Development and specification of GABAergic cortical interneurons. *Cell & Bioscience*, *3*(1), 19. https://doi.org/10.1186/2045-3701-3-19

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. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *14*, 252. https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00252

Khalilov, I., Minlebaev, M., Mukhtarov, M., & Khazipov, R. (2015). Dynamic Changes from Depolarizing to Hyperpolarizing GABAergic Actions during Giant Depolarizing Potentials in the Neonatal Rat Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, *35*(37), 12635-12642. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1922-15.2015

Khirug, S., Soni, S., Saez Garcia, M., Tessier, M., Zhou, L., Kulesskaya, N., Rauvala, H., Lindholm, D., Ludwig, A., Molinari, F., & Rivera, C. (2021). Protective Role of Low Ethanol Administration Following Ischemic Stroke via Recovery of KCC2 and p75NTR Expression. *Molecular Neurobiology*, *58*(3), Article 3. https://doi.org/10.1007/s12035-020-02176-x

Kilb, W., & Luhmann, H. J. (2001). Spontaneous GABAergic postsynaptic currents in Cajal–Retzius cells in neonatal rat cerebral cortex. *European Journal of Neuroscience*, *13*(7), 1387-1390. https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01514.x

Kim, H. J., Denli, A. M., Wright, R., Baul, T. D., Clemenson, G. D., Morcos, A. S., Zhao, C., Schafer, S. T., Gage, F. H., & Kagalwala, M. N. (2015). REST Regulates Non–Cell-Autonomous Neuronal Differentiation and Maturation of Neural Progenitor Cells via Secretogranin II. *The Journal of Neuroscience*, *35*(44), 14872-14884. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4286-14.2015

Kim, J.-Y., Grunke, S. D., Levites, Y., Golde, T. E., & Jankowsky, J. L. (2014). Intracerebroventricular Viral Injection of the Neonatal Mouse Brain for Persistent and Widespread Neuronal Transduction. *Journal of Visualized Experiments*, (91), 51863. https://doi.org/10.3791/51863

Kim, U., & Chung, L. (2007). Dual GABAergic Synaptic Response of Fast Excitation and Slow Inhibition in the Medial Habenula of Rat Epithalamus. *Journal of Neurophysiology*, *98*(3), 1323-1332. https://doi.org/10.1152/jn.00575.2007

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. *Nature Communications*, *6*(1), 7750. https://doi.org/10.1038/ncomms8750

Koinuma, D., Tsutsumi, S., Kamimura, N., Taniguchi, H., Miyazawa, K., Sunamura, M., Imamura, T., Miyazono, K., & Aburatani, H. (2009). Chromatin Immunoprecipitation on Microarray Analysis of Smad2/3 Binding Sites

Reveals Roles of ETS1 and TFAP2A in Transforming Growth Factor β Signaling. *Molecular and Cellular Biology*, *29*(1), 172-186. https://doi.org/10.1128/MCB.01038-08

Kok, M., & Brodsky, J. L. (2024). The biogenesis of potassium transporters : Implications of disease-associated mutations. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *59*(3-4), 154-198. https://doi.org/10.1080/10409238.2024.2369986

Kok, M., Hartnett-Scott, K., Happe, C. L., MacDonald, M. L., Aizenman, E., & Brodsky, J. L. (2024). The expression system influences stability, maturation efficiency, and oligomeric properties of the potassium-chloride co-transporter KCC2. *Neurochemistry International*, *174*, 105695. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2024.105695

Kolbaev, S. N., Mohapatra, N., Chen, R., Lombardi, A., Staiger, J. F., Luhmann, H. J., Jedlicka, P., & Kilb, W. (2020). NKCC-1 mediated Cl− uptake in immature CA3 pyramidal neurons is sufficient to compensate phasic GABAergic inputs. *Scientific Reports*, *10*(1), 18399. https://doi.org/10.1038/s41598-020-75382-1

Kontou, G., Josephine Ng, S. F., Cardarelli, R. A., Howden, J. H., Choi, C., Ren, Q., Rodriguez Santos, M. A., Bope, C. E., Dengler, J. S., Kelley, M. R., Davies, P. A., Kittler, J. T., Brandon, N. J., Moss, S. J., & Smalley, J. L. (2021). KCC2 is required for the survival of mature neurons but not for their development. *Journal of Biological Chemistry*, *296*, 100364. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100364

Koppensteiner, P., Galvin, C., & Ninan, I. (2016). Development- and experience-dependent plasticity in the dorsomedial habenula. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *77*, 105-112. https://doi.org/10.1016/j.mcn.2016.10.006

Kovács, K., Basu, K., Rouiller, I., & Sík, A. (2014). Regional differences in the expression of K+–Cl− 2 cotransporter in the developing rat cortex. *Brain Structure and Function*, *219*(2), 527-538. https://doi.org/10.1007/s00429-013-0515-9

Kraner, S. D., Chong, J. A., Tsay, H.-J., & Mandel, G. (1992). Silencing the type II sodium channel gene : A model for neural-specific gene regulation. *Neuron*, *9*(1), 37-44. https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90218-3

Kreiss, P. (1999). Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency. *Nucleic Acids Research*, *27*(19), 3792-3798. https://doi.org/10.1093/nar/27.19.3792

Kuczewski, N., Porcher, C., Lessmann, V., Medina, I., & Gaiarsa, J.-L. (2009). Activity-Dependent Dendritic Release of BDNF and Biological Consequences. *Molecular Neurobiology*, *39*(1), 37-49. https://doi.org/10.1007/s12035-009-8050-7

Kuner, T., & Augustine, G. J. (2000). A Genetically Encoded Ratiometric Indicator for Chloride. *Neuron*, *27*(3), 447-459. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00056-8

Kurki, S. N., Uvarov, P., Pospelov, A. S., Trontti, K., Hübner, A. K., Srinivasan, R., Watanabe, M., Hovatta, I., Hübner, C. A., Kaila, K., & Virtanen, M. A. (2023). Expression patterns of NKCC1 in neurons and non-neuronal cells during cortico-hippocampal development. *Cerebral Cortex*, *33*(10), 5906-5923. https://doi.org/10.1093/cercor/bhac470

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. *Scientific Reports*, *7*(1), 1732. https://doi.org/10.1038/s41598-017-01814-0

Kyrozis, A., & Reichling, D. B. (1995). Perforated-patch recording with gramicidin avoids artifactual changes in intracellular chloride concentration. *Journal of Neuroscience Methods*, *57*(1), 27-35. https://doi.org/10.1016/0165-0270(94)00116-X

Lai, A. C., & Crews, C. M. (2017). Induced protein degradation : An emerging drug discovery paradigm. *Nature Reviews Drug Discovery*, *16*(2), 101-114. https://doi.org/10.1038/nrd.2016.211

Laurie, D., Wisden, W., & Seeburg, P. (1992). The distribution of thirteen GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. III. Embryonic and postnatal development. *The Journal of Neuroscience*, *12*(11), 4151-4172. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.12-11-04151.1992

Ledonne, F., Orduz, D., Mercier, J., Vigier, L., Grove, E. A., Tissir, F., Angulo, M. C., Pierani, A., & Coppola, E. (2016). Targeted Inactivation of Bax Reveals a Subtype-Specific Mechanism of Cajal-Retzius Neuron Death in the Postnatal Cerebral Cortex. *Cell Reports*, *17*(12), Article 12. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.11.074

Lee, H. H. C., Deeb, T. Z., Walker, J. A., Davies, P. A., & Moss, S. J. (2011). NMDA receptor activity downregulates KCC2 resulting in depolarizing GABAA receptor–mediated currents. *Nature Neuroscience*, *14*(6), Article 6. https://doi.org/10.1038/nn.2806

Lee, H. H. C., Jurd, R., & Moss, S. J. (2010). Tyrosine phosphorylation regulates the membrane trafficking of the potassium chloride co-transporter KCC2. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *45*(2), 173-179. https://doi.org/10.1016/j.mcn.2010.06.008

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. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(41), 29777-29784. https://doi.org/10.1074/jbc.M705053200

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*(3), Article 3. https://doi.org/10.1093/brain/awab343

Lee-Hotta, S., Uchiyama, Y., & Kametaka, S. (2019). Role of the BDNF-TrkB pathway in KCC2 regulation and rehabilitation following neuronal injury : A mini review. *Neurochemistry International*, *128*, 32-38. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.04.003

Leinekugel, X., Khazipov, R., Cannon, R., Hirase, H., Ben-Ari, Y., & Buzsáki, G. (2002). Correlated Bursts of Activity in the Neonatal Hippocampus in Vivo. *Science*, *296*(5575), 2049-2052. https://doi.org/10.1126/science.1071111

Leinekugel, X., Medina, I., Khalilov, I., Ben-Ari, Y., & Khazipov, R. (1997). Ca2+ Oscillations Mediated by the Synergistic Excitatory Actions of GABAA and NMDA Receptors in the Neonatal Hippocampus. *Neuron*, *18*(2), 243-255. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80265-2

Leitch, E., Coaker, J., Young, C., Mehta, V., & Sernagor, E. (2005). GABA Type-A Activity Controls Its Own Developmental Polarity Switch in the Maturing Retina. *The Journal of Neuroscience*, *25*(19), 4801-4805. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0172-05.2005

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 Reports*, *15*(1), 96-103. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.013

Lessmann, V., & Brigadski, T. (2009). Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion : An update. *Neuroscience Research*, *65*(1), 11-22. https://doi.org/10.1016/j.neures.2009.06.004

Lévesque, M., Wang, S., Macey-Dare, A. D. B., Salami, P., & Avoli, M. (2023). Evolution of interictal activity in models of mesial temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of Disease*, *180*, 106065. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2023.106065

Li, G., Cheng, Q., Liu, L., Zhou, T., Shan, C., Hu, X., Zhou, J., Liu, E., Li, P., & Gao, N. (2013). Mitochondrial translocation of cofilin is required for allyl isothiocyanate-mediated cell death via ROCK1/PTEN/PI3K signaling pathway. *Cell Communication and Signaling*, *11*(1), 50. https://doi.org/10.1186/1478-811X-11-50

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*(6), Article 6. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.10.039

Li, H., Tornberg, J., Kaila, K., Airaksinen, M. S., & Rivera, C. (2002). Patterns of cation-chloride cotransporter expression during embryonic rodent CNS development. *European Journal of Neuroscience*, *16*(12), 2358-2370. https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02419.x

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 Research*, *1221*, 141-146. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.04.047

Liabeuf, S., Brocard, C., Coq, J.-O., Vinay, L., & Brocard, F. (2026). KCC2 phosphorylation dynamics relate to oligomerization during development and after spinal cord injury. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *19*, 1745037. https://doi.org/10.3389/fnmol.2026.1745037

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. *Journal of Neurotrauma*, *34*(24), 3397-3406. https://doi.org/10.1089/neu.2017.5152

Lilliu, V., Pernas-Alonso, R., Diaz Trelles, R., Di Porzio, U., Zuddas, A., & Perrone-Capano, C. (2001). Ontogeny of AMPA receptor gene expression in the developing rat midbrain and striatum. *Molecular Brain Research*, *96*(1-2), 133-141. https://doi.org/10.1016/S0169-328X(01)00280-7

Lim, W. M., Chin, E. W. M., Tang, B. L., Chen, T., & Goh, E. L. K. (2021). WNK3 Maintains the GABAergic Inhibitory Tone, Synaptic Excitation and Neuronal Excitability via Regulation of KCC2 Cotransporter in Mature Neurons. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *14*, 762142. https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.762142

Lin, D.-T., Makino, Y., Sharma, K., Hayashi, T., Neve, R., Takamiya, K., & Huganir, R. L. (2009). Regulation of AMPA receptor extrasynaptic insertion by 4.1N, phosphorylation and palmitoylation. *Nature Neuroscience*, *12*(7), 879-887. https://doi.org/10.1038/nn.2351

Lin, M.-H., Takahashi, M. P., Takahashi, Y., & Tsumoto, T. (1994). Intracellular calcium increase induced by GABA in visual cortex of fetal and neonatal rats and its disappearance with development. *Neuroscience Research*, *20*(1), 85-94. https://doi.org/10.1016/0168-0102(94)90025-6

Lin, Y., Jover-Mengual, T., Wong, J., Bennett, M. V. L., & Zukin, R. S. (2006). PSD-95 and PKC converge in regulating NMDA receptor trafficking and gating. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(52), 19902-19907. https://doi.org/10.1073/pnas.0609924104

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*(6464), 505-508. https://doi.org/10.1126/science.aay3129

Liu, X., Wang, Q., Haydar, T. F., & Bordey, A. (2005). Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. *Nature Neuroscience*, *8*(9), 1179-1187. https://doi.org/10.1038/nn1522

Liu, Z., Chen, O., Wall, J. B. J., Zheng, M., Zhou, Y., Wang, L., Ruth Vaseghi, H., Qian, L., & Liu, J. (2017). Systematic comparison of 2A peptides for cloning multi-genes in a polycistronic vector. *Scientific Reports*, *7*(1), 2193. https://doi.org/10.1038/s41598-017-02460-2

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. *Journal of Cell Biology*, *209*(5), 671-686. https://doi.org/10.1083/jcb.201411008

Lombardi, A., Jedlicka, P., Luhmann, H. J., & Kilb, W. (2018). Giant Depolarizing Potentials Trigger Transient Changes in the Intracellular Cl- Concentration in CA3 Pyramidal Neurons of the Immature Mouse Hippocampus. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *12*, 420. https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00420

LoTurco, J. J., Owens, D. F., Heath, M. J. S., Davis, M. B. E., & Kriegstein, A. R. (1995). GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron*, *15*(6), 1287-1298. https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90008-X

Lu, S.-M., Zecevic, N., & Yeh, H. H. (2001). Distinct NMDA and AMPA Receptor–Mediated Responses in Mouse and Human Cajal-Retzius Cells. *Journal of Neurophysiology*, *86*(5), 2642-2646. https://doi.org/10.1152/jn.2001.86.5.2642

Ludwig, A., Li, H., Saarma, M., Kaila, K., & Rivera, C. (2003). Developmental up-regulation of KCC2 in the absence of GABAergic and glutamatergic transmission. *European Journal of Neuroscience*, *18*(12), Article 12. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2003.03069.x

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 Neuroscience*, *18*(1), 23. https://doi.org/10.1186/s12868-017-0336-5

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 Plasticity*, *2011*, 1-8. https://doi.org/10.1155/2011/641248

Ludwig, A., Uvarov, P., Soni, S., Thomas-Crusells, J., Airaksinen, M. S., & Rivera, C. (2011). Early Growth Response 4 Mediates BDNF Induction of Potassium Chloride Cotransporter 2 Transcription. *The Journal of Neuroscience*, *31*(2), 644-649. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2006-10.2011

Luo, L., Wang, J., Ding, D., Hasan, M. N., Yang, S.-S., Lin, S.-H., Schreppel, P., Sun, B., Yin, Y., Erker, T., & Sun, D. (2020). Role of NKCC1 Activity in Glioma K+ Homeostasis and Cell Growth : New Insights With the Bumetanide-Derivative STS66. *Frontiers in Physiology*, *11*, 911. https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00911

Ma, W., & Barker, J. (1995). Complementary expressions of transcripts encoding GAD67 and GABAA receptor alpha 4, beta 1, and gamma 1 subunits in the proliferative zone of the embryonic rat central nervous system. *The Journal of Neuroscience*, *15*(3), 2547-2560. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-03-02547.1995

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. https://doi.org/10.7554/eLife.28270

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 Reports*, *7*(6), 1762-1770. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.022

Malik, R., Dougherty, K. A., Parikh, K., Byrne, C., & Johnston, D. (2016). Mapping the electrophysiological and morphological properties of CA 1 pyramidal neurons along the longitudinal hippocampal axis. *Hippocampus*, *26*(3), 341-361. https://doi.org/10.1002/hipo.22526

Manent, J.-B., Demarque, M., Jorquera, I., Pellegrino, C., Ben-Ari, Y., Aniksztejn, L., & Represa, A. (2005). A Noncanonical Release of GABA and Glutamate Modulates Neuronal Migration. *The Journal of Neuroscience*, *25*(19), 4755-4765. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0553-05.2005

Manser, E., Loo, T.-H., Koh, C.-G., Zhao, Z.-S., Chen, X.-Q., Tan, L., Tan, I., Leung, T., & Lim, L. (1998). PAK Kinases Are Directly Coupled to the PIX Family of Nucleotide Exchange Factors. *Molecular Cell*, *1*(2), 183-192. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80019-2

Mao, L.-M., Young, L., Chu, X.-P., & Wang, J. Q. (2024). Regulation of Src family kinases by muscarinic acetylcholine receptors in heterologous cells and neurons. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *16*, 1340725. https://doi.org/10.3389/fnmol.2023.1340725

Mao, S., Garzon-Muvdi, T., Di Fulvio, M., Chen, Y., Delpire, E., Alvarez, F. J., & Alvarez-Leefmans, F. J. (2012). Molecular and functional expression of cation-chloride cotransporters in dorsal root ganglion neurons during postnatal maturation. *Journal of Neurophysiology*, *108*(3), 834-852. https://doi.org/10.1152/jn.00970.2011

Marathe, K., Alim-Marvasti, A., Dahele, K., Xiao, F., Buck, S., O'Keeffe, A. G., Duncan, J. S., & Vakharia, V. N. (2021). Resective, Ablative and Radiosurgical Interventions for Drug Resistant Mesial Temporal Lobe Epilepsy : A Systematic Review and Meta-Analysis of Outcomes. *Frontiers in Neurology*, *12*, 777845. https://doi.org/10.3389/fneur.2021.777845

Marchionni, I., Takács, V. T., Nunzi, M. G., Mugnaini, E., Miller, R. J., & Maccaferri, G. (2010). Distinctive properties of CXC chemokine receptor 4-expressing Cajal–Retzius cells *versus* GABAergic interneurons of the postnatal hippocampus. *The Journal of Physiology*, *588*(15), Article 15. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.190868

Maric, D., Liu, Q.-Y., Maric, I., Chaudry, S., Chang, Y.-H., Smith, S. V., Sieghart, W., Fritschy, J.-M., & Barker, J. L. (2001). GABA Expression Dominates Neuronal Lineage Progression in the Embryonic Rat Neocortex and Facilitates Neurite Outgrowth via $GABA_A$ Autoreceptor/Cl^- Channels. *The Journal of Neuroscience*, *21*(7), 2343-2360. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-07-02343.2001

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. *Journal of Comparative Neurology*, *522*(8), Article 8. https://doi.org/10.1002/cne.23510

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 Research*, *1675*, 87-101. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.08.034

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 Research*, *1236*, 8-15. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.08.007

Martí-Clúa, J. (2023). Methods for Inferring Cell Cycle Parameters Using Thymidine Analogues. *Biology*, *12*(6), 885. https://doi.org/10.3390/biology12060885

Marty, S., Berninger, B., Carroll, P., & Thoenen, H. (1996). GABAergic Stimulation Regulates the Phenotype of Hippocampal Interneurons through the Regulation of Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Neuron*, *16*(3), 565-570. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80075-6

Mason, B., & Laman, H. (2020). The FBXL family of F-box proteins : Variations on a theme. *Open Biology*, *10*(11), 200319. https://doi.org/10.1098/rsob.200319

Mavrovic, M., Uvarov, P., Delpire, E., Vutskits, L., Kaila, K., & Puskarjov, M. (2020). Loss of non-canonical KCC 2 functions promotes developmental apoptosis of cortical projection neurons. *EMBO Reports*, *21*(4), Article 4. https://doi.org/10.15252/embr.201948880

Medina, I., Friedel, P., Rivera, C., Kahle, K. T., Kourdougli, N., Uvarov, P., & Pellegrino, C. (2014). Current view on the functional regulation of the neuronal K+-Cl− cotransporter KCC2. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*. https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00027

Menshanov, P. N., Lanshakov, D. A., & Dygalo, N. N. (2015). ProBDNF Is a Major Product of bdnf Gene Expressed in the Perinatal Rat Cortex. *Physiological Research*, 925-934. https://doi.org/10.33549/physiolres.932996

Meor Azlan, N. F., Koeners, M. P., & Zhang, J. (2021). Regulatory control of the Na–Cl co-transporter NCC and its therapeutic potential for hypertension. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, *11*(5), 1117-1128. https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.09.009

Mercado, A., Song, L., Vázquez, N., Mount, D. B., & Gamba, G. (2000). Functional Comparison of the K+-Cl−Cotransporters KCC1 and KCC4. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(39), 30326-30334. https://doi.org/10.1074/jbc.M003112200

Mercado, A., Vázquez, N., Song, L., Cortés, R., Enck, A. H., Welch, R., Delpire, E., Gamba, G., & Mount, D. B. (2005). NH2-terminal heterogeneity in the KCC3 K+-Cl- cotransporter. *American journal of physiology. Renal physiology*, *289*(6), F1246–F1261. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00464.2004

Mercado, A., Broumand, V., Zandi-Nejad, K., Enck, A. H., & Mount, D. B. (2006). A C-terminal domain in KCC2 confers constitutive K+-Cl- cotransport. The Journal of biological chemistry, 281(2), 1016–1026. https://doi.org/10.1074/jbc.M509972200

Meyer-Dilhet, G., & Courchet, J. (2020). In Utero Cortical Electroporation of Plasmids in the Mouse Embryo. *STAR Protocols*, *1*(1), 100027. https://doi.org/10.1016/j.xpro.2020.100027

Micheva, K. D., & Beaulieu, C. (1996). Quantitative aspects of synaptogenesis in the rat barrel field cortex with special reference to GABA circuitry. *The Journal of Comparative Neurology*, *373*(3), 340-354. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960923)373:3<340::AID-CNE3>3.0.CO;2-2

Milazzo, G., Mercatelli, D., Di Muzio, G., Triboli, L., De Rosa, P., Perini, G., & Giorgi, F. M. (2020). Histone Deacetylases (HDACs) : Evolution, Specificity, Role in Transcriptional Complexes, and Pharmacological Actionability. *Genes*, *11*(5), 556. https://doi.org/10.3390/genes11050556

Min, X., Lee, B.-H., Cobb, M. H., & Goldsmith, E. J. (2004). Crystal Structure of the Kinase Domain of WNK1, a Kinase that Causes a Hereditary Form of Hypertension. *Structure*, *12*(7), 1303-1311. https://doi.org/10.1016/j.str.2004.04.014

Minelli, A., Alonso-Nanclares, L., Edwards, R. H., DeFelipe, J., & Conti, F. (2003). Postnatal development of the vesicular gaba transporter in rat cerebral cortex. *Neuroscience*, *117*(2), 337-346. https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00864-3

Misgeld, U., Deisz, R. A., Dodt, H. U., & Lux, H. D. (1986). The Role of Chloride Transport in Postsynaptic Inhibition of Hippocampal Neurons. *Science*, *232*(4756), 1413-1415. https://doi.org/10.1126/science.2424084

Mizzi, N., & Blundell, R. (2025). Glycine receptors : Structure, function, and therapeutic implications. *Molecular Aspects of Medicine*, *103*, 101360. https://doi.org/10.1016/j.mam.2025.101360

Moan, K., Machold, R., & Quattrocolo, G. (2025). Differences in Cajal–Retzius Cell Density and Postnatal Persistence Across Cortical Areas Revealed by a Novel Intersectional Genetic Labeling Approach. *Journal of Comparative Neurology*, *533*(11), e70106. https://doi.org/10.1002/cne.70106

Modregger, J., Ritter, B., Witter, B., Paulsson, M., & Plomann, M. (2000). All three PACSIN isoforms bind to endocytic proteins and inhibit endocytosis. *Journal of Cell Science*, *113*(24), 4511-4521. https://doi.org/10.1242/jcs.113.24.4511

Mohajerani, M. H., Sivakumaran, S., Zacchi, P., Aguilera, P., & Cherubini, E. (2007). Correlated network activity enhances synaptic efficacy via BDNF and the ERK pathway at immature CA3–CA1 connections in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(32), 13176-13181. https://doi.org/10.1073/pnas.0704533104

Moore, Y. E., Conway, L. C., Wobst, H. J., Brandon, N. J., Deeb, T. Z., & Moss, S. J. (2019). Developmental Regulation of KCC2 Phosphorylation Has Long-Term Impacts on Cognitive Function. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *12*, 173. https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00173

Moore-Hoon, M. L., & Turner, R. J. (2000). The Structural Unit of the Secretory Na^+ −K^+ −2Cl^- Cotransporter (NKCC1) Is a Homodimer. *Biochemistry*, *39*(13), 3718-3724. https://doi.org/10.1021/bi992301v

Morganti, G., Ceccarelli, G., & Ciaffi, G. (1968). [Comparative concentrations of a tetracycline antibiotic in serum and maternal milk]. *Antibiotica*, *6*(3), 216-223.

Mori, N., Schoenherr, C., Vandenbergh, D. J., & Anderson, D. J. (1992). A common silencer element in the SCG10 and type II Na+ channel genes binds a factor present in nonneuronal cells but not in neuronal cells. *Neuron*, *9*(1), 45-54. https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90219-4

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. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(52), 42685-42693. https://doi.org/10.1074/jbc.M510042200

Morishita, W., Connor, J. H., Xia, H., Quinlan, E. M., Shenolikar, S., & Malenka, R. C. (2001). Regulation of Synaptic Strength by Protein Phosphatase 1. *Neuron*, *32*(6), 1133-1148. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00554-2

Mount, D. B., Mercado, A., Song, L., Xu, J., George, A. L., Delpire, E., & Gamba, G. (1999). Cloning and Characterization of KCC3 and KCC4, New Members of the Cation-Chloride Cotransporter Gene Family. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(23), 16355-16362. https://doi.org/10.1074/jbc.274.23.16355

Muñoz, A., Méndez, P., DeFelipe, J., & Alvarez-Leefmans, F. J. (2007). Cation-Chloride Cotransporters and GABA-ergic Innervation in the Human Epileptic Hippocampus. *Epilepsia*, *48*(4), 663-673. https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.00986.x

Murata, Y., & Colonnese, M. T. (2020). GABAergic interneurons excite neonatal hippocampus in vivo. *Science Advances*, *6*(24), eaba1430. https://doi.org/10.1126/sciadv.aba1430

Murillo-de-Ozores, A. R., Chávez-Canales, M., De Los Heros, P., Gamba, G., & Castañeda-Bueno, M. (2020). Physiological Processes Modulated by the Chloride-Sensitive WNK-SPAK/OSR1 Kinase Signaling Pathway and the Cation-Coupled Chloride Cotransporters. *Frontiers in Physiology*, *11*, 585907. https://doi.org/10.3389/fphys.2020.585907

Murillo-de-Ozores, A. R., Rodríguez-Gama, A., Carbajal-Contreras, H., Gamba, G., & Castañeda-Bueno, M. (2021). WNK4 kinase : From structure to physiology. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, *320*(3), F378-F403. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00634.2020

Myers, A. K., Meechan, D. W., Adney, D. R., & Tucker, E. S. (2014). Cortical Interneurons Require Jnk1 to Enter and Navigate the Developing Cerebral Cortex. *Journal of Neuroscience*, *34*(23), 7787-7801. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4695-13.2014

Naderi, M., Nguyen, T. M. N., Pompili, C., & Kwong, R. W. M. (2024). Unraveling the socio-cognitive consequences of KCC2 disruption in zebrafish : Implications for neurodevelopmental disorders and therapeutic interventions. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *17*, 1483238. https://doi.org/10.3389/fnmol.2024.1483238

Nakano, Y., Wiechert, S., & Bánfi, B. (2019). Overlapping Activities of Two Neuronal Splicing Factors Switch the GABA Effect from Excitatory to Inhibitory by Regulating REST. *Cell Reports*, *27*(3), 860-871.e8. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.03.072

Nan, J., Yuan, Y., Yang, X., Shan, Z., Liu, H., Wei, F., Zhang, W., & Zhang, Y. (2022). Cryo-EM structure of the human sodium-chloride cotransporter NCC. *Science Advances*, *8*(45), eadd7176. https://doi.org/10.1126/sciadv.add7176

Nardou, R., Ben-Ari, Y., & Khalilov, I. (2009). Bumetanide, an NKCC1 Antagonist, Does Not Prevent Formation of Epileptogenic Focus but Blocks Epileptic Focus Seizures in Immature Rat Hippocampus. *Journal of Neurophysiology*, *101*(6), 2878-2888. https://doi.org/10.1152/jn.90761.2008

Ngo-Anh, T. J., Bloodgood, B. L., Lin, M., Sabatini, B. L., Maylie, J., & Adelman, J. P. (2005). SK channels and NMDA receptors form a Ca2+-mediated feedback loop in dendritic spines. *Nature Neuroscience*, *8*(5), 642-649. https://doi.org/10.1038/nn1449

Nielsen, S., Frøkiær, J., Marples, D., Kwon, T.-H., Agre, P., & Knepper, M. A. (2002). Aquaporins in the Kidney : From Molecules to Medicine. *Physiological Reviews*, *82*(1), 205-244. https://doi.org/10.1152/physrev.00024.2001

Niklison-Chirou, M. V., Steinert, J. R., Agostini, M., Knight, R. A., Dinsdale, D., Cattaneo, A., Mak, T. W., & Melino, G. (2013). TAp73 knockout mice show morphological and functional nervous system defects associated with loss of p75 neurotrophin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(47), Article 47. https://doi.org/10.1073/pnas.1221172110

Obata, K., Oide, M., & Tanaka, H. (1978). Excitatory and inhibitory actions of GABA and glycine on embryonic chick spinal neurons in culture. *Brain Research*, *144*(1), 179-184. https://doi.org/10.1016/0006-8993(78)90447-X

Obermuller, N., Bernstein, P., Velazquez, H., Reilly, R., Moser, D., Ellison, D. H., & Bachmann, S. (1995). Expression of the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter in rat and human kidney. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, *269*(6), F900-F910. https://doi.org/10.1152/ajprenal.1995.269.6.F900

Obrietan, K., Gao, X.-B., & Van Den Pol, A. N. (2002). Excitatory Actions of GABA Increase BDNF Expression via a MAPK-CREB–Dependent Mechanism—A Positive Feedback Circuit in Developing Neurons. *Journal of Neurophysiology*, *88*(2), 1005-1015. https://doi.org/10.1152/jn.2002.88.2.1005

Oh, W. C., Lutzu, S., Castillo, P. E., & Kwon, H.-B. (2016). De novo synaptogenesis induced by GABA in the developing mouse cortex. *Science*, *353*(6303), 1037-1040. https://doi.org/10.1126/science.aaf5206

Ohnishi, H., Murata, Y., Okazawa, H., & Matozaki, T. (2011). Src family kinases : Modulators of neurotransmitter receptor function and behavior. *Trends in Neurosciences*, *34*(12), 629-637. https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.09.005

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. *The Journal of Physiology*, *598*(10), 1865-1880. https://doi.org/10.1113/JP279221

Owens, D. F., & Kriegstein, A. R. (2002). Is there more to gaba than synaptic inhibition? *Nature Reviews Neuroscience*, *3*(9), 715-727. https://doi.org/10.1038/nrn919

Owens, D. F., Liu, X., & Kriegstein, A. R. (1999). Changing Properties of $GABA_A$ Receptor–Mediated Signaling During Early Neocortical Development. *Journal of Neurophysiology*, *82*(2), 570-583. https://doi.org/10.1152/jn.1999.82.2.570

Ozaki, T., Kubo, N., & Nakagawara, A. (2010). P73-Binding Partners and Their Functional Significance. *International Journal of Proteomics*, *2010*, 1-12. https://doi.org/10.1155/2010/283863

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(22), 8465-8468. https://doi.org/10.1073/pnas.0602979103

Papadopoulos, M. C., & Verkman, A. S. (2013). Aquaporin water channels in the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, *14*(4), 265-277. https://doi.org/10.1038/nrn3468

Parrini, M., Naskar, S., Alberti, M., Colombi, I., Morelli, G., Rocchi, A., Nanni, M., Piccardi, F., Charles, S., Ronzitti, G., Mingozzi, F., Contestabile, A., & Cancedda, L. (2021). Restoring neuronal chloride homeostasis with

anti-NKCC1 gene therapy rescues cognitive deficits in a mouse model of Down syndrome. *Molecular Therapy*, *29*(10), 3072-3092. https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.05.023

Parvin, Most. N., Gerelsaikhan, T., & Turner, R. J. (2007). Regions in the Cytosolic C-Terminus of the Secretory Na^+ -K^+ -2Cl^- Cotransporter NKCC1 Are Required for Its Homodimerization. *Biochemistry*, *46*(33), 9630-9637. https://doi.org/10.1021/bi700881a

Pasantes-Morales, H., & Tuz, K. (2006). Volume Changes in Neurons : Hyperexcitability and Neuronal Death. In F. Lang (Éd.), *Contributions to Nephrology* (p. 221-240). KARGER. https://doi.org/10.1159/000096326

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. *The Journal of Neuroscience*, *27*(51), 14012-14022. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4390-07.2007

Paudel, R. R., Lu, D., Roy Chowdhury, S., Monroy, E. Y., & Wang, J. (2023). Targeted Protein Degradation via Lysosomes. *Biochemistry*, *62*(3), 564-579. https://doi.org/10.1021/acs.biochem.2c00310

Payne, J. A. (1997). Functional characterization of the neuronal-specific K-Cl cotransporter : Implications for $[K^+]_o$ regulation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *273*(5), C1516-C1525. https://doi.org/10.1152/ajpcell.1997.273.5.C1516

Payne, J. A., Stevenson, T. J., & Donaldson, L. F. (1996). Molecular Characterization of a Putative K-Cl Cotransporter in Rat Brain. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(27), Article 27. https://doi.org/10.1074/jbc.271.27.16245

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*(2), 481-491. https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00567-4

Pellegrino, C., Gubkina, O., Schaefer, M., Becq, H., Ludwig, A., Mukhtarov, M., Chudotvorova, I., Corby, S., Salyha, Y., Salozhin, S., Bregestovski, P., & Medina, I. (2011). Knocking down of the KCC2 in rat hippocampal neurons increases intracellular chloride concentration and compromises neuronal survival. *The Journal of Physiology*, *589*(10), 2475-2496. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.203703

Perkins, K. L. (2006). Cell-attached voltage-clamp and current-clamp recording and stimulation techniques in brain slices. *Journal of Neuroscience Methods*, *154*(1-2), 1-18. https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2006.02.010

Pesold, C., Impagnatiello, F., Pisu, M. G., Uzunov, D. P., Costa, E., Guidotti, A., & Caruncho, H. J. (1998). Reelin is preferentially expressed in neurons synthesizing γ-aminobutyric acid in cortex and hippocampus of adult rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(6), 3221-3226. https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.3221

Petralia, R. S., Esteban, J. A., Wang, Y. –X., Partridge, J. G., Zhao, H. –M., Wenthold, R. J., & Malinow, R. (1999). Selective acquisition of AMPA receptors over postnatal development suggests a molecular basis for silent synapses. *Nature Neuroscience*, *2*(1), 31-36. https://doi.org/10.1038/4532

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. *The Journal of Neuroscience*, *29*(11), 3419-3430. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1377-08.2009

Piala, A. T., Moon, T. M., Akella, R., He, H., Cobb, M. H., & Goldsmith, E. J. (2014). Chloride Sensing by WNK1 Involves Inhibition of Autophosphorylation. *Science Signaling*, *7*(324), Article 324. https://doi.org/10.1126/scisignal.2005050

Piatkov, K. I., Oh, J.-H., Liu, Y., & Varshavsky, A. (2014). Calpain-generated natural protein fragments as short-lived substrates of the N-end rule pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(9). https://doi.org/10.1073/pnas.1401639111

Piechotta, K., Lu, J., & Delpire, E. (2002). Cation Chloride Cotransporters Interact with the Stress-related Kinases Ste20-related Proline-Alanine-rich Kinase (SPAK) and Oxidative Stress Response 1 (OSR1). *Journal of Biological Chemistry*, *277*(52), 50812-50819. https://doi.org/10.1074/jbc.M208108200

Pisella, L. I., Gaiarsa, J.-L., Diabira, D., Zhang, J., Khalilov, I., Duan, J., Kahle, K. T., & Medina, I. (2019). Impaired regulation of KCC2 phosphorylation leads to neuronal network dysfunction and neurodevelopmental pathology. *Science Signaling*, *12*(603), Article 603. https://doi.org/10.1126/scisignal.aay0300

Pitkänen, A., & Lukasiuk, K. (2011). Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. *The Lancet Neurology*, *10*(2), 173-186. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70310-0

Platkiewicz, J., & Brette, R. (2010). A Threshold Equation for Action Potential Initiation. *PLoS Computational Biology*, *6*(7), e1000850. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000850

Poletti, V., & Mavilio, F. (2021). Designing Lentiviral Vectors for Gene Therapy of Genetic Diseases. *Viruses*, *13*(8), 1526. https://doi.org/10.3390/v13081526

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(24), 8458-8463. https://doi.org/10.1073/pnas.0802966105

Pontious, A., Kowalczyk, T., Englund, C., & Hevner, R. F. (2008). Role of Intermediate Progenitor Cells in Cerebral Cortex Development. *Developmental Neuroscience*, *30*(1-3), 24-32. https://doi.org/10.1159/000109848

Portioli, C., Ruiz Munevar, M. J., De Vivo, M., & Cancedda, L. (2021). Cation-coupled chloride cotransporters : Chemical insights and disease implications. *Trends in Chemistry*, *3*(10), 832-849. https://doi.org/10.1016/j.trechm.2021.05.004

Pozas, E., Paco, S., Soriano, E., & Aguado, F. (2008). Cajal–Retzius cells fail to trigger the developmental expression of the Cl−extruding co-transporter KCC2. *Brain Research*, *1239*, 85-91. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.08.058

Pozniak, C. D., Barnabé-Heider, F., Rymar, V. V., Lee, A. F., Sadikot, A. F., & Miller, F. D. (2002). P73 Is Required for Survival and Maintenance of CNS Neurons. *The Journal of Neuroscience*, *22*(22), 9800-9809. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-22-09800.2002

Prakash, S., Cooper, G., Singhi, S., & Saier, M. H. (2003). The ion transporter superfamily. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1618*(1), 79-92. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2003.10.010

Pressey, J. C., De Saint-Rome, M., Raveendran, V. A., & Woodin, M. A. (2023). Chloride transporters controlling neuronal excitability. *Physiological Reviews*, *103*(2), 1095-1135. https://doi.org/10.1152/physrev.00025.2021

Puskarjov, M., Ahmad, F., Kaila, K., & Blaesse, P. (2012). Activity-Dependent Cleavage of the K-Cl Cotransporter KCC2 Mediated by Calcium-Activated Protease Calpain. *The Journal of Neuroscience*, *32*(33), Article 33. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6265-11.2012

Quattrocolo, G., & Maccaferri, G. (2013). Novel GABAergic Circuits Mediating Excitation/Inhibition of Cajal-Retzius Cells in the Developing Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, *33*(13), Article 13. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5680-12.2013

Radnikow, G., Feldmeyer, D., & Lübke, J. (2002). Axonal Projection, Input and Output Synapses, and Synaptic Physiology of Cajal–Retzius Cells in the Developing Rat Neocortex. *The Journal of Neuroscience*, *22*(16), 6908-6919. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-16-06908.2002

Raedler, E., & Raedler, A. (1978). Autoradiographic study of early neurogenesis in rat neocortex. *Anatomy and Embryology*, *154*(3), 267-284. https://doi.org/10.1007/BF00345657

Ramadan, S., Terrinoni, A., Catani, M. V., Sayan, A. E., Knight, R. A., Mueller, M., Krammer, P. H., Melino, G., & Candi, E. (2005). P73 induces apoptosis by different mechanisms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *331*(3), 713-717. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.03.156

Randall, J., Thorne, T., & Delpire, E. (1997). Partial cloning and characterization of *Slc12a2* : The gene encoding the secretory Na^+ -K^+ -2Cl^- cotransporter. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *273*(4), C1267-C1277. https://doi.org/10.1152/ajpcell.1997.273.4.C1267

Raut, S. K., Singh, K., Sanghvi, S., Loyo-Celis, V., Varghese, L., Singh, E. R., Gururaja Rao, S., & Singh, H. (2024). Chloride ions in health and disease. *Bioscience Reports*, *44*(5), BSR20240029. https://doi.org/10.1042/BSR20240029

Redelsperger, I. M., Taldone, T., Riedel, E. R., Lepherd, M. L., Lipman, N. S., & Wolf, F. R. (2016). Stability of Doxycycline in Feed and Water and Minimal Effective Doses in Tetracycline-Inducible Systems. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS*, *55*(4), Article 4.

Rehklau, K., Gurniak, C. B., Conrad, M., Friauf, E., Ott, M., & Rust, M. B. (2012). ADF/cofilin proteins translocate to mitochondria during apoptosis but are not generally required for cell death signaling. *Cell Death & Differentiation*, *19*(6), 958-967. https://doi.org/10.1038/cdd.2011.180

Reynolds, A., Parris, A., Evans, L. A., Lindqvist, S., Sharp, P., Lewis, M., Tighe, R., & Williams, M. R. (2007). Dynamic and differential regulation of NKCC1 by calcium and cAMP in the native human colonic epithelium. *The Journal of Physiology*, *582*(2), 507-524. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.129718

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. *Journal of Cell Science*, *121*(5), 675-684. https://doi.org/10.1242/jcs.025312

Richardson, C., Sakamoto, K., De Los Heros, P., Deak, M., Campbell, D. G., Prescott, A. R., & Alessi, D. R. (2011). Regulation of the NKCC2 ion cotransporter by SPAK-OSR1-dependent and -independent pathways. *Journal of Cell Science*, *124*(5), 789-800. https://doi.org/10.1242/jcs.077230

Riching, K. M., Caine, E. A., Urh, M., & Daniels, D. L. (2022). The importance of cellular degradation kinetics for understanding mechanisms in targeted protein degradation. *Chemical Society Reviews*, *51*(14), 6210-6221. https://doi.org/10.1039/D2CS00339B

Riffault, B., Kourdougli, N., Dumon, C., Ferrand, N., Buhler, E., Schaller, F., Chambon, C., Rivera, C., Gaiarsa, J.-L., & Porcher, C. (2018). Pro-Brain-Derived Neurotrophic Factor (proBDNF)-Mediated p75NTR Activation Promotes Depolarizing Actions of GABA and Increases Susceptibility to Epileptic Seizures. *Cerebral Cortex*, *28*(2), 510-527. https://doi.org/10.1093/cercor/bhw385

Rigkou, A., Magyar, A., Speer, J. M., & Roussa, E. (2022). TGF-β2 Regulates Transcription of the K+/Cl− Cotransporter 2 (KCC2) in Immature Neurons and Its Phosphorylation at T1007 in Differentiated Neurons. *Cells*, *11*(23), Article 23. https://doi.org/10.3390/cells11233861

Rinehart, J., Kahle, K. T., De Los Heros, P., Vazquez, N., Meade, P., Wilson, F. H., Hebert, S. C., Gimenez, I., Gamba, G., & Lifton, R. P. (2005). WNK3 kinase is a positive regulator of NKCC2 and NCC, renal cation-Cl^- cotransporters required for normal blood pressure homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(46), 16777-16782. https://doi.org/10.1073/pnas.0508303102

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*(3), 525-536. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.031

Ringstedt, T., Linnarsson, S., Wagner, J., Lendahl, U., Kokaia, Z., Arenas, E., Ernfors, P., & Ibáñez, C. F. (1998). BDNF Regulates Reelin Expression and Cajal-Retzius Cell Development in the Cerebral Cortex. *Neuron*, *21*(2), 305-315. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80540-1

Riva, M., Genescu, I., Habermacher, C., Orduz, D., Ledonne, F., Rijli, F. M., López-Bendito, G., Coppola, E., Garel, S., Angulo, M. C., & Pierani, A. (2019). Activity-dependent death of transient Cajal-Retzius neurons is required for functional cortical wiring. *ELife*, *8*, e50503. https://doi.org/10.7554/eLife.50503

Riva, M., Moriceau, S., Morabito, A., Dossi, E., Sanchez-Bellot, C., Azzam, P., Navas-Olive, A., Gal, B., Dori, F., Cid, E., Ledonne, F., David, S., Trovero, F., Bartolomucci, M., Coppola, E., Rebola, N., Depaulis, A., Rouach, N., de la Prida, L. M., … Pierani, A. (2023). Aberrant survival of hippocampal Cajal-Retzius cells leads to memory deficits, gamma rhythmopathies and susceptibility to seizures in adult mice. *Nature Communications*, *14*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/s41467-023-37249-7

Rivera, C., Li, H., Thomas-Crusells, J., Lahtinen, H., Viitanen, T., Nanobashvili, A., Kokaia, Z., Airaksinen, M. S., Voipio, J., Kaila, K., & Saarma, M. (2002). BDNF-induced TrkB activation down-regulates the K+–Cl− cotransporter KCC2 and impairs neuronal Cl− extrusion. *The Journal of Cell Biology*, *159*(5), 747-752. https://doi.org/10.1083/jcb.200209011

Rivera, C., Voipio, J., & Kaila, K. (2005). Two developmental switches in GABAergic signalling : The K^+ –Cl^- cotransporter KCC2 and carbonic anhydrase CAVII. *The Journal of Physiology*, *562*(1), 27-36. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.077495

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*(6716), Article 6716. https://doi.org/10.1038/16697

Rivera, C., Voipio, J., Thomas-Crusells, J., Li, H., Emri, Z., Sipilä, S., Payne, J. A., Minichiello, L., Saarma, M., & Kaila, K. (2004). Mechanism of Activity-Dependent Downregulation of the Neuron-Specific K-Cl Cotransporter KCC2. *The Journal of Neuroscience*, *24*(19), Article 19. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5265-03.2004

Roberts, D. S., Hu, Y., Lund, I. V., Brooks-Kayal, A. R., & Russek, S. J. (2006). Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF)-induced Synthesis of Early Growth Response Factor 3 (Egr3) Controls the Levels of Type A GABA Receptorα4 Subunits in Hippocampal Neurons. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(40), 29431-29435. https://doi.org/10.1074/jbc.C600167200

Rodríguez-Matellán, A., Avila, J., & Hernández, F. (2020). Overexpression of GSK-3β in Adult Tet-OFF GSK-3β Transgenic Mice, and Not During Embryonic or Postnatal Development, Induces Tau Phosphorylation, Neurodegeneration and Learning Deficits. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *13*, 561470. https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.561470

Roussa, E., Speer, J. M., 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-β2. *Journal of Cell Science*, *129*(18), 3485-3498. https://doi.org/10.1242/jcs.189860

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. *Journal of Clinical Investigation*, *117*(6), 1708-1717. https://doi.org/10.1172/JCI30630

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. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.03.001

Saito, N., & Shirai, Y. (2002). Protein kinase C gamma (PKC gamma) : Function of neuron specific isotype. *Journal of Biochemistry*, *132*(5), 683-687. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003274

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. *Scientific Reports*, *6*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/srep30072

Sallinen, R., Tornberg, J., Putkiranta, M., Horelli-Kuitunen, N., Airaksinen, M. S., & Wessman, M. (2001). Chromosomal localization of SLC12A5/*Slc12a5*, the human and mouse genes for the neuron-specific K^+-Cl^- cotransporter (KCC2) defines a new region of conserved homology. *Cytogenetic and Genome Research*, *94*(1-2), 67-70. https://doi.org/10.1159/000048785

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., & Zuberi, S. M. (2017). ILAE classification of the epilepsies : Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, *58*(4), 512-521. https://doi.org/10.1111/epi.13709

Schirò, G., Iacono, S., Ragonese, P., Aridon, P., Salemi, G., & Balistreri, C. R. (2022). A Brief Overview on BDNF-Trk Pathway in the Nervous System : A Potential Biomarker or Possible Target in Treatment of Multiple Sclerosis? *Frontiers in Neurology*, *13*, 917527. https://doi.org/10.3389/fneur.2022.917527

Schmidt, T., Ghaffarian, N., Philippot, C., Seifert, G., Steinhäuser, C., Pape, H.-C., & Blaesse, P. (2018). Differential regulation of chloride homeostasis and GABAergic transmission in the thalamus. *Scientific Reports*, *8*(1), 13929. https://doi.org/10.1038/s41598-018-31762-2

Schoch, S., Cibelli, G., & Thiel, G. (1996). Neuron-specific Gene Expression of Synapsin I. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(6), 3317-3323. https://doi.org/10.1074/jbc.271.6.3317

Schoenherr, C. J., & Anderson, D. J. (1995). The Neuron-Restrictive Silencer Factor (NRSF) : A Coordinate Repressor of Multiple Neuron-Specific Genes. *Science*, *267*(5202), 1360-1363. https://doi.org/10.1126/science.7871435

Schroer, J., Warm, D., De Rosa, F., Luhmann, H. J., & Sinning, A. (2023). Activity-dependent regulation of the BAX/BCL-2 pathway protects cortical neurons from apoptotic death during early development. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *80*(6), 175. https://doi.org/10.1007/s00018-023-04824-6

Scotti, A. L., & Herrmann, G. (2002). Reelin immunoreactivity in dissociated cultures of the postnatal hippocampus. *Brain Research*, *924*(2), 209-218. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)03236-X

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. *Cerebral Cortex*, *26*(12), 4574-4589. https://doi.org/10.1093/cercor/bhv218

Sharma, S., Puttachary, S., Thippeswamy, A., Kanthasamy, A. G., & Thippeswamy, T. (2018). Status Epilepticus : Behavioral and Electroencephalography Seizure Correlates in Kainate Experimental Models. *Frontiers in Neurology*, *9*, 7. https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00007

Shekarabi, M., Girard, N., Rivière, J.-B., Dion, P., Houle, M., Toulouse, A., Lafrenière, R. G., Vercauteren, F., Hince, P., Laganiere, J., Rochefort, D., Faivre, L., Samuels, M., & Rouleau, G. A. (2008). Mutations in the nervous system–specific HSN2 exon of WNK1 cause hereditary sensory neuropathy type II. *Journal of Clinical Investigation*, JCI34088. https://doi.org/10.1172/JCI34088

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 Research*, *1374*, 15-26. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.12.010

Shen, L., Liang, F., Walensky, L. D., & Huganir, R. L. (2000). Regulation of AMPA Receptor GluR1 Subunit Surface Expression by a 4.1N-Linked Actin Cytoskeletal Association. *The Journal of Neuroscience*, *20*(21), 7932-7940. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-21-07932.2000

Shih, P.-Y., Savtchenko, L. P., Kamasawa, N., Dembitskaya, Y., McHugh, T. J., Rusakov, D. A., Shigemoto, R., & Semyanov, A. (2013). Retrograde Synaptic Signaling Mediated by K+ Efflux through Postsynaptic NMDA Receptors. *Cell Reports*, *5*(4), 941-951. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.026

Shipkov, D., Vinokurova, D., Tukhvatullina, K., & Valeeva, G. (2026). Pharmacological Profile of Early Sharp Waves in the Neonatal Rat Hippocampus. *Hippocampus*, *36*(3), e70098. https://doi.org/10.1002/hipo.70098

Sieghart, W., & Sperk, G. (2002). Subunit Composition, Distribution and Function of GABA-A Receptor Subtypes. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, *2*(8), 795-816. https://doi.org/10.2174/1568026023393507

Sigel, E., & Steinmann, M. E. (2012). Structure, Function, and Modulation of GABAA Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(48), 40224-40231. https://doi.org/10.1074/jbc.R112.386664

Silayeva, L., Deeb, T. Z., Hines, R. M., Kelley, M. R., Munoz, M. B., Lee, H. H. C., Brandon, N. J., Dunlop, J., Maguire, J., Davies, P. A., & Moss, S. J. (2015). KCC2 activity is critical in limiting the onset and severity of status epilepticus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(11), 3523-3528. https://doi.org/10.1073/pnas.1415126112

Simard, C. F., Bergeron, M. J., Frenette-Cotton, R., Carpentier, G. A., Pelchat, M.-E., Caron, L., & Isenring, P. (2007). Homooligomeric and Heterooligomeric Associations between K+-Cl– Cotransporter Isoforms and between K+-Cl– and Na+-K+-Cl– Cotransporters. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(25), 18083-18093. https://doi.org/10.1074/jbc.M607811200

Simonnet, C., Sinha, M., Goutierre, M., Moutkine, I., Daumas, S., & Poncer, J. C. (2023). Silencing KCC2 in mouse dorsal hippocampus compromises spatial and contextual memory. *Neuropsychopharmacology*, *48*(7), 1067-1077. https://doi.org/10.1038/s41386-022-01480-5

Singh, R., Letai, A., & Sarosiek, K. (2019). Regulation of apoptosis in health and disease : The balancing act of BCL-2 family proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *20*(3), 175-193. https://doi.org/10.1038/s41580-018-0089-8

Sipilä, S. T., Huttu, K., Yamada, J., Afzalov, R., Voipio, J., Blaesse, P., & Kaila, K. (2009). Compensatory Enhancement of Intrinsic Spiking upon NKCC1 Disruption in Neonatal Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, *29*(21), 6982-6988. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0443-09.2009

Sivakumaran, S., & Maguire, J. (2016). Bumetanide reduces seizure progression and the development of pharmacoresistant status epilepticus. *Epilepsia*, *57*(2), 222-232. https://doi.org/10.1111/epi.13270

Song, L., Mercado, A., Vázquez, N., Xie, Q., Desai, R., George, A. L., Gamba, G., & Mount, D. B. (2002). Molecular, functional, and genomic characterization of human KCC2, the neuronal K–Cl cotransporter. *Molecular Brain Research*, *103*(1-2), 91-105. https://doi.org/10.1016/S0169-328X(02)00190-0

Stafstrom, C. E., & Carmant, L. (2015). Seizures and Epilepsy : An Overview for Neuroscientists. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *5*(6), a022426-a022426. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022426

Staley, K. J., & Mody, I. (1992). Shunting of excitatory input to dentate gyrus granule cells by a depolarizing GABAA receptor-mediated postsynaptic conductance. *Journal of Neurophysiology*, *68*(1), 197-212. https://doi.org/10.1152/jn.1992.68.1.197

Stein, V., Hermans-Borgmeyer, I., Jentsch, T. J., & Hübner, C. A. (2004). Expression of the KCl cotransporter KCC2 parallels neuronal maturation and the emergence of low intracellular chloride. *Journal of Comparative Neurology*, *468*(1), Article 1. https://doi.org/10.1002/cne.10983

Stil, A., Liabeuf, S., Jean-Xavier, C., Brocard, C., Viemari, J.-C., & Vinay, L. (2009). Developmental up-regulation of the potassium–chloride cotransporter type 2 in the rat lumbar spinal cord. *Neuroscience*, *164*(2), 809-821. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.08.035

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., … Kurian, M. A. (2015). Mutations in SLC12A5 in epilepsy of infancy with migrating focal seizures. *Nature Communications*, *6*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/ncomms9038

Su, G., Kintner, D. B., Flagella, M., Shull, G. E., & Sun, D. (2002). Astrocytes from Na^+ -K^+ -Cl^- cotransporter-null mice exhibit absence of swelling and decrease in EAA release. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *282*(5), C1147-C1160. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00538.2001

Su, X.-J., Shen, B.-D., Wang, K., Song, Q.-X., Yang, X., Wu, D.-S., Shen, H.-X., & Zhu, C. (2022). Roles of the Neuron-Restrictive Silencer Factor in the Pathophysiological Process of the Central Nervous System. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *10*, 834620. https://doi.org/10.3389/fcell.2022.834620

Su, X.-T., Klett, N. J., Sharma, A., Allen, C. N., Wang, W.-H., Yang, C.-L., & Ellison, D. H. (2020). Distal convoluted tubule Cl^- concentration is modulated via K^+ channels and transporters. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, *319*(3), F534-F540. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00284.2020

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. *Science Signaling*, *14*(708), eabg2648. https://doi.org/10.1126/scisignal.abg2648

Sun, R., Zhao, K., Shen, R., Cai, L., Yang, X., Kuang, Y., Mao, J., Huang, F., Wang, Z., & Fei, J. (2012). Inducible and reversible regulation of endogenous gene in mouse. *Nucleic Acids Research*, *40*(21), e166-e166. https://doi.org/10.1093/nar/gks738

Sun, W., Cheng, H., Yang, Y., Tang, D., Li, X., & An, L. (2021). Requirements of Postnatal proBDNF in the Hippocampus for Spatial Memory Consolidation and Neural Function. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*, 678182. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.678182

Sweeney, N. P., & Vink, C. A. (2021). The impact of lentiviral vector genome size and producer cell genomic to gag-pol mRNA ratios on packaging efficiency and titre. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, *21*, 574-584. https://doi.org/10.1016/j.omtm.2021.04.007

Szabadits, E., Cserép, C., Szőnyi, A., Fukazawa, Y., Shigemoto, R., Watanabe, M., Itohara, S., Freund, T. F., & Nyiri, G. (2011). NMDA Receptors in Hippocampal GABAergic Synapses and Their Role in Nitric Oxide Signaling. *The Journal of Neuroscience*, *31*(16), 5893-5904. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5938-10.2011

Szrinivasan, R., Trontti, K., Mathieu, R., Draia-Nicolau, T., Chazal, G., Loukasmäki, S., Bodington Celma, S., Achim, K., Uvarov, P., Khirug, S., Ludwig, A., Lauri, S. E., De Chevigny, A., Pietiläinen, O., & Rivera, C. (2025). Functional KCC2 expression marks an evolutionarily conserved population of early-maturing interneurons in the perinatal cortex. *Nature Communications*, *17*(1), 574. https://doi.org/10.1038/s41467-025-67270-x

T. Das, A., Tenenbaum, L., & Berkhout, B. (2016). Tet-On Systems For Doxycycline-inducible Gene Expression. *Current Gene Therapy*, *16*(3), 156-167. https://doi.org/10.2174/1566523216666160524144041

Tai, H.-C., & Schuman, E. M. (2008). Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction. *Nature Reviews Neuroscience*, *9*(11), 826-838. https://doi.org/10.1038/nrn2499

Takahashi, S., Kubo, K., Waguri, S., Yabashi, A., Shin, H.-W., Katoh, Y., & Nakayama, K. (2012). Rab11 regulates exocytosis of recycling vesicles at the plasma membrane. *Journal of Cell Science*, jcs.102913. https://doi.org/10.1242/jcs.102913

Takayama, C., & Inoue, Y. (2010). Developmental localization of potassium chloride co-transporter 2 (KCC2), GABA and vesicular GABA transporter (VGAT) in the postnatal mouse somatosensory cortex. *Neuroscience Research*, *67*(2), 137-148. https://doi.org/10.1016/j.neures.2010.02.010

Tan, C.-Y., Wang, Y.-P., Han, Y.-Y., Lu, B.-H., Ji, W., Zhu, L.-C., Wang, Y., Shi, W.-Y., Shan, L.-Y., Zhang, L., Ma, K.-T., Li, L., & Si, J.-Q. (2020). Expression and effect of sodium-potassium-chloride cotransporter on dorsal root ganglion neurons in a rat model of chronic constriction injury. *Neural Regeneration Research*, *15*(5), 912. https://doi.org/10.4103/1673-5374.268904

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. *Science Translational Medicine*, *11*(503), eaau0164. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aau0164

Thomaidou, D., Mione, M. C., Cavanagh, J. F. R., & Parnavelas, J. G. (1997). Apoptosis and Its Relation to the Cell Cycle in the Developing Cerebral Cortex. *The Journal of Neuroscience*, *17*(3), 1075-1085. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-03-01075.1997

Thomas, B. A. I., Lewis, H. L., Jones, D. H., & Ward, S. E. (2023). Central Nervous System Targeted Protein Degraders. *Biomolecules*, *13*(8), 1164. https://doi.org/10.3390/biom13081164

Thompson, S. M., & Gahwiler, B. H. (1989). Activity-dependent disinhibition. II. Effects of extracellular potassium, furosemide, and membrane potential on ECl- in hippocampal CA3 neurons. *Journal of Neurophysiology*, *61*(3), 512-523. https://doi.org/10.1152/jn.1989.61.3.512

Thottacherry, J. J., Sathe, M., Prabhakara, C., & Mayor, S. (2019). Spoiled for Choice : Diverse Endocytic Pathways Function at the Cell Surface. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *35*(1), 55-84. https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100617-062710

Tissir, F., Ravni, A., Achouri, Y., Riethmacher, D., Meyer, G., & Goffinet, A. M. (2009). DeltaNp73 regulates neuronal survival in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(39), Article 39. https://doi.org/10.1073/pnas.0903191106

Titz, S., Hans, M., Kelsch, W., Lewen, A., Swandulla, D., & Misgeld, U. (2003). Hyperpolarizing Inhibition Develops without Trophic support by GABA in Cultured Rat Midbrain Neurons. *The Journal of Physiology*, *550*(3), 719-730. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.041863

Tochitani, S. (2017). Functions of Maternally-Derived Taurine in Fetal and Neonatal Brain Development. In D.-H. Lee, S. W. Schaffer, E. Park, & H. W. Kim (Éds.), *Taurine 10* (Vol. 975, p. 17-25). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-024-1079-2_2

Tomita, T., Huibregtse, J. M., & Matouschek, A. (2020). A masked initiation region in retinoblastoma protein regulates its proteasomal degradation. *Nature Communications*, *11*(1), 2019. https://doi.org/10.1038/s41467-020-16003-3

Toth, K., Eross, L., Vajda, J., Halasz, P., Freund, T. F., & Magloczky, Z. (2010). Loss and reorganization of calretinin-containing interneurons in the epileptic human hippocampus. *Brain*, *133*(9), 2763-2777. https://doi.org/10.1093/brain/awq149

Toyoda, H., Yamada, J., Ueno, S., Okabe, A., Kato, H., Sato, K., Hashimoto, K., & Fukuda, A. (2005). Differential functional expression of cation–Cl− cotransporter mRNAs (KCC1, KCC2, and NKCC1) in rat trigeminal nervous system. *Molecular Brain Research*, *133*(1), 12-18. https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2004.09.015

Tramontin, A. D. (2003). Postnatal Development of Radial Glia and the Ventricular Zone (VZ) : A Continuum of the Neural Stem Cell Compartment. *Cerebral Cortex*, *13*(6), 580-587. https://doi.org/10.1093/cercor/13.6.580

Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., Hansen, K. B., Yuan, H., Myers, S. J., & Dingledine, R. (2010). Glutamate Receptor Ion Channels : Structure, Regulation, and Function. *Pharmacological Reviews*, *62*(3), 405-496. https://doi.org/10.1124/pr.109.002451

Triller, A., & Choquet, D. (2005). Surface trafficking of receptors between synaptic and extrasynaptic membranes : And yet they do move! *Trends in Neurosciences*, *28*(3), 133-139. https://doi.org/10.1016/j.tins.2005.01.001

Trinka, E., Cock, H., Hesdorffer, D., Rossetti, A. O., Scheffer, I. E., Shinnar, S., Shorvon, S., & Lowenstein, D. H. (2015). A definition and classification of status epilepticus – Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. *Epilepsia*, *56*(10), 1515-1523. https://doi.org/10.1111/epi.13121

Tyurikova, O., Shih, P., Dembitskaya, Y., Savtchenko, L. P., McHugh, T. J., Rusakov, D. A., & Semyanov, A. (2022). K^+ efflux through postsynaptic NMDA receptors suppresses local astrocytic glutamate uptake. *Glia*, *70*(5), 961-974. https://doi.org/10.1002/glia.24150

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*(5806), 1788-1792. https://doi.org/10.1126/science.1133212

Tyzio, R., Holmes, G. L., Ben-Ari, Y., & Khazipov, R. (2007). Timing of the Developmental Switch in $GABA_A$ Mediated Signaling from Excitation to Inhibition in CA3 Rat Hippocampus Using Gramicidin Perforated Patch and Extracellular Recordings. *Epilepsia*, *48*(s5), 96-105. https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01295.x

Tyzio, R., Minlebaev, M., Rheims, S., Ivanov, A., Jorquera, I., Holmes, G. L., Zilberter, Y., Ben-Ari, Y., & Khazipov, R. (2008). Postnatal changes in somatic γ-aminobutyric acid signalling in the rat hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, *27*(10), 2515-2528. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06234.x

Tyzio, R., Represa, A., Jorquera, I., Ben-Ari, Y., Gozlan, H., & Aniksztejn, L. (1999). The Establishment of GABAergic and Glutamatergic Synapses on CA1 Pyramidal Neurons is Sequential and Correlates with the Development of the Apical Dendrite. *The Journal of Neuroscience*, *19*(23), 10372-10382. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-23-10372.1999

Urbinati, F., Arumugam, P., Higashimoto, T., Perumbeti, A., Mitts, K., Xia, P., & Malik, P. (2009). Mechanism of Reduction in Titers From Lentivirus Vectors Carrying Large Inserts in the 3′LTR. *Molecular Therapy*, *17*(9), 1527-1536. https://doi.org/10.1038/mt.2009.89

Usachev, Y. M., Marsh, A. J., Johanns, T. M., Lemke, M. M., & Thayer, S. A. (2006). Activation of Protein Kinase C in Sensory Neurons Accelerates Ca^{2+} Uptake into the Endoplasmic Reticulum. *The Journal of Neuroscience*, *26*(1), 311-318. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2920-05.2006

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. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(42), Article 42. https://doi.org/10.1074/jbc.M705095200

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. *The Journal of Neuroscience*, *26*(52), 13463-13473. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4731-06.2006

Uvarov, P., Ludwig, A., Markkanen, M., Soni, S., Hübner, C. A., Rivera, C., & Airaksinen, M. S. (2009). Coexpression and Heteromerization of Two Neuronal K-Cl Cotransporter Isoforms in Neonatal Brain. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(20), Article 20. https://doi.org/10.1074/jbc.M807366200

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. *Journal of Neurochemistry*, *95*(4), 1144-1155. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03434.x

Vaccarino, F. M., Liljequist, S., & Tallman, J. F. (1991). Modulation of Protein Kinase C Translocation by Excitatory and Inhibitory Amino Acids in Primary Cultures of Neurons. *Journal of Neurochemistry*, *57*(2), 391-396. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1991.tb03765.x

Vale, C., Caminos, E., Martinez-Galán, J. R., & Juiz, J. M. (2005). Expression and developmental regulation of the K+–Cl− cotransporter KCC2 in the cochlear nucleus. *Hearing Research*, *206*(1-2), 107-115. https://doi.org/10.1016/j.heares.2005.03.012

Valeeva, G., Tressard, T., Mukhtarov, M., Baude, A., & Khazipov, R. (2016). An Optogenetic Approach for Investigation of Excitatory and Inhibitory Network GABA Actions in Mice Expressing Channelrhodopsin-2 in GABAergic Neurons. *The Journal of Neuroscience*, *36*(22), 5961-5973. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3482-15.2016

Valeeva, G., Valiullina, F., & Khazipov, R. (2013). Excitatory actions of GABA in the intact neonatal rodent hippocampus in vitro. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *7*. https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00020

van Bruggen, R., Patel, Z. H., Wang, M., Suk, T. R., Rousseaux, M. W. C., & Tan, Q. (2023). A Versatile Strategy for Genetic Manipulation of Cajal-Retzius Cells in the Adult Mouse Hippocampus. *Eneuro*, ENEURO.0054-23.2023. https://doi.org/10.1523/ENEURO.0054-23.2023

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. *The Journal of Neuroscience*, *20*(20), 7657-7663. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-20-07657.2000

Vibat, C. R. T., Holland, M. J., Kang, J. J., Putney, L. K., & O'Donnell, M. E. (2001). Quantitation of Na+-K+-2Cl− Cotransport Splice Variants in Human Tissues Using Kinetic Polymerase Chain Reaction. *Analytical Biochemistry*, *298*(2), 218-230. https://doi.org/10.1006/abio.2001.5398

Vílchez-Acosta, A., Manso, Y., Cárdenas, A., Elias-Tersa, A., Martínez-Losa, M., Pascual, M., Álvarez-Dolado, M., Nairn, A. C., Borrell, V., & Soriano, E. (2022). Specific contribution of Reelin expressed by Cajal–Retzius cells or GABAergic interneurons to cortical lamination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *119*(37), Article 37. https://doi.org/10.1073/pnas.2120079119

Viola, V., Chinnappa, K., & Francis, F. (2024). Radial glia progenitor polarity in health and disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *12*, 1478283. https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1478283

Vitari, A. C., Deak, M., Morrice, N. A., & Alessi, D. R. (2005). The WNK1 and WNK4 protein kinases that are mutated in Gordon's hypertension syndrome phosphorylate and activate SPAK and OSR1 protein kinases. *Biochemical Journal*, *391*(1), 17-24. https://doi.org/10.1042/BJ20051180

Wake, H., Watanabe, M., Moorhouse, A. J., Kanematsu, T., Horibe, S., Matsukawa, N., Asai, K., Ojika, K., Hirata, M., & Nabekura, J. (2007). Early Changes in KCC2 Phosphorylation in Response to Neuronal Stress Result in Functional Downregulation. *The Journal of Neuroscience*, *27*(7), 1642-1650. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3104-06.2007

Wang, D. D., & Kriegstein, A. R. (2008). GABA Regulates Excitatory Synapse Formation in the Neocortex via NMDA Receptor Activation. *The Journal of Neuroscience*, *28*(21), 5547-5558. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5599-07.2008

Wang, D. D., & Kriegstein, A. R. (2011). Blocking Early GABA Depolarization with Bumetanide Results in Permanent Alterations in Cortical Circuits and Sensorimotor Gating Deficits. *Cerebral Cortex*, *21*(3), 574-587. https://doi.org/10.1093/cercor/bhq124

Wang, M.-Y., Liu, W.-J., Wu, L.-Y., Wang, G., Zhang, C.-L., & Liu, J. (2023). The Research Progress in Transforming Growth Factor-β2. *Cells*, *12*(23), 2739. https://doi.org/10.3390/cells12232739

Wang, W., Gong, N., & Xu, T.-L. (2006). Downregulation of KCC2 following LTP contributes to EPSP–spike potentiation in rat hippocampus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *343*(4), 1209-1215. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.03.038

Warm, D., Schroer, J., & Sinning, A. (2022). Gabaergic Interneurons in Early Brain Development : Conducting and Orchestrated by Cortical Network Activity. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *14*, 807969. https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.807969

Watanabe, M., Wake, H., Moorhouse, A. J., & Nabekura, J. (2009). Clustering of Neuronal K+-Cl− Cotransporters in Lipid Rafts by Tyrosine Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(41), 27980-27988. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.043620

Watson, D. J., Passini, M. A., & Wolfe, J. H. (2005). Transduction of the Choroid Plexus and Ependyma in Neonatal Mouse Brain by Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein-Pseudotyped Lentivirus and Adeno-Associated Virus Type 5 Vectors. *Human Gene Therapy*, *16*(1), 49-56. https://doi.org/10.1089/hum.2005.16.49

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*♦. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(27), 18668-18679. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.567834

Wei, W., Akerman, C. J., Newey, S. E., Pan, J., Clinch, N. W. V., Jacob, Y., Shen, M., Wilkins, R. J., & Ellory, J. C. (2011). The potassium–chloride cotransporter 2 promotes cervical cancer cell migration and invasion by an ion transport-independent mechanism. *The Journal of Physiology*, *589*(22), Article 22. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.214635

Weilinger, N. L., Wicki-Stordeur, L. E., Groten, C. J., LeDue, J. M., Kahle, K. T., & MacVicar, B. A. (2022). KCC2 drives chloride microdomain formation in dendritic blebbing. *Cell Reports*, *41*(4), 111556. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111556

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. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1833*(5), 1133-1146. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.01.018

Wentworth, L. E. (1984). The development of the cervical spinal cord of the mouse embryo. I. A Golgi analysis of ventral root neuron differentiation. *Journal of Comparative Neurology*, *222*(1), 81-95. https://doi.org/10.1002/cne.902220108

Wenz, M., Hartmann, A.-M., Friauf, E., & Nothwang, H. G. (2009). CIP1 is an activator of the K+–Cl− cotransporter KCC2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *381*(3), 388-392. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.02.057

White, F. A., Keller-Peck, C. R., Knudson, C. M., Korsmeyer, S. J., & Snider, W. D. (1998). Widespread elimination of naturally occurring neuronal death in Bax-deficient mice. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *18*(4), 1428-1439. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-04-01428.1998

Williams, J. R., & Payne, J. A. (2004). Cation transport by the neuronal K^+ -Cl^- cotransporter KCC2 : Thermodynamics and kinetics of alternate transport modes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *287*(4), C919-C931. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00005.2004

Williams, J. R., Sharp, J. W., Kumari, V. G., Wilson, M., & Payne, J. A. (1999). The Neuron-specific K-Cl Cotransporter, KCC2. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(18), 12656-12664. https://doi.org/10.1074/jbc.274.18.12656

Wonders, C. P., & Anderson, S. A. (2006). The origin and specification of cortical interneurons. *Nature Reviews Neuroscience*, *7*(9), 687-696. https://doi.org/10.1038/nrn1954

Wong, F. K., & Marín, O. (2019). Developmental Cell Death in the Cerebral Cortex. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *35*(1), 523-542. https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100818-125204

Woo, N., Lu, J., England, R., McClellan, R., Dufour, S., Mount, D. B., Deutch, A. Y., Lovinger, D. M., & Delpire, E. (2002). Hyperexcitability and epilepsy associated with disruption of the mouse neuronal-specific K–Cl cotransporter gene. *Hippocampus*, *12*(2), 258-268. https://doi.org/10.1002/hipo.10014

Wrana, J. L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., & Massagué, J. (1994). Mechanism of activation of the TGF-β receptor. *Nature*, *370*(6488), 341-347. https://doi.org/10.1038/370341a0

Wu, G.-Y., Malinow, R., & Cline, H. T. (1996). Maturation of a Central Glutamatergic Synapse. *Science*, *274*(5289), 972-976. https://doi.org/10.1126/science.274.5289.972

Wu, Z., Yang, H., & Colosi, P. (2010). Effect of Genome Size on AAV Vector Packaging. *Molecular Therapy*, *18*(1), 80-86. https://doi.org/10.1038/mt.2009.255

Xian, H., Guo, H., Liu, Y.-Y., Ma, S.-B., Zhao, R., Zhang, J.-L., Zhang, H., Xie, R.-G., Guo, X.-C., Ren, J., Wu, S.-X., Luo, C., & Cong, R. (2025). Nociceptor-localized KCC2 suppresses brachial plexus avulsion-induced neuropathic pain and related central sensitization. *Cell & Bioscience*, *15*(1), 12. https://doi.org/10.1186/s13578-025-01354-5

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. *Science Advances*, *6*(50), eabc5883. https://doi.org/10.1126/sciadv.abc5883

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. *The Journal of Physiology*, *557*(3), 829-841. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.062471

Yamashita, A., Singh, S. K., Kawate, T., Jin, Y., & Gouaux, E. (2005). Crystal structure of a bacterial homologue of Na+/Cl—Dependent neurotransmitter transporters. *Nature*, *437*(7056), 215-223. https://doi.org/10.1038/nature03978

Yang, J., Siao, C.-J., Nagappan, G., Marinic, T., Jing, D., McGrath, K., Chen, Z.-Y., Mark, W., Tessarollo, L., Lee, F. S., Lu, B., & Hempstead, B. L. (2009). Neuronal release of proBDNF. *Nature Neuroscience*, *12*(2), 113-115. https://doi.org/10.1038/nn.2244

Yang, N., Higuchi, O., Ohashi, K., Nagata, K., Wada, A., Kangawa, K., Nishida, E., & Mizuno, K. (1998). Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature*, *393*(6687), 809-812. https://doi.org/10.1038/31735

Yang, X., Wang, Q., & Cao, E. (2020). Structure of the human cation–chloride cotransporter NKCC1 determined by single-particle electron cryo-microscopy. *Nature Communications*, *11*(1), 1016. https://doi.org/10.1038/s41467-020-14790-3

Yeo, M., Berglund, K., Augustine, G., & Liedtke, W. (2009). Novel Repression of *Kcc2* Transcription by REST–RE-1 Controls Developmental Switch in Neuronal Chloride. *The Journal of Neuroscience*, *29*(46), 14652-14662. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2934-09.2009

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. (2021). Repurposing cancer drugs identifies kenpaullone which ameliorates pathologic pain in preclinical models via normalization of inhibitory neurotransmission. *Nature Communications*, *12*(1), 6208. https://doi.org/10.1038/s41467-021-26270-3

You, R., & Jia, Z. (2024). Pathophysiological role of Na–Cl cotransporter in kidneys, blood pressure, and metabolism. *Human Cell*, *37*(5), 1306-1315. https://doi.org/10.1007/s13577-024-01099-2

Yu, D., Ren, Y., Uesaka, M., Beavan, A. J. S., Muffato, M., Shen, J., Li, Y., Sato, I., Wan, W., Clark, J. W., Keating, J. N., Carlisle, E. M., Dearden, R. P., Giles, S., Randle, E., Sansom, R. S., Feuda, R., Fleming, J. F., Sugahara, F., … Pascual-Anaya, J. (2024). Hagfish genome elucidates vertebrate whole-genome duplication events and their evolutionary consequences. *Nature Ecology & Evolution*, *8*(3), 519-535. https://doi.org/10.1038/s41559-023-02299-z

Yu, H., Bai, X.-C., & Wang, W. (2021). Characterization of the subunit composition and structure of adult human glycine receptors. *Neuron*, *109*(17), 2707-2716.e6. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.08.019

Yuste, R., & Katz, L. C. (1991). Control of postsynaptic Ca2+ influx in developing neocortex by excitatory and inhibitory neurotransmitters. *Neuron*, *6*(3), 333-344. https://doi.org/10.1016/0896-6273(91)90243-S

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. *The Journal of Cell Biology*, *176*(1), 89-100. https://doi.org/10.1083/jcb.200605093

Zavalin, K., Hassan, A., Zhang, Y., Khera, Z., & Lagrange, A. H. (2024). Region and layer-specific expression of GABAA receptor isoforms and KCC2 in developing cortex. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *18*. https://doi.org/10.3389/fncel.2024.1390742

Zeuthen, T. (1994). Cotransport of K+, Cl- and H2O by membrane proteins from choroid plexus epithelium of Necturus maculosus. *The Journal of Physiology*, *478*(2), 203-219. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1994.sp020243

Zhang, D., Gopalakrishnan, S. M., Freiberg, G., & Surowy, C. S. (2010). A Thallium Transport FLIPR-Based Assay for the Identification of KCC2-Positive Modulators. *SLAS Discovery*, *15*(2), 177-184. https://doi.org/10.1177/1087057109355708

Zhang, H., Han, Y., Yang, Y., Lin, F., Li, K., Kong, L., Liu, H., Dang, Y., Lin, J., & Chen, P. R. (2021). Covalently Engineered Nanobody Chimeras for Targeted Membrane Protein Degradation. *Journal of the American Chemical Society*, *143*(40), 16377-16382. https://doi.org/10.1021/jacs.1c08521

Zhang, S. J., & Jackson, M. B. (1995). GABAA receptor activation and the excitability of nerve terminals in the rat posterior pituitary. *The Journal of Physiology*, *483*(3), 583-595. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1995.sp020608

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. (2021). The structural basis of function and regulation of neuronal cotransporters NKCC1 and KCC2. *Communications Biology*, *4*(1), 226. https://doi.org/10.1038/s42003-021-01750-w

Zhao, B., Wong, A. Y. C., Murshid, A., Bowie, D., Presley, J. F., & Bedford, F. K. (2008). Identification of a novel di-leucine motif mediating K+/Cl− cotransporter KCC2 constitutive endocytosis. *Cellular Signalling*, *20*(10), 1769-1779. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2008.06.011

Zhao, Y., Shen, J., Wang, Q., Ruiz Munevar, M. J., Vidossich, P., De Vivo, M., Zhou, M., & Cao, E. (2022). Structure of the human cation–chloride cotransport KCC1 in an outward-open state. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *119*(27), e2109083119. https://doi.org/10.1073/pnas.2109083119

Zhao, Y., Wang, H., Wu, P., Zhang, Y., Wang, Z., & Xu, W. (2025). Development of nanobody-based PROTAC (NbTAC) for ROR1 degradation by RNF149. *International Journal of Biological Macromolecules*, *319*, 145700. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.145700

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. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(40), 33853-33864. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.395830

Zhou, X., Vink, M., Klaver, B., Berkhout, B., & Das, A. T. (2006). Optimization of the Tet-On system for regulated gene expression through viral evolution. *Gene Therapy*, *13*(19), 1382-1390. https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302780

Zhu, H., & Gouaux, E. (2021). Architecture and assembly mechanism of native glycine receptors. *Nature*, *599*(7885), 513-517. https://doi.org/10.1038/s41586-021-04022-z

Zhu, P., Aller, M. I., Baron, U., Cambridge, S., Bausen, M., Herb, J., Sawinski, J., Cetin, A., Osten, P., Nelson, M. L., Kügler, S., Seeburg, P. H., Sprengel, R., & Hasan, M. T. (2007). Silencing and Un-silencing of Tetracycline-Controlled Genes in Neurons. *PLoS ONE*, *2*(6), e533. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000533

Zilberter, M. (2016). Reality of Inhibitory GABA in Neonatal Brain : Time to Rewrite the Textbooks? *The Journal of Neuroscience*, *36*(40), 10242-10244. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2270-16.2016