

École Pratique  
des Hautes Études



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE ÉCOLE  
PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES – PSL

Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

présenté par

*MILLE Clémence*

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études – PSL

**Régulation des synapses inhibitrices explorée par  
différentes modalités d'imagerie super-résolutive**

Soutenu le 12 décembre 2023

devant le jury suivant :

*Dr. Mireille ROSSEL* – Présidente

*Dr. Christian SPECHT* – Tuteur scientifique

*Dr. Sylvie DEMIGNOT* – Tutrice pédagogique

*Pr. Anne ROUMIER* – Rapportrice

*Dr. Ignacio IZEDDIN* – Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

*Dr. Christian SPECHT*

INSERM Unité 1195 – Maladies et Hormones du Système Nerveux – Le Kremlin-Bicêtre

Directeur : *Pr. Michael SCHUMACHER*

et de

*Dr. Sylvie DEMIGNOT*

Centre de Recherche Saint-Antoine, UMRS 938 - Equipe Microbiote, Intestin,

Inflammation

EPHE-PSL (Sciences de la Vie et de la Terre)

## Remerciements

Je remercie en premier lieu le Professeur Pierre Bougnères qui m'a encouragée à me lancer dans la poursuite de mes études, en me proposant de suivre ce programme diplômant. Merci au Professeur Mickael Schumacher d'avoir accepté de me soutenir en me permettant de continuer ce projet au sein de son unité.

Je remercie chaleureusement ma tutrice pédagogique, Sylvie Demignot, vous m'avez témoigné de la bienveillance, notamment en soutenant mes inscriptions et dérogations qui m'ont permis de finalement terminer le diplôme.

Merci beaucoup aux membres du jury d'avoir accepté de me consacrer du temps et de l'expertise pour évaluer mon travail.

Le chemin pour arriver à finalement soutenir mon mémoire n'a pas été sans détours, j'ai multiplié les projets et les collaborations avec différents chercheurs au sein de l'unité : Delphine Fradin, Catherine Le Stunff et Shixin Ye Lehmann, je tiens à vous marquer ma reconnaissance pour tout ce que j'ai pu apprendre à vos côtés.

Et c'est finalement à Christian Specht, alors que je pensais ne plus trouver l'opportunité de finaliser mon diplôme, que je dois l'achèvement de ce mémoire. Tu as accepté de m'accompagner dans ce projet avec tant d'enthousiasme, et d'implication que je mesure entièrement la chance que cela a été de t'avoir comme tuteur scientifique. Tu m'as formée à des techniques et des thématiques que je découvrais, tout en me faisant confiance et surtout en me transmettant avec passion ton savoir, sans jamais compter ton temps. Merci pour toute cette générosité, merci pour tout.

Christine, Marie-Pierre et Sophie, vous êtes à mes côtés depuis mon arrivée au sein de l'unité, mes si précieuses collègues. Merci d'avoir toujours été en soutien lors des coups de mou, pour votre aide durant ce petit marathon d'écriture. Je pense aussi aux dizaines et dizaines de petites douceurs partagées, votre départ va laisser un immense vide dans mon estomac, mais également dans mon petit cœur...

Je n'oublie pas Yann, Mariama, Boris et Malha, vous m'avez tous bien aidé merci.

Pour finir, un petit mot à ma famille et belle famille, vos encouragements ou même relectures m'ont fait chaud au cœur.

Et bien sûr tout cela n'aurait pas été possible sans le soutien logistique et moral de mon cher Olivier, à qui je dédicace ce travail, tu as été d'une patience hors pair. A toi aussi mon tout petit Félix.

# Sommaire

<b>Abréviations .....</b>	<b>6</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>7</b>
<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>8</b>
<b>Avant-propos .....</b>	<b>9</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>10</b>
<b>I –Neurobiologie des synapses inhibitrices.....</b>	<b>10</b>
1. Les synapses .....	10
2. Les synapses inhibitrices.....	11
3. Les récepteurs du GABA de type A.....	13
4. Les neurostéroïdes .....	14
5. Récepteurs de la glycine.....	16
<b>II - Les méthodes microscopiques utilisées.....</b>	<b>18</b>
1. Notion de microscopie photonique à fluorescence. ....	18
2. Microscopie confocale.....	20
3. Microscopie super résolutive .....	22
3.1.Le mode Structured Illumination Microscopy (SIM).....	22
3.2. Les méthodes PALM et STORM : Principe de la microscopie à molécule unique (SMLM) ...	24
<b>Matériels et Méthodes.....</b>	<b>27</b>
<b>I-Production des lentivirus exprimant des sous-unités du GABA<sub>A</sub>R, couplées à mEos4b...</b>	<b>28</b>
1-Clonage .....	28
1.1 Amplification PCR .....	29
1.2 Digestion.....	29
1.3 Déphosphorylation .....	30
1.4 Purification des bandes d'intérêt .....	30
1.5 Ligation .....	30
1.6 Transformation .....	30
1.7 Extraction d'ADN plasmidique.....	31
2. Production de lentivirus .....	31

<b>II - Culture primaire d'hippocampe de souris.....</b>	<b>33</b>
<b>III – Observation des neurones en culture.....</b>	<b>34</b>
1 . Immunomarquage des neurones en culture .....	34
2- Condition d'imagerie classique des neurones.....	35
<b>IV– Conditions d'analyse PALM des moelles épinières.....</b>	<b>35</b>
1. Préparation des moelles épinières pour la microscopie PALM .....	35
2. Réglage du microscope pour l'imagerie PALM .....	36
3. Paramètres d'acquisition des moelles en mode PALM .....	37
4. Analyse des images PALM .....	37
5. Analyses statistiques .....	38
<b>V - Conditions des analyses SIM.....</b>	<b>38</b>
1. Immunomarquages des coupes de cerveaux .....	38
2. Paramètres d'acquisition de la microscopie à illumination structurée (SIM) .....	39
<b>Résultats.....</b>	<b>41</b>
<b>I. Etude de l'effet des neurostéroïdes sur les récepteurs du GABA .....</b>	<b>42</b>
1. Détection des GABA <sub>A</sub> R synaptiques et extra-synaptiques .....	42
2. Effet des neurostéroïdes .....	45
3. Interprétation et discussion des résultats :.....	52
3.1 modèle cellulaire .....	52
3.2 Caractérisation des taux de neurostéroïdes.....	53
3.3 Phosphorylation de la géphyrine .....	54
3.4 comparaison des résultats avec ceux de la littérature sur les effets des benzodiazépines ..	55
<b>II. Analyse super-résolutive de la sous-unité GlyR<math>\beta</math> dans la maladie de l'Hyperekplexie. .</b>	<b>57</b>
1. Contexte .....	57
2. Résultats .....	59
2.1 Microscopie PALM.....	59
2.2. Interprétation et discussion des résultats .....	63
2.3 - Considérations techniques des acquisitions PALM .....	64
2.3.1. Clignotement non –spécifique.....	64
2.3.2. Signal faible.....	67
2.3.3. Conditions d'acquisition .....	70
2.3.4. Correction du drift .....	70
<b>III - Microscopie à illumination structurée (SIM).....</b>	<b>72</b>
1-Contexte biologique.....	72
2-résultats .....	76

3 -Discussion.....	77
<b>Conclusion .....</b>	<b>78</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>80</b>
<b>Annexe .....</b>	<b>85</b>
<b>Résumé.....</b>	<b>113</b>

## Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique  
AF : Alexa Fluor  
ALLO : Allopregnanolone  
BSA : Bovine serum albumin  
BZD : Benzodiazépine  
DMSO : Diméthylsulfoxyde  
dNTP : Désoxyribonucléotide triphosphate  
EMCCD : Electron Multiplying Charge Coupled Device  
GABA : Acide gamma-aminobutyrique  
GABAAR : Récepteur du GABA de type A  
Gly : Glycine  
GlyR : Récepteur de la glycine  
HEK : Human embryonic kidney  
INN : Isoallopregnanolone  
LB : Lysogeny broth  
NA : Numerical aperture  
NAM : Negative allosteric modulator  
NAS : Neuro Active Steroids  
PALM : PhotoActivated Localization Microscopy  
PAM : Positive allostérique positif  
PBS : Phosphate buffer saline  
PCR : Polymerase chain reaction  
PFA : Paraformaldéhyde  
sCMOS : scientific complementary metal-oxide semiconductor  
SIA : Segment initial axonal  
SIM : Structured Illuminated Microscopy  
SMLM : Single Molecule Localization Microscopy  
SNC : Système nerveux central  
STORM : Stochastic Optical Reconstruction Microscopy  
TTX : Tétrodotoxine  
UV : Ultra Violet

## Liste des figures

<b>FIGURE 1</b> : SCHEMA DE LA STRUCTURE DE BASE DES RECEPTEURS DU GABA ET DE LA GLYCINE. ....	12
<b>FIGURE 2</b> : SCHEMA REPRESENTANT L'ORGANISATION DES SYNAPSES INHIBITRICES.....	13
<b>FIGURE 3</b> : BIOSYNTHESE DE L'ALLOPREGNANOLONE ET SON STEREOISOMERE ISOALLOPREGNANOLONE .....	16
<b>FIGURE 4</b> : SPECTRES D'EXCITATION ET D'EMISSION DE 3 FLUOROCHROMES.....	18
<b>FIGURE 5</b> : SCHEMA SIMPLIFIE D'UN MICROSCOPE A EPIFLUORESCENCE.....	19
<b>FIGURE 6</b> : REPRESENTATION DU PHENOMENE DES DISQUES D'AIRY ET DE LA LIMITE DE RESOLUTION.....	20
<b>FIGURE 7</b> : COMPOSANTES D'UNE IMAGE EN TERMES DE BASSES ET HAUTES FREQUENCES. ....	22
<b>FIGURE 8</b> : SCHEMA DU PRINCIPE DE LA TECHNOLOGIE SIM.. ....	23
<b>FIGURE 9</b> : SCHEMA DU PRINCIPE DE LA MICROSCOPIE SMLM.....	25
<b>FIGURE 10</b> : SPECTRE DE FLUORESCENCE DE mEos4B. ....	26
<b>FIGURE 11</b> : STRUCTURE DE LA SEQUENCE DES LENTIVIRUS.....	28
<b>FIGURE 12</b> : SCHEMA DU SYSTEME DE PRODUCTION DE LENTIVIRUS DE TROISIEME GENERATION .....	32
<b>FIGURE 13</b> : REPARTITION SYNAPTIQUE ET NON-SYNAPTIQUE DES SOUS-UNITES $\gamma 2$ ET $\Delta$ .....	43
<b>FIGURE 14</b> : SUPERPOSITION DU MARQUAGE EN MICROSCOPIE CLASSIQUE ET SUPER-RESOLU.....	44
<b>FIGURE 15</b> : NEURONES INFECTES AVEC GABA <sub>A</sub> R $\gamma 2$ -mEos4B ET MARQUES AVEC LA SONDE SYLITE .....	46
<b>FIGURE 16</b> : MOYENNES DE FLUORESCENCE TOTALE DE GEPHYRINE ET DE mEos4B-GABA <sub>A</sub> R $\gamma 2$ . ....	48
<b>FIGURE 17</b> : INTENSITES DE FLUORESCENCE NORMALISEES SUR LE MARQUAGE DE GEPHYRINE .....	50
<b>FIGURE 18</b> : CORRELATION ENTRE GAMMA2 ET LA PHOSPHORYLATION S270 DE GEPHYRINE .....	51
<b>FIGURE 19</b> : SCHEMA DES REPRODUCTIONS DE SOURIS POUR LA CREATION DES MODELES OSCILLATOR ET SHAKY58	
<b>FIGURE 20</b> : MICROSCOPIE A CHAMPS LARGE, REPRESENTATIVES DES MOELLES EPINIERS DE SOURIS.....	59
<b>FIGURE 21</b> : SERIE D'IMAGES D'UN FILM PALM DE 20 000 IMAGES .....	61
<b>FIGURE 22</b> : IMAGES SUPER-RESOLUES PALM PRIS POUR CHAQUE GENOTYPE DE SOURIS.....	62
<b>FIGURE 23</b> : REPRESENTATION DE LA TAILLE MOYENNE DES SYNAPSES PAR IMAGE SUPER-RESOLUE EN PALM. ....	62
<b>FIGURE 24</b> : IMAGE SUPER-RESOLUE POINTILLISTE DE DIFFERENTES QUALITES .....	66
<b>FIGURE 25</b> : PROPOSITION DE MODELE DES PROPRIETES PHOTOPHYSIQUES DE mEos4B.....	67
<b>FIGURE 26</b> : COMPARAISON DES DETECTIONS ENREGISTREES EN FONCTION DU NOMBRE DE PHOTONS. ....	68
<b>FIGURE 27</b> : COMPARAISONS DES PARAMETRES DE DETECTIONS DE PLUSIEURS FILMS PALM .....	69
<b>FIGURE 28</b> : IMAGES PALM SUPER-RESOLUES, AVANT ET APRES CORRECTION DU DECALAGE. ....	71

<b>FIGURE 29</b> : ORGANISATION ULTRA-STRUCTURALE DU SEGMENT INITIAL AXONAL .....	73
<b>FIGURE 30</b> : SCHEMA MONTRANT L'INCORPORATION DE LA COLLYBISTINE AUX SYNAPSES GABAERGIQUES.....	74
<b>FIGURE 31</b> : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU MODELE DE SOURIS GABRA2-1 .....	75
<b>FIGURE 32</b> : COMPARAISON DES IMAGES PRISES AU CONFOCAL ET EN SIM .....	76
<b>FIGURE 33</b> : IMAGE ZOOMEE D'UN SIA MARQUE PAR LA SPECTRINE.....	77

## Liste des tableaux

<b>TABLEAU 1</b> : ANTICORPS ET SONDE PEPTIDIQUE UTILISES POUR L'IMMUNOMARQUAGE DES NEURONES.....	35
<b>TABLEAU 2</b> : ANTICORPS ET SONDE PEPTIDIQUE POUR L'IMMUNOMARQUAGE DES COUPES DE CERVEAU. ....	39
<b>TABLEAU 3</b> : GUIDE RAPIDE POUR ORIENTER LE CHOIX DE MICROSCOPIE SUR LA PLATEFORME.....	79

## Avant-propos

L'étude du système nerveux central (SNC) implique d'avoir accès à certaines structures clés pour la transmission des messages nerveux, tels que la synapse ou encore l'organisation moléculaire du segment initial axonal (SIA). Les tailles de ces éléments sont de l'ordre des dizaines de nanomètres.

En microscopie optique classique, la limite de localisation spatiale d'un objet est proportionnelle à la moitié de la longueur d'onde de la lumière d'émission, soit environ 250 nm. On appelle ce seuil la limite de diffraction de la lumière. La microscopie électronique qui utilise, non pas des photons, mais des électrons pour éclairer un objet, permet de descendre largement sous ce seuil car les électrons ont des longueurs d'ondes bien plus petites, qui permettent d'atteindre une résolution de l'ordre du picomètre. Cette technique microscopique requiert une préparation assez lourde de l'échantillon à observer, excluant notamment les études sur des échantillons vivants. Les techniques de microscopie dites super résolutive, permettent d'atteindre des résolutions de l'ordre des dizaines de nanomètres tout en utilisant des microscopes optiques classiques.

Dans le contexte d'étude de notre unité « Maladies et Hormones du Système Nerveux », la microscopie super-résolutive, qui permet à la fois d'atteindre des résolutions suffisantes pour étudier les structures d'intérêt du système nerveux et en même temps de pouvoir faire des études dynamiques dans des cellules vivantes, est un système tout à fait indiqué.

Notre unité s'est donc récemment dotée du microscope Elyra PS.1 de Zeiss permettant de travailler avec différentes techniques de microscopie super résolutive, la microscopie à illumination structurée (SIM), et la microscopie de localisation de molécules uniques (SMLM) que sont les méthode STORM ou PALM.

Mon travail au laboratoire ces deux dernières années a consisté à me former sur ces technologies de microscopie à travers différents projets scientifiques, dont les thématiques ont en commun l'étude des synapses inhibitrices du SNC. Ce sont ces travaux que j'ai choisi d'exposer dans ce mémoire.

# Introduction

## I – Neurobiologie des synapses inhibitrices

### 1. Les synapses

L'information dans le système nerveux central circule via les neurones qui génèrent et transmettent l'influx nerveux. Les neurones, qui sont composés en général d'un soma, de dendrites et d'un axone, communiquent entre eux à travers les synapses. Une synapse est constituée d'un bouton présynaptique, d'une fente synaptique et du bouton post-synaptique. Le neurone présynaptique transmet un potentiel électrique le long de son axone qui se termine par des boutons présynaptiques. Le potentiel électrique va déclencher la libération de messagers chimiques contenus dans des vésicules synaptiques présentes dans les boutons présynaptiques à travers la fente synaptique. Ces neurotransmetteurs seront captés par des récepteurs se situant du côté de la cellule post-synaptique. Les récepteurs post synaptiques activés déclencheront une réaction dans la cellule, suivant le type de neurotransmetteurs et de récepteurs mis en jeu. En effet, on distingue deux types de synapses chimiques suivant les molécules qu'elles contiennent : les synapses excitatrices et les synapses inhibitrices. Les synapses excitatrices vont enclencher la propagation d'un signal électrique dépolarisant à travers le neurone, alors qu'au contraire l'activité des synapses inhibitrices crée une hyperpolarisation qui va inhiber la propagation du signal électrique (Halterman 2005).

Le flux électrique va passer d'une cellule à une autre, via une synapse. La plupart des synapses du SNC sont des synapses chimiques (à distinguer des synapses électriques). Pour transmettre son signal électrique, une cellule émettrice va faire passer un potentiel d'action (signal électrique) via son axone et atteindre une cellule réceptrice. Au repos, le potentiel membranaire du neurone est de -70mV entre le cytosol et le milieu extracellulaire. Pour qu'un potentiel d'action soit déclenché au niveau du segment initial axonal, le potentiel de la membrane du neurone doit atteindre un certain seuil à cet endroit (-55mV). Cela sera possible grâce à l'entrée dans le neurone d'ions chargés positivement. Au contraire, une

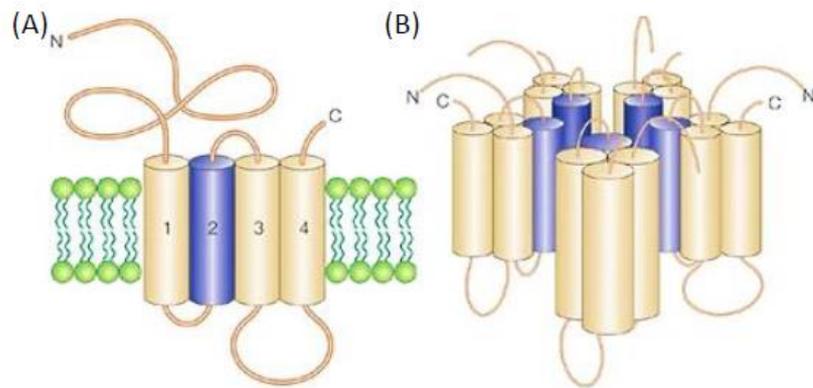
entrée d'ions négatifs, contribuera à diminuer la capacité du neurone à déclencher un potentiel d'action. Les synapses excitatrices sont celles qui permettent l'entrée des ions chargés positivement ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) et les synapses inhibitrices les ions chargés négativement ( $\text{Cl}^-$ ). L'entrée de ces ions est contrôlée au niveau des synapses par des récepteurs ionotropiques.

Le bon fonctionnement du système nerveux requiert un équilibre fin entre synapses excitatrices et inhibitrices. Les synapses inhibitrices, qui sont généralement moins nombreuses que les synapses excitatrices dans la plupart des réseaux neuronaux, sont impliquées dans diverses pathologies comme l'épilepsie, l'anxiété, les troubles du sommeil, la dépression ou encore l'hyperreflexie (Saini et Pandey 2020), maladie qui sera étudiée plus en avant dans ce rapport.

## **2. Les synapses inhibitrices**

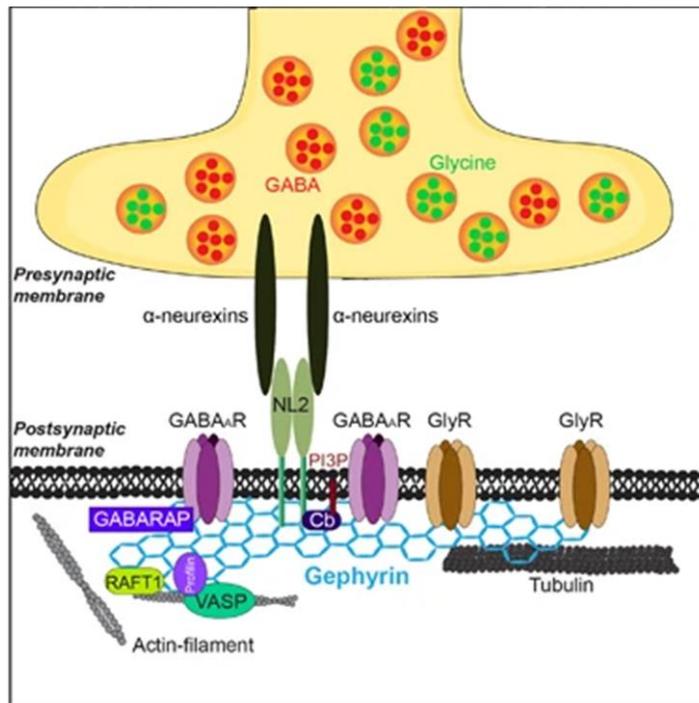
Les deux principaux neurotransmetteurs inhibiteurs du SNC sont l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) et la glycine (Gly). Le premier est majoritaire dans le cerveau, tandis qu'on retrouve essentiellement le second dans la moelle épinière et le tronc cérébral, où la plupart des synapses inhibitrices sont dites mixtes (GABAergique et glycinergique) (Bohlhalter, Mohler, et Fritschy 1994).

L'inhibition provoquée par le GABA est transmise par les récepteurs du GABA de type A ( $\text{GABA}_A\text{Rs}$ ), et celle de la glycine par les récepteurs de la glycine (GlyRs). Ces deux récepteurs sont donc retrouvés au niveau post-synaptique des synapses inhibitrices et ont en commun certaines caractéristiques. Ils sont dits ionotropiques, car ils agissent comme des canaux ioniques. Les récepteurs sont tous deux des hétéropentamères transmembranaires, dont les sous-unités sont arrangées autour d'un pore central par lequel les ions chlore peuvent pénétrer dans le neurone lorsqu'il est ouvert (Figure 1).



**Figure 1** : Schéma de la structure de base des récepteurs du GABA et de la glycine. Chaque sous-unité est composée de quatre domaines transmembranaires (A), et 5 sous-unités forment un pore central (B). D'après (Moss et Smart 2001).

Ces deux récepteurs se lient à des protéines d'échafaudage comme la géphyrine qui permettent d'ancrer les récepteurs au niveau des synapses (Figure 2). Il a été montré que ces récepteurs diffusent latéralement dans la membrane plasmique et que les interactions entre les récepteurs et les protéines d'échafaudage impactent cette mobilité, contrôlant ainsi la répartition synaptique et extra-synaptique des récepteurs. Ce phénomène contribue à la plasticité synaptique et donc à la régulation de l'inhibition neuronale (Gerrow et Triller 2010). C'est pourquoi dans notre étude nous nous intéresserons de près à la géphyrine en parallèle des GABA<sub>A</sub>Rs et des glyRs. Des études ont montrés que la phosphorylation de la géphyrine influe sur la capacité de sa molécule à former des clusters aux synapses (Tyagarajan et al. 2011) et de plus, la phosphorylation est un des mécanisme qui régule les interactions de cette protéine avec les GABA<sub>A</sub>Rs (Battaglia et al. 2018).



**Figure 2** : Schéma représentant l'organisation des synapses inhibitrices, d'après (Choi et Ko 2015).

### 3. Les récepteurs du GABA de type A

L'effet de GABA sur les GABA<sub>A</sub>R est l'ouverture du canal ionique perméable préférentiellement aux ions chlorure. Comme expliqué précédemment, les ions chlorure vont rentrer dans la cellule et faire baisser le potentiel électrique membranaire, donc hyperpolariser la cellule, et du coup diminuer sa capacité à déclencher un potentiel d'action au niveau du segment initial axonal, qui est le site d'initiation du potentiel d'action (Huang et Rasband 2018). Les GABA<sub>A</sub>R peuvent lier différents modulateurs allostériques (dont les stéroïdes neuroactifs, les benzodiazépines, l'éthanol). En se fixant sur un site différent de celui du GABA, ceux-ci vont augmenter ou diminuer l'effet induit par les molécules de GABA. On parle de modulateur allostérique positif ou négatif (Solomon et al. 2019).

On distingue une grande variété de sous-unités du GABA qui forment le pentamère. 19 gènes codent pour les sous-unités différentes déclinées en plusieurs isoformes : α1–α6, β1–β3, γ1–γ3, δ, ε, π, θ, ρ1–ρ3. L'association de sous-unités la plus répandue est composée de deux sous-unités alpha, deux sous-unités bêta et d'une sous-unité gamma ou delta. Cette

diversité de combinaisons de sous-unités pour composer un récepteur du GABA joue grandement dans la spécificité des profils pharmacologiques, physiologiques et sur la localisation des récepteurs (Fritschy et Panzanelli 2014).

Les récepteurs du GABA peuvent se situer au niveau des synapses ou sont extra-synaptiques. Suivant leur localisation, la composition en sous-unités diffère souvent par la présence, entre autres, de la sous unité gamma 2 au niveau synaptique et de la sous unité delta quand il s'agit d'un récepteur extra-synaptique. Les récepteurs synaptiques vont transmettre un signal électrique dit phasique, rapide et de grande amplitude, alors que les récepteurs situés en dehors des synapses vont transmettre un signal dit tonique de faible amplitude mais plus persistant. La combinaison de ces deux types de fonctionnement permet une régulation fine de l'inhibition neuronale (Wu et al. 2012).

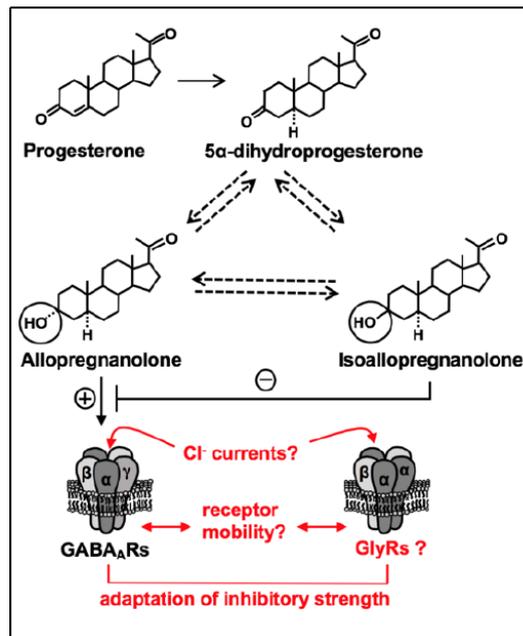
#### **4. Les neurostéroïdes**

Les récepteurs des synapses inhibitrices sont sensibles à un large éventail de molécules qui viennent moduler leur fonctionnement. Parmi ces molécules, nous distinguons les neurostéroïdes, aussi appelés stéroïdes neuroactifs (NAS pour l'anglais NeuroActive Steroids). Plus généralement, les stéroïdes sont des hormones synthétisées à partir du cholestérol dans les mitochondries et sont produites par les glandes sexuelles et surrénales. Leur caractère lipophile leur permet de traverser les membranes cellulaires passivement. Les stéroïdes agissent principalement au niveau de récepteurs nucléaires en agissant sur la transcription de gènes cibles, mais ils ont également des effets non génomiques (Guiochon-Mantel et Milgrom 1999). Les neurostéroïdes ont la particularité d'être synthétisés de novo dans le cerveau à partir du cholestérol, ou à partir de métabolites des stéroïdes sexuels et de stress (progestérone, corticostérone) qui peuvent passer la barrière hémato-encéphalique. Sous l'appellation NAS on regroupe les neurostéroïdes (produits dans le cerveau) mais aussi les stéroïdes ayant un effet sur le système nerveux central via des récepteurs non nucléaires, comme par exemple les récepteurs ionotropiques. C'est le cas de la progestérone, de l'allopregnanolone. Ainsi, les NAS ont la capacité d'agir très rapidement sur des récepteurs qu'ils soient synaptiques ou extra-synaptiques et peuvent avoir un effet modulateur allostérique positif (PAM) ou négatif (NAM) (Schverer et

al. 2018). L'allopregnanolone (ALLO), qui est un NAS endogène, est l'un des modulateurs allostériques positifs les plus puissants du récepteur du GABA, et mime les effets provoqués par les traitements aux benzodiazépines. Ces médicaments agissent spécifiquement sur les récepteurs du GABA en tant que PAM, et sont utilisés pour leurs effets anxiolytique, sédatif, antiépileptique et myorelaxant. Ils ont pour défaut de provoquer des effets secondaires tels que la dépendance, une sédation ou encore de l'amnésie. L'ALLO, qui ne provoque pas d'effets secondaires aussi forts, est une cible thérapeutique intéressante pour traiter les maladies liées au stress ainsi que la dépression (Zorumski et al. 2019). Cependant, le mode exact de fonctionnement des NAS sur l'inhibition neuronale n'est pas connu. En effet, plusieurs facteurs rendent cette étude difficile : la diversité des cibles moléculaires des NAS (récepteurs du glutamate, récepteur de la progestérone, récepteurs voltage dépendants, canaux calciques), le nombre important de métabolites des NAS ayant des effets différents, le manque de connaissance des effets des NAS sur la distribution et la mobilité des récepteurs dans la membrane neuronale (Kudova 2021). Il semblerait que l'ALLO a un effet plus important sur les récepteurs contenant la sous unité delta (Belelli et al. 2002).

L'allopregnanolone peut être converti en isallopregnanolone (INN) son stéréoisomère. INN antagonise l'effet de l'ALLO sur les récepteurs du GABA (Figure 3). L'allopregnanolone est déjà autorisé aux États-Unis depuis 2019 comme médicament sous le nom de Brexanolone pour traiter la dépression du post-partum (Edinoff et al. 2021). SAGE-217 (Zuranolone), un NAS exogène, est également nouvellement autorisé comme traitement de la dépression du post-partum depuis 2023, cette molécule ressemble à celle du Brexanolone, mais contrairement à celle-ci, elle peut être administrée par voie orale (Althaus et al. 2020).

Nous voulons ainsi étudier le fonctionnement des NAS spécifiques du GABA<sub>A</sub>R avec des profils cliniques connus que sont l'ALLO (endogène) et SAGE-217 (exogène), INN (endogène) et son analogue synthétique GR-3027. Ce sont toutes des molécules approuvées ou en cours d'étude pour soigner les maladies liées à des défauts de signalisation GABAergique. C'est pourquoi il nous paraît important de comprendre plus en détail les mécanismes de ces tetrahydro-métabolites de la progestérone et leurs analogues pour mieux caractériser leurs effets sur l'inhibition de la neurotransmission.



**Figure 3** : Biosynthèse de l'allopregnanolone et son stéréoisomère isoallopregnanolone, effets sur les populations de récepteurs de l'inhibition neuronale.

## 5. Récepteurs de la glycine

Les récepteurs de la glycine (GlyR) appartiennent à la même famille de récepteurs que les récepteurs GABAergiques et sont situés dans la moelle épinière et le tronc cérébral. On distingue deux familles de sous-unités : alpha ( $\alpha$ 1-4) et bêta. Les sous-unités alpha peuvent former un homopentamère fonctionnel, ce qui n'est pas le cas de la sous-unité bêta. Cette dernière permet la fixation du récepteur à la protéine d'échafaudage géphyrine qui se trouve aux synapses. Par conséquent, les récepteurs homomériques composés des sous-unités  $\alpha$ 1-4 se localisent dans la membrane extrasynaptique, tandis que les hétéropentamères ( $\alpha\beta$ ) forment des clusters synaptiques (Lynch 2009).

L'hyperekplexie est une maladie rare due à des défauts de fonctionnement de l'inhibition glycinergique dont les mutations mises en causes touchent les gènes *GLRA1*, *GLRB*, *GPHN* (Bode et Lynch 2014). Les symptômes de cette maladie sont des sursauts excessifs en réaction à des stimuli inattendus, et de l'hypertonie pouvant conduire à des arrêts respiratoires fatals chez les nourrissons. Différents modèles de souris récapitulent les symptômes de l'hyperekplexie chez l'homme, dont les mutants *oscillator* et *shaky*, qui

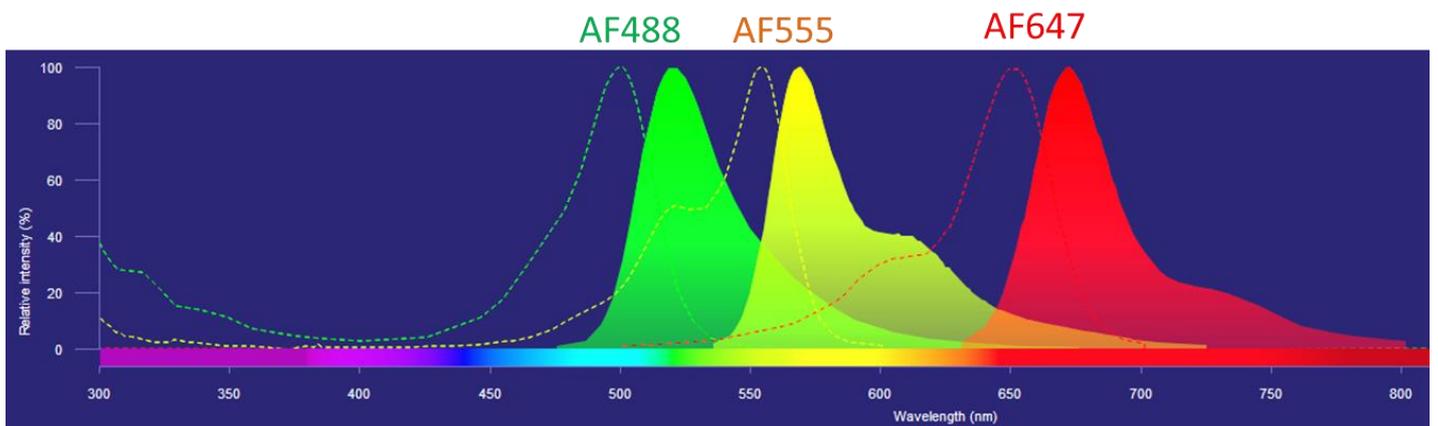
portent des mutations dans le gène du GlyR $\alpha$ 1 (Schaefer et al. 2017) (Buckwalter et al. 1994.; Kling et al. 1997).

En collaboration avec le laboratoire de Carmen Villmann (Institut de neurobiologie clinique, de l'université Julius-Maximilians de Würzburg en Allemagne), nous avons analysé les synapses glycinergiques des moelles de ces différents modèles de souris à l'aide de la technique PALM.

## II - Les méthodes microscopiques utilisées

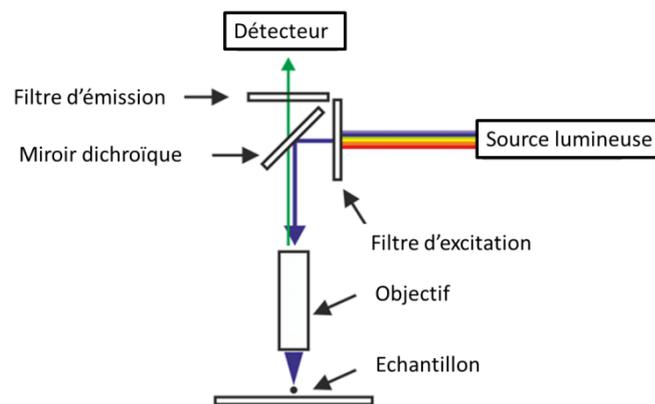
### 1. Notion de microscopie photonique à fluorescence (Lichtman et Conchello 2005).

Un microscope à fluorescence permet de détecter dans un échantillon des molécules marquées avec des fluorochromes ou couplées à des protéines fluorescentes, et ainsi d'étudier la distribution de ces molécules au sein de tissus ou de cellules. Une molécule fluorescente a la capacité d'absorber la lumière dans une gamme de longueur d'onde précise et de la restituer rapidement dans une gamme de longueur d'onde légèrement plus grande (déplacement de Stokes). Ainsi, en maîtrisant les longueurs d'onde de la lumière utilisée grâce à des systèmes de filtres, il devient possible d'observer uniquement les molécules fluorescentes d'un échantillon. Chaque fluorochrome a un spectre d'excitation et d'émission qui le caractérise. Il est alors possible de combiner différents fluorochromes pour marquer différentes molécules au sein d'un même échantillon, en prenant garde de les choisir de manière à ce que leurs spectres se chevauchent le moins possible (Figure 4)



**Figure 4** : Spectres d'excitation (pointillés) et d'émission (plein) de 3 fluorochromes, couramment combinés pour nos expériences, Alexa Fluor (AF) 488, 555 et 647. Adapté du Spectra viewer de Thermo Fisher.

Un microscope à fluorescence est composé de différents éléments généraux (Figure 5). On retrouve une source lumineuse puissante et homogène, qui dispense une lumière à large spectre. Des objectifs et des lentilles permettent d'obtenir une image grossie de l'échantillon. Un cube, composé de trois éléments : un filtre d'excitation, un filtre d'émission et un miroir dichroïque, servant à sélectionner les longueurs d'onde de la lumière spécifique au fluorochrome utilisé. Ces cubes sont interchangeables en fonction des fluorochromes à visualiser. Et enfin le système de détection des signaux lumineux émis par l'échantillon, est généralement une caméra EMCCD ou sCMOS.



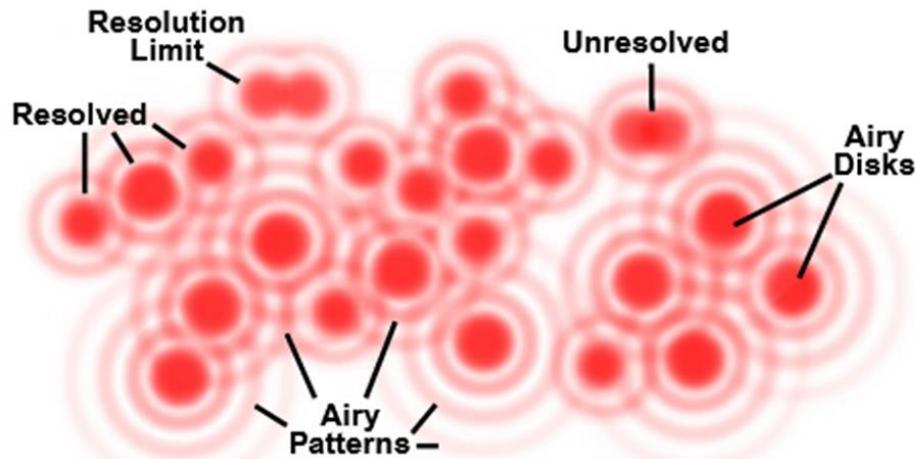
**Figure 5** : Schéma simplifié d'un microscope à épifluorescence. Adapté de la thèse de Tomas Majtner, 2012.

La résolution latérale ( $r$ ) obtenue par ces microscopes, qui correspond à la distance minimale à laquelle deux objets peuvent être distingués (appelé critère de Rayleigh), est imposée par la loi de la diffraction de la lumière et par l'ouverture numérique (NA) de l'objectif utilisé et peut être définie par la formule suivante :

$$r = \lambda / (2NA), \quad \lambda \text{ étant la longueur d'excitation.}$$

En effet, la lumière étant une onde électromagnétique, lorsqu'elle passe à travers une ouverture sphérique, subit la loi d'Abbe sur la diffraction. Ainsi un objet ponctuel donnera une image floue appelé tache d'Airy. Si les tâches d'Airy se superposent, il devient impossible de distinguer deux objets (Giancoli 1989) (Figure. 6).

Dans un système optique considéré comme parfait, la résolution maximale atteinte serait de l'ordre de  $\sim 200$  nm, en utilisant des longueurs d'onde proches de l'ultraviolet (UV, 400 nm).



**Figure 6** : Représentation du phénomène des disques d'Airy et de la limite de résolution.  
Source MicroscopyU, Nikon (<https://www.microscopyu.com/microscopy-basics/resolution>).

Or, dans la pratique, il faut considérer que l'échantillon à observer a également une composante axiale (épaisseur en Z). Cela signifie que lorsque l'on veut regarder la lumière émise au réglage du plan focal, la lumière émise par l'échantillon hors plan focal va venir polluer le signal lumineux, et ainsi on perdra en résolution. Ce problème est partiellement résolu par la technologie du microscope confocal.

## **2. Microscopie confocale.**

Le principe du microscope confocal, inventé en 1957 par Minsky (Cox 2002), est d'éclairer l'échantillon uniquement sur un certain point focal (en z) et de récupérer la lumière provenant uniquement de ce même point focal. Ainsi le signal lumineux récolté n'est pas parasité par la fluorescence provenant de toute l'épaisseur de l'échantillon observé.

Pour ce faire, le système du microscope à fluorescence présenté précédemment est implémenté par deux modifications majeures. Premièrement, la présence de 2 diaphragmes très fermés, l'un permettant de focaliser la lumière sur un point précis, et le deuxième de laisser passer sur le détecteur uniquement la lumière émise par le point illuminé (appelé pinhole). L'autre différence est l'utilisation de laser comme source d'illumination de l'échantillon. En effet, pour reconstituer une image de l'échantillon à observer, il va falloir scanner l'échantillon point par point en x et y mais également en z. Etant donné que la zone illuminée est limitée pour chaque position du scan, il faut une source lumineuse très puissante afin de récupérer une lumière émise détectable, c'est pourquoi on utilise des lasers. Au lieu d'une caméra, on utilise des photomultiplicateurs pour la détection de la lumière émise à chaque position, reconstituant ainsi une image tridimensionnelle de l'échantillon.

Ce système permet donc deux axes d'amélioration par rapport au microscope à fluorescence classique : en augmentant la résolution maximale en x et y jusqu'à 160 nm, mais aussi en permettant l'obtention d'une image en 3 dimensions de l'échantillon scanné avec un très faible bruit de fond. Le désavantage de la microscopie confocale est que la prise d'image est moins rapide à cause du scan.

Dans le cadre du projet mené sur l'étude des synapses inhibitrices, les méthodes microscopiques employées doivent nous permettre de distinguer une synapse dont la taille varie entre 100 et 400 nm et d'étudier sa composition et organisation interne.

Il apparaît donc que même la microscopie confocale ne nous permet pas d'atteindre cette résolution, bien qu'elle sera utilisée pour les mises au point de nos immunomarquages.

C'est pourquoi notre unité s'est récemment dotée d'un système de microscopie à fluorescence permettant de produire de l'imagerie super résolutive.

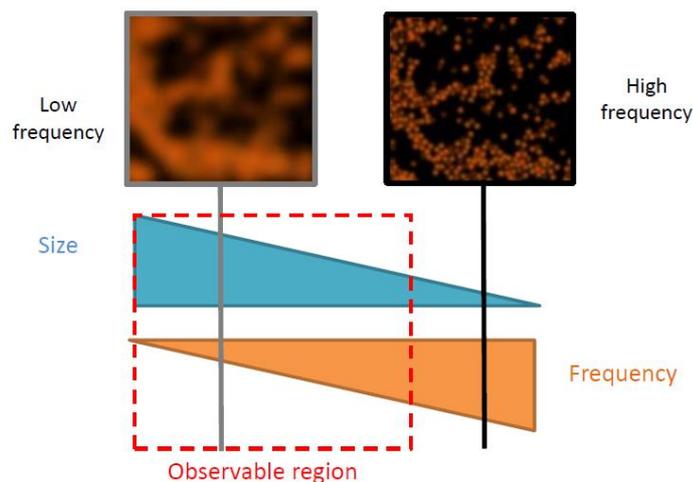
### 3. Microscopie super résolutive

Notre poste Elyra PS.1 de Zeiss, est un microscope inversé à fluorescence permettant de faire des acquisitions d'images en mode Structured Illumination Microscopy (SIM) ou en mode Single Molecule Localization Microscopy (SMLM).

#### 3.1 Le mode Structured Illumination Microscopy (SIM)

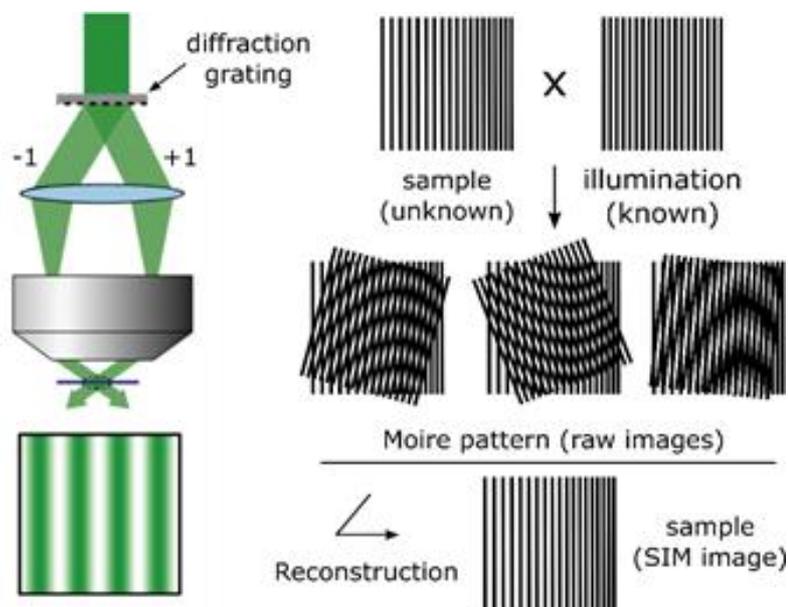
Le mode SIM est une méthode de microscopie à fluorescence qui permet un gain de résolution jusqu'à deux fois celle obtenue avec un microscope confocal, c'est-à-dire de l'ordre de 100 nm de résolution spatiale en x, y et environ 250 nm en profondeur (z).

Pour comprendre le principe de cette méthode, il faut raisonner dans un espace de fréquences. La limite de résolution imposée par la diffraction de la lumière dans un microscope ne permet pas de distinguer les éléments dont la taille est inférieure au critère de Rayleigh, ces éléments dits « sous-résolus », ont dans un espace de fréquence, des hautes fréquences, qui sont donc filtrées par un système optique classique (Figure 7). Le but de la technologie SIM est de transformer ces hautes fréquences en composantes de basses fréquences observables (Gustafsson 2000).



**Figure 7** : Composantes d'une image en termes de basses et hautes fréquences. Source : Zeiss-campus.

Pour ce faire, l'échantillon est illuminé par la lumière d'un laser qui passe à travers une grille, pour créer un motif sinusoïdal de fréquences connues et proches de celles à résoudre dans l'échantillon. Lorsque les deux motifs de fréquences proches se superposent (celui de l'échantillon et celui de l'illumination du laser), des interférences se produisent et créent un troisième motif appelé franges de Moiré. Ces franges de Moiré ont la particularité d'avoir des fréquences plus basses que celles des deux autres motifs et peuvent alors être captées par l'objectif du microscope (Figure 8). En prenant plusieurs images de l'échantillon avec des positions de grille différentes, on obtient plusieurs images qui comportent les informations fréquentielles nécessaires à une reconstruction d'une image super résolue. Cette reconstruction se fera dans l'espace de Fourier.



**Figure 8** : Schéma du principe de la technologie SIM. Source : Andor Oxford Instruments, application note ; <https://andor.oxinst.com/learning/view/article/super-resolution-imaging-structured-illumination-microscopy>.

Cette technique a l'avantage de ne pas demander de préparation d'échantillon différente de celle réalisée pour la microscopie de fluorescence classique. Les mêmes

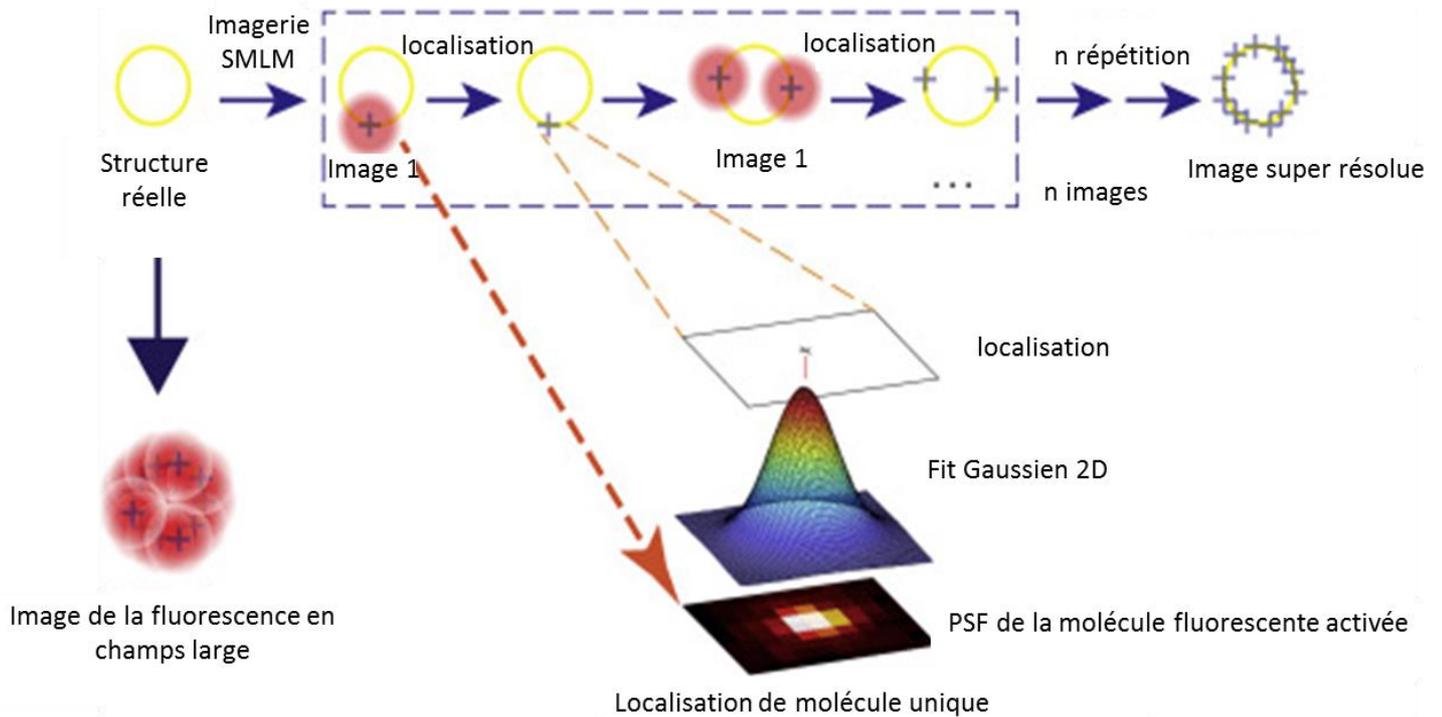
fluorophores (AF488, AF555, AF647) peuvent être observés, permettant la reconstitution d'images multicolores. D'ailleurs, l'imagerie SIM permet la prise et reconstitution d'images en trois dimensions, grâce à l'utilisation d'une platine piezoélectrique qui contrôle le plan focal. Le désavantage de SIM résulte du fait que la technique dépend de niveaux de fluorescence forts et stables, ce qui n'est pas le cas pour la visualisation de structures fines représentées par des faibles quantités de molécules.

Pour aller plus loin encore en termes de résolution et de sensibilité, il faut utiliser le mode SMLM du microscope.

### *3.2. Les méthodes PALM et STORM : Principe de la microscopie de localisation de molécule unique (SMLM)*

Cette technologie propose de contourner le seuil de résolution imposé par la diffraction de la lumière en jouant avec les propriétés qu'ont certains fluorochromes soit de clignoter, soit de pouvoir changer de couleur d'émission dans des conditions bien spécifiques (Hugelier, Colosi, et Lakadamyali 2023).

Comme vu précédemment dans le paragraphe d'introduction sur la microscopie à fluorescence, deux molécules séparées par une distance inférieure à la distance de Rayleigh ne peuvent pas être résolues (environ 200 nm). Le principe théorique de l'imagerie à molécule unique est de ne faire fluorescer que quelques fluorochromes à la fois par image, pour s'assurer qu'ils soient séparés d'une distance supérieure à 200 nm. On enregistre ainsi des centaines d'images jusqu'à ce que tous les fluorochromes aient pu être visualisés : on réalise donc une séparation temporelle des fluorochromes. Les images prises en conditions de résolution classique sont ensuite analysées par un logiciel, et pour chaque tache d'émission (chaque fluorochrome) une coordonnée précise du centre est calculée par l'application d'un ajustement gaussien et est considérée comme la position exacte de la molécule fluorescente. La précision de ce calcul est de l'ordre de 10-15 nm (précision de pointage/localisation). L'ensemble de ces coordonnées est finalement compilé afin de reconstituer une seule image super-résolue. La résolution spatiale de ces images peut atteindre environ 25-35 nm en x et y, un ordre de grandeur plus exact que la microscopie à fluorescence classique (Figure 9).

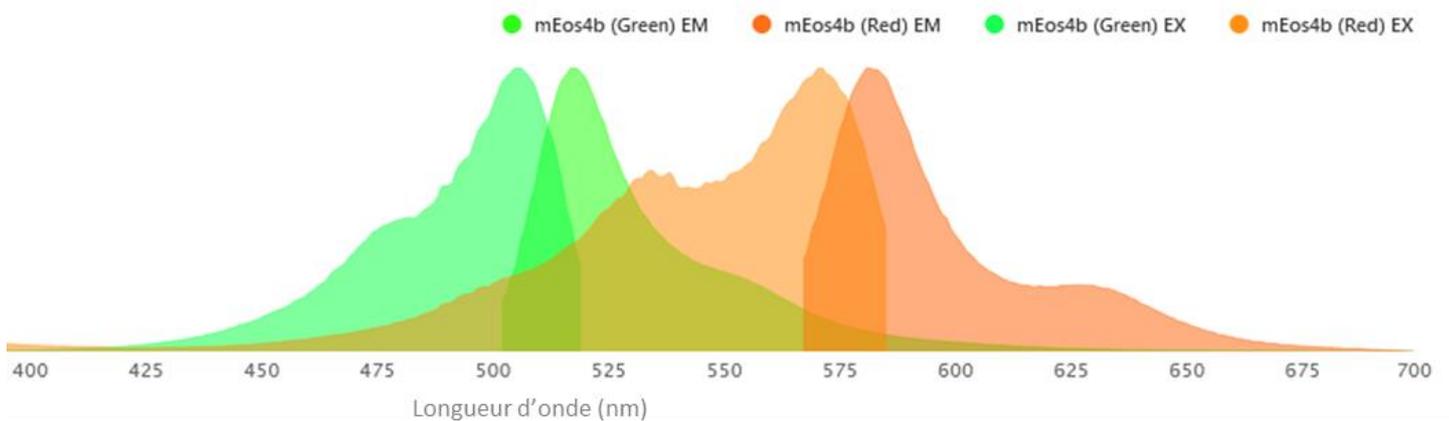


**Figure 9** : Principe de la microscopie SMLM, d'après (Khater, Nabi, et Hamarneh 2020).

Les technologies PALM pour l'anglais « PhotoActivated Localization Microscopy » et STORM pour l'anglais « Stochastic Optical Reconstruction Microscopy » reposent toutes deux sur ce même principe. La différence réside dans l'utilisation des molécules fluorescentes qu'elles mettent en jeu. Dans le cas du PALM, on utilise des protéines fluorescentes photoactivables ou photoconvertibles que l'on couple à la protéine d'intérêt à étudier. La conversion contrôlée de ces protéines fluorescentes permet la visualisation séquentielle de quelques molécules par image. Pour le STORM, on utilise des fluorochromes organiques qui sont le plus souvent couplés à des anticorps pour marquer les protéines d'intérêt. Parmi les fluorochromes les plus utilisés se trouve AF647 qui entre dans un état non-fluorescent s'il est excité dans un tampon réducteur et en absence d'oxygène (pour éviter son photoblanchiment). La conséquence est que seul un petit nombre de fluorochromes est actif dans chaque image, permettant l'identification de molécules uniques.

Dans le cadre des projets d'étude des synapses GABAergiques et glycinergiques, j'ai utilisé la protéine photoconvertible mEos4b (Osuga, Nishimura, et Suetsugu 2021) pour

marquer les sous-unités des récepteurs à étudier. Cette protéine est une forme modifiée de la protéine sauvage Eos, issue du corail *Lobophyllia hemprichii*, un tétramère fluorescent en vert qui peut être photoconverti dans le rouge par la lumière UV (Wiedenmann et al. 2004) (Figure 10). Plusieurs versions ont été créées à partir de la protéine sauvage, pour aboutir à une version monomérique, et améliorer sa fluorescence dans les conditions expérimentales du PALM.



**Figure 10** : Spectre de fluorescence de mEos4b. Source <https://www.fpbase.org/protein/meos4b/>

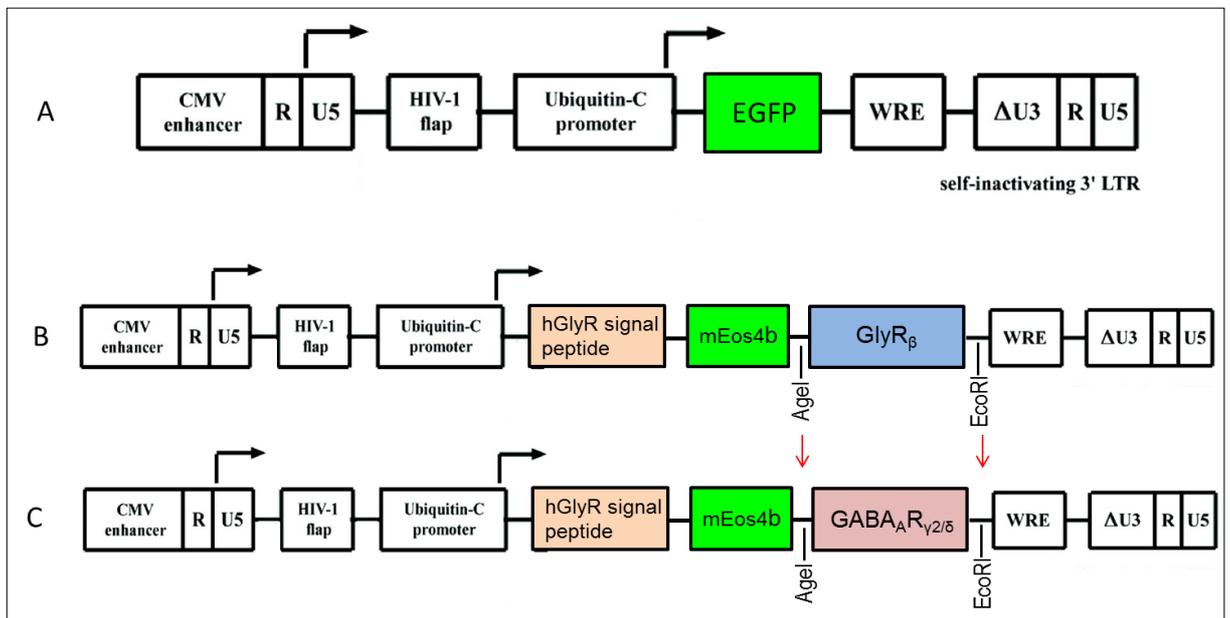
Pour utiliser cette protéine dans une expérience PALM, il faut contrôler l'illumination par l'UV afin de la photoconvertir du vert au rouge de manière stochastique. On utilisera donc l'acquisition d'images de la fluorescence dans le rouge pour reconstituer nos images en super résolution.

## **Matériels et Méthodes**

# I-Production des lentivirus exprimant des sous-unités du récepteur au GABA, couplées à mEos4b

## 1-Clonage

J'ai produit mes plasmides qui serviront pour la production de lentivirus à partir d'un plasmide déjà à disposition dans notre laboratoire FU-Eos4-hGlyR $\beta$  (Maynard et al. 2021). Il est dérivé du plasmide FUGW (Lois et al. 2002) créé pour l'expression de lentivirus contenant le puissant et ubiquitaire promoteur de l'ubiquitine-C humaine, le gène de résistance à l'ampicilline, des séquences LTR dont une auto-inactivante. La séquence codant la sous-unité  $\beta$  du récepteur de la glycine est remplacé par clonage par les séquences codantes des sous-unités  $\gamma_2$  ou  $\delta$  du GABA $_A$ R de la souris. Celles-ci suivent la séquence du peptide signal de la sous unité  $\beta$  du récepteur de la glycine, et la séquence codant pour la protéine fluorescente mEos4b (Figure 11).



**Figure 11** : Structure de la séquence des lentivirus, FUGW de base (A), et des versions modifiées par clonage pour obtenir les plasmides FU-Eos4-mGABA $_A$ R $\gamma_2/\delta$  (B/C). Adapté de Lois et al. 2002

Les séquences codantes pour les sous-unités des GABA<sub>A</sub>R gamma2 et delta (références NCBI : NM\_008072.3 et NM\_008073.4) sont amplifiées par PCR à partir de plasmides contenant déjà ces séquences et disponibles au laboratoire.

### 1.1 Amplification PCR

Les oligos utilisés pour les PCRs contiennent les sites de restriction des enzymes *AgeI* et *EcoRI*, correspondants aux sites d'insertion dans le plasmide FU-Eos4-hGlyR $\beta$ . Nous avons ajouté 3 nucléotides avant les sites de restriction pour assurer un bon clivage par les enzymes.

Gabrg2-sens : GGT*accggt*CAAAAGTCAGATGATGACTATGAAGATTACGCTTC *AgeI*

Gabrg2-anti sens : ATC*gaat*TCACAGATAAAGATAGGAGACC *EcoRI*

Gabrd-sens : GGT*accggt*CAGCCGCACCATGGCGCCAGG *AgeI*

Gabrd-anti sens : ATC*gaat*TCACATGGTGTACGCCGCC *EcoRI*

Les PCRs sont faites dans un volume final de 50  $\mu$ l, avec 0,4 unités de KOD polymérase (Merck), dans le tampon KOD buffer 1X, les oligos sens et antisens sont ajoutés à une concentration finale de 0,4 $\mu$ M, les dNTPs sont utilisés à 200 $\mu$ M et le MgCl<sub>2</sub> à 1mM. 4  $\mu$ g d'ADN plasmidique à amplifier est ajouté au mix. L'amplification se fait en thermocycleur (Mastercycleur proS, Eppendorf), on commence par une phase de 5 min à 95°C pour empêcher la dimérisation des oligonucléotides, suivie par 25 cycles de dénaturation (95°C / 15 s), d'hybridation (60°C / 15 s) et d'élongation (72°C / 15 s). La réaction se termine par 3 min d'élongation finale à 72°C.

Après vérification des tailles des produits de PCR sur l'automate de migration Qiaxcel (Qiagen), les produits de PCR sont purifiés avec le kit Nucleospin Gel and PCR clean-up (Macherey-Nagel), selon les instructions du fabricant.

### 1.2 Digestion

2  $\mu$ g de plasmide FU-Eos4-hGlyR $\beta$  ainsi que de produits de PCR purifiés sont ensuite digérés par le même couple d'enzymes de restriction *AgeI* et *EcoRI* en version haute fidélité (Neb), afin d'éviter les clivages non spécifiques, pendant 30 min à 37°C.

### *1.3 Déphosphorylation*

Après la digestion, 5 unités d'Antartic Phosphatase (Neb) sont rajoutées directement dans le mix de digestion du plasmide FU-Eos4-hGlyRb et le tout est remis à 37°C pour 20 min supplémentaires afin de déphosphoryler le plasmide linéarisé pour empêcher une recircularisation du plasmide avant ligation.

### *1.4 Purification des bandes d'intérêt*

Les produits de digestion sont déposés sur un gel à 1% d'agarose dilué au tampon TAE 1X (Tris Acétate EDTA) et additionné de SybrSafe (Invitrogen) comme révélateur d'acide nucléique. Les bandes correspondantes aux tailles des produits de PCR ainsi que la bande du plasmide FU-Eos4-hGlyRb ouvert et délesté de la séquence du récepteur de la glycine digérée sont découpées dans le gel puis purifiées à l'aide du kit Nucleospin Gel and PCR clean-up (Macherey-Nagel), selon les instructions du fabricant.

### *1.5 Ligation*

Enfin la ligation qui permet une recircularisation du vecteur ayant intégré les inserts d'intérêt est faite avec la T4 DNA ligase (Neb). On utilise un ratio vecteur /insert de 1 : 5, en partant de 50 ng du plasmide FU-Eos4-hGlyRb digéré, déphosphorylé et purifié sur gel. La réaction se fait sur la nuit à 18°C, puis la ligase est inactivée 10 min à 65°C le lendemain matin.

### *1.6 Transformation*

3 µl des produits des réactions de ligation sont ensuite déposés sur 50 µl de bactéries One Shot TOP10 Chemically Competent E. coli (Thermofisher) décongelées sur glace. Après 30 minutes d'incubation sur glace, un choc thermique de 30 secondes à 42°C induit la création de pores membranaires chez les bactéries et ainsi permet la pénétration des plasmides. Les bactéries sont ensuite mises à incuber 1 h à 37°C sous agitation après ajout de 250 µl de milieu S.O.C (super optimal medium with catabolic repressor). Les bactéries ayant intégré notre plasmide (recombinant ou non) sont sélectionnées en déposant 200 µl de la suspension bactérienne sur des boîtes de milieu LB (bouillon lysogène) -Agar additionné de 100µg/ml d'ampicilline. Les boîtes sont incubées toute la nuit à 37°C.

### *1.7 Extraction d'ADN plasmidique*

Quelques colonies positives sont prélevées des boîtes pour être mises en culture dans 3 ml de milieu LB additionné d'ampicilline pendant toute une nuit à 37°C sous agitation. La culture obtenue est ensuite utilisée pour faire une extraction de l'ADN plasmidique à l'aide du kit Nucleospin plasmid (Macherey-Nagel), selon les instructions du fabricant.

Une digestion de vérification est réalisée sur la solution de plasmide pour s'assurer que les plasmides ont le bon profil avant de les envoyer à séquencer (Eurofins) afin de s'assurer de la bonne séquence insérée et l'absence de mutation.

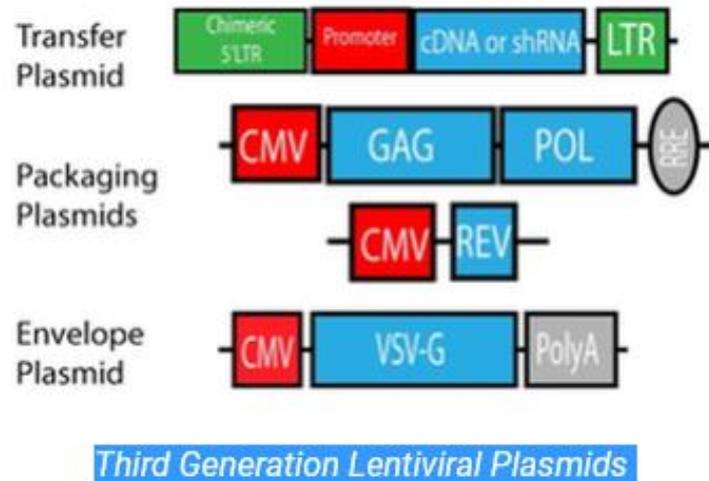
## **2. Production de lentivirus**

Afin de faire exprimer nos constructions efficacement dans des cellules neuronales, nous avons choisi l'infection par lentivirus, car ils ont la capacité d'infecter les cellules qui ne se divisent pas comme les neurones. Nous utilisons le système de troisième génération d'Addgene pour mener à bien cette production. Il s'agit d'utiliser quatre plasmides pour transfecter les cellules qui produiront les lentivirus. Trois plasmides dits « helpers » se répartissent les composants nécessaires à la production de lentivirus : protéines d'enveloppe et d'emballage et le quatrième dit plasmide de transfert contient la séquence de notre protéine d'intérêt couplée à mEos4b (figure 12). Le fait de ne pas avoir tous les éléments nécessaires à la production de lentivirus sur un seul plasmide permet de limiter les risques de multiplication non contrôlée du lentivirus. Les manipulations de lentivirus sont menées dans un laboratoire de type L2.

Des cellules HEK293 tsA201, une version de cellules HEK (pour l'anglais « Human Embryonic Kidney cells ») efficace pour la production de rétrovirus, sontensemencées sur des boîtes de culture de 10 cm de diamètre recouvertes d'une solution de poly-DL-ornithine (Sigma) à 10µg/ml et dans du milieu DMEM (pour l'anglais « Dulbecco's Modified Eagle Medium ») avec glutaMAX (Gibco) additionné de 10% de sérum foetal bovin et d'un mélange d'antibiotiques composé de pénicilline à 50u/ml et de streptomycine à 50µg/ml. Les cellules sont transfectées quand la culture atteint 90% de confluence. Le milieu de culture est alors changé pour du milieu Neurobasal (Gibco) complété avec du GlutaMAX 1X (Gibco), le

supplément sans sérum B27 1X (Gibco) et les antibiotiques pénicilline à 5u/ml et streptomycine à 5µg/ml. Ce milieu est le milieu dans lequel les lentivirus seront récoltés et qui est compatible avec nos futures cultures de neurones à infecter. L'agent transfectant utilisé, la Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher), permet la création de liposomes contenant l'ADN plasmidique à transférer. Ces liposomes fusionnent avec les lipides de la membrane plasmique des cellules et libèrent leur contenu dans le cytoplasme. Les acides nucléiques devront ensuite pénétrer dans le noyau afin d'être transcrits.

Les cellules sont ainsi co-transfectées avec des quantités identiques de chacun des 4 plasmides (pMD2.G, pMDLg/pRRE, pRSV-Rev et FU-Eos4- GABA<sub>A</sub>Rγ2/δ) puis sont ensuite incubées à 32°C au lieu de 37°C, afin de limiter la division des cellules au profit de la production de lentivirus, et avec un taux de CO<sub>2</sub> de 5%. Le lendemain le milieu est remplacé par du Neurobasal complet frais. Le surlendemain le milieu de culture contenant les lentivirus est récupéré et filtré sur un filtre de 0,45 µm avant d'être aliquoté et stocké à -80°C.



**Figure 12** : Schéma du système de production de lentivirus de troisième génération, d'après Addgene.

## II - Culture primaire d'hippocampe de souris

Les embryons de souris sont récupérés après 17,5 jours de gestation. Les hippocampes (en moyenne 12) sont disséqués sous loupe binoculaire dans du milieu de dissection composé de HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) 1X (Thermo Fischer) et d'HEPES à 20 mM (Thermo Fischer), réfrigéré sur glace. Ils sont ensuite transférés sous un poste de sécurité microbienne afin de poursuivre la préparation en condition de stérilité et à température ambiante. Une première dissociation des tissus est faite par trypsination : les hippocampes sont transférés dans 3 ml de milieu de dissection additionné de 0,25% de trypsine (2,5% ThermoFisher) et mis à incuber pendant 15 min à 37°C. La réaction est ensuite stoppée par transfert des tissus dans un nouveau tube contenant 5 ml de milieu d'ensemencement incluant du sérum composé de Minimum Essential Medium et de solution saline équilibrée de Earle (MEM/EBSS, Pan biotech), de GlutaMAX 1X (Gibco), de Sodium pyruvate 1 mM et avec 10% de sérum de cheval. Après une première décantation des tissus, ils sont de nouveau transférés pour une seconde décantation sur un nouveau tube contenant 5ml de milieu d'ensemencement, ce qui permet un bon rinçage. Les tissus sont ensuite aspirés et transférés dans un dernier tube contenant 3 ml de milieu d'ensemencement additionné de 1 mg de DNase I. A cette étape les tissus sont délicatement dissociés par aspiration refoulement à l'aide d'une pipette P1000 (20 aller/retours maximum). L'ajout de Dnase I, permet d'éviter les agrégats dus à la libération d'ADN dans le milieu. Le but ici est d'avoir la suspension la plus homogène possible tout en évitant une action mécanique trop longue et violente qui diminuerait le taux de survie des cellules.

Un aliquot de la suspension cellulaire dilué au 1/2 avec une solution de bleu de trypan (0,4% dans PBS) est utilisé pour compter les cellules en chambre de Malassez.

Les cellules sont ensuite ensemencées dans des plaques de 12 puits contenant des lamelles de verre recouvertes de solution de poly-DL-ornithine hydrobromide (80 µg/ml/puit) à une concentration de 100 000 cellules / puits dans le milieu d'ensemencement. Nous ne voulons pas un réseau de neurones trop dense afin de faciliter les observations microscopiques. Après 3h d'incubation à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, le milieu d'ensemencement est remplacé par 1 ml de milieu nutritif composé de milieu Neurobasal

additionné du supplément B27 1X et de GlutaMAX 1X. Ce milieu dépourvu de sérum et d'antibiotique permettra une bonne survie des neurones en limitant les facteurs qui pourrait interférer avec les propriétés neuronales.

Les cultures sont ainsi maintenues jusqu'à trois semaines, en ajoutant 300 µl de milieu nutritif par puits toutes les semaines, afin de compenser l'évaporation du milieu et d'ajouter les nutriments nécessaires à la survie des neurones, et ce en limitant au maximum les gestes afin d'éviter de contaminer les cellules.

### **III – Observation des neurones en culture**

#### ***1. Immunomarquage des neurones en culture***

Les neurones en culture sont fixés après retrait de leur milieu nutritif avec une solution de paraformaldéhyde (PFA) 4% p/v pendant 10 min à 37°C, puis rincés avec 3 bains de 5 min dans du tampon phosphate salin (PBS). Les cellules sont ensuite perméabilisées pour permettre la pénétration intracellulaire des anticorps avec un bain de Triton X-100 à 0,1% dans du PBS, pendant 10 minutes à température ambiante. Après 3 rinçages de 5 min, on effectue un blocage des cellules avec de l'albumine de sérum bovin (BSA) à 3% p/v pendant 1 heure à température ambiante afin de limiter les sites de fixation non spécifiques des anticorps. L'anticorps primaire est dilué dans la solution de blocage de BSA et incubé pendant 1h à température ambiante. Après trois rinçages de 5 min au PBS, l'anticorps secondaire et la sonde Sylite sont incubés de la même manière que l'anticorps primaire. L'utilisation de la sonde Sylite, récemment développée (Khayenko et al. 2022), présente plusieurs avantages par rapport à l'utilisation des anticorps existant dirigés contre la géphyrine. La sonde peptidique grâce à sa petite taille présente une meilleure pénétration des tissus et permet également une meilleure résolution spatiale en microscopie super-résolutive. De plus, cette sonde se fixe au site de liaison de la géphyrine aux GABA<sub>A</sub>R et GlyR, ce qui en fait une sonde spécifique des isoformes actifs de la géphyrine (ce qui n'est pas le cas des anticorps existants pour la géphyrine).

Anticorps I <sup>aire</sup>	Protéine	Espèce	Type	Fournisseur	Dilution	Référence
mAb7a	S270-phospho-géphyrine	Souris	Monoclonal	Synaptic Systems	1/1 000	147011

Anticorps II <sup>aire</sup>	Protéine	Espèce	Type	Fournisseur	Dilution	Référence
Goat anti-mouse	IgG	Chèvre	Alexa 555	Invitrogen	1/2 000	A21424
Sonde peptidique						
Sylite	Géphyrine		Alexa 647	Khayenkho et al.	50 nM	

**Tableau 1:** Liste des anticorps et de la sonde peptidique utilisés pour l'immunomarquage des neurones.

## 2- Condition d'imagerie classique des neurones

Les images sont prises avec le microscope Zeiss ELYRA PS.1, en mode champs large, avec l'objectif 100X et la lentille 1,6X. Nous prenons 8 champs par lamelle dans chacun des trois canaux en cherchant les champs dans le canal rouge lointain du marquage de la géphyrine avec la sonde Sylite. 3 images dans chacun des 3 canaux sont prises pour chaque champ, puis ces trois images seront moyennées. Le laser 488 nm est utilisé pour détecter la fluorescence dans le vert de mEos4b, réglé à la puissance de 0,2%, 100 ms de temps d'exposition et un gain de 300. Pour révéler l'anticorps secondaire Alexa fluor 555 de la géphyrine 7a, on utilise le laser à 561 nm, réglé à la puissance de 1%, avec 50 ms de temps d'exposition et un gain de 200. Et enfin pour imager la fluorescence de la sonde Sylite dans le rouge lointain, on utilise le laser 642 nm réglé à 10 % de la puissance, avec 100 ms de temps d'exposition et un gain de 300 ms. La taille de chaque champ est de 512 x 512 pixels.

## IV- Conditions d'analyse PALM des moelles épinières

### 1. Préparation des moelles épinières pour la microscopie PALM

Les souris ont été perfusées avec 4 % de PFA et 0,1% v/v de glutaraldéhyde dans du PBS pH 7,4. Après 30 min de repos sur glace, les moelles épinières ont été disséquées dans du PBS, puis post-fixées dans un bain de PFA 4% p/v dans du PBS pendant toute une nuit à

4°C. Ensuite un rinçage au PBS a été réalisé avant un dernier bain de saccharose à 30% p/v toute une nuit à 4°C.

Ces moelles sont coupées en segments thoraciques et lombaires puis enrobées dans du milieu cryoprotectant Neg-50 avant d'être mis au congélateur -80°C pour être stockées. Pour obtenir des images PALM de bonne qualité, l'épaisseur de la coupe doit être la plus fine possible, car nous ne faisons pas de sections axiales avec le microscope. A l'aide du cryostat CM3050S de Leica, réglé à -23°C pour la chambre et -21°C pour l'objet, les coupes sont réalisées avec une épaisseur de 4 µm, déposées sur des lames SuperFrost Plus et recouvertes de PBS et de lamelles de 0,17µm d'épaisseur de type #1,5, puis scellées avec un polymère siliconé (Twinsil speed 22, Picodent). Les lames ainsi préparées sont directement utilisées pour l'imagerie en PALM.

## **2. Réglage du microscope pour l'imagerie PALM**

L'imagerie de super résolution à molécule unique est réalisée sur le poste de microscopie Zeiss ELYRA PS.1. Les échantillons sont placés sur le plateau motorisé de scan en xy du microscope inversé Axio Observer.Z1 SR. Ils sont observés à travers un objectif 100x Plan-Apochromat à immersion dans l'huile (N.A 1,46) additionné d'une lentille 1,6. La caméra qui détecte les signaux émis par l'échantillon est une Andor iXon 897 back-thinned EMCCD (16 bit, 512 x 512 pixels, 16 µm de taille réelle de pixel, efficacité Quantum 90% ; la capacité de transformer les photons en électrons), il en résulte une image avec une taille de pixel de 100 nm.

Pour détecter la fluorescence dans le vert de mEos4b, on utilise le microscope en mode champs large avec une illumination laser à 488 nm (puissance nominale de 100 mW), et un filtre d'émission de bande passante 495-575 nm et un filtre passe bas de 750 nm. Pour imager mEos4b dans le rouge on utilise le laser UV à 405 nm (50 nW) pour la conversion et le laser à 561 nm (300 mW) pour l'excitation. La lumière émise est filtrée par un filtre bande passante 570-650 nm et passe bas 750 nm. Les images sont acquises avec le logiciel Zen software (Zeiss, Zen 2012 SP5 FP3 black, 64 bit).

### **3. Paramètres d'acquisition des moelles en mode PALM**

Premièrement, il faut identifier les synapses glycinergiques dans la matière grise des moelles en cherchant le signal de mEos4b dans le vert avec le laser 488 nm à très faible intensité, car la forme fluorescente verte photoblanchit rapidement. Des images de la forme non convertie de mEos4b-GlyR $\beta$  sont prises comme référence avec un temps d'exposition de 100 ms (25 captures, taille de l'image 256 x 256 pixels) et sont moyennées. Ensuite pour faire l'acquisition PALM, on enregistre un film de 20 000 images avec une illumination simultanée du laser 561 nm (à 80% de puissance constante, 50 ms de temps d'acquisition, avec un gain EM de 300) et du laser 405 nm pour la photoconversion (puissance graduelle de 0,01 à 5% au cours des 20 000 images). Au bout des 20 000 images tous les fluorochromes sont photoblanchis.

### **4. Analyse des images PALM**

Les films PALM sont analysés avec le logiciel ZEN PALM. Plusieurs paramètres doivent être spécifiés afin que la détection des signaux soit la plus optimale possible. Nous avons choisi une taille de masque de détection de 9 pixels minimum, un seuil d'intensité de 6 (ratio signal sur bruit), et les chevauchements de signaux sont exclus de l'analyse. Pour corriger le décalage qu'il peut y avoir au cours de l'acquisition qui dure une quinzaine de minutes, on applique une correction par corrélation temporelle des coordonnées de détection. L'image super résolue qui résulte de ces traitements représente chaque détection par une distribution gaussienne d'une largeur de 10 nm et une taille de pixel de 10 nm.

Ensuite pour détecter les amas denses de mEos4b-GlyR $\beta$  censés représenter les synapses glycinergiques parmi les spots représentés sur l'image super résolue, le module Spot Detector du logiciel Icy (<https://icy.bioimageanalysis.org>, v. 2.4.3.0, Institut Pasteur) a été utilisé avec les paramètres suivants : échelle 3 et 4, sensibilité 100, et filtre de taille 100-2000 px. Ce logiciel réalise une segmentation de l'image par analyse d'ondelettes, il en résulte une détection de structures fluorescences prenant en compte le bruit de fond local. Les résultats sont présentés sous forme de table de régions d'intérêt (ROIs) indiquant l'aire des spots retenus en pixels.

## **5. Analyses statistiques**

La normalité de la distribution des données est testée avec un test de Shapiro-Wilk. Pour des données non paramétriques, on utilise le test de rang non apparié de Wilcoxon-Mann-Whitney. L'hypothèse nulle est qu'il n'y pas de différence entre les deux groupes comparés. Cette hypothèse est rejetée pour une p-value < 0,05. Pour comparer plus de deux groupes, le test de r Kruskal-Wallis est utilisé. Si le résultat de p-value < 0,05 est vérifié, on procède à un test de Dunn afin d'identifier quels sont les groupes significativement différents.

L'analyse de corrélation utilisée pour comparer les différences de traitement des NAS sur les neurones est effectuée avec un test de Spearman.

La représentation graphique en boîte à moustaches représente la distribution des données avec un rectangle délimité par les 25<sup>ème</sup> et les 75<sup>ème</sup> quantiles. La barre qui traverse le rectangle représente la médiane et les moustaches représentent 1,5 fois l'écart entre les quartiles. Les données qui ne sont pas comprises dans cet intervalle sont représentées par des points. Le point noir dans les boîtes représente la moyenne des données. Les tests statistiques et les représentations graphiques de ces tests ont été faits avec le logiciel RStudio version.4.3.1.

## **V - Conditions des analyses SIM**

### **1. Immunomarquages des coupes de cerveaux**

Les cerveaux de souris fixés et cryoconservés à -80°C dans du cryoprotectant (OCT NEG-50) sont sectionnés avec une épaisseur de 14 µm au cryostat (CM3050S, Leica). Le tissu est ensuite perméabilisé et bloqué dans un bain de BSA 4% avec Triton X-100 à 0,25%. Ensuite les anticorps primaires sont incubés une nuit à 4 °C, ils sont dilués dans une solution de BSA à 1% avec Triton X-100 à 0,06%. Après 3 rinçages de 5 min le lendemain, les coupes sont incubées avec les anticorps secondaires mélangés à la sonde peptidique Sylite dans la solution de BSA à 1% avec Triton X-100 à 0,06%, pendant 4h à température ambiante. Pour finir, les lames sont rincées 3 fois 5 min dans du PBS, sellées avec des lamelles en verre dans du PBS et imagées.

Anticorps I <sup>aire</sup>	Protéine	Espèce	Type	Fournisseur	Dilution	Référence
Anti-spectrin beta-4	Spectrine $\beta$ 4	Lapin	Polyclonal	Thermo	1/1000	PA5-62972
Anti-GABA b3	Sous-unité $\beta$ 3 du GABA <sub>A</sub> R	Souris	Monoclonal	Neuromab	1/500	75-149

Anticorps II <sup>aire</sup>	Protéine	Espèce	Type	Fournisseur	Dilution	Référence
Donkey anti-rabbit	IgG	Ane	Alexa 488	Jackson	1/1 000	7111-545-152
Donkey anti-mouse	IgG	Ane	CF 568	Sigma	1/1 000	SAB4600075
Sonde peptidique						
Sylite	Géphyrine		Alexa 647	Khayenkho et al.	200 nM	

**Tableau 2** : Liste des anticorps et de la sonde peptidique utilisés pour l'immunomarquage des coupes de cerveau de souris.

## 2. Paramètres d'acquisition de la microscopie à illumination structurée (SIM)

L'imagerie SIM est réalisée sur le poste de microscopie Zeiss ELYRA PS.1. Les échantillons sont placés sur le plateau motorisé de scan en xy du microscope inversé Axio Observer.Z1 SR. Ils sont observés à travers un objectif 63x Plan-Apochromat à immersion dans l'huile (N.A. 1,40) additionné d'une lentille 1,6. La caméra qui détecte les signaux émis par l'échantillon est une Andor iXon 885 EMCCD (16 bit, 1004 x 1002 pixels, 8  $\mu$ m de taille de pixel réelle, efficacité Quantum de 65%, la capacité de transformer les photons en électrons), il en résulte une image avec une taille de pixel de 80 nm.

Le système dispose de cinq grilles avec des espacements différents. Pour chaque laser utilisé la taille de grille la plus appropriée pour obtenir la meilleure qualité d'image possible est sélectionnée par le logiciel Zen. La grille fait trois rotations (cinq possibles) et pour chacune des rotations elle se déplace sur cinq positions différentes. Le laser 488 nm pour imager la spectrine est réglé à 2% de la puissance maximale, avec un temps d'exposition de 50 ms et un gain de 8, en utilisant la grille G1 (23  $\mu$ m). Le laser 561 nm pour imager l'immunomarquage de GABA<sub>A</sub>R est réglé à 0,3%, avec un temps d'exposition de 50 ms, un gain de 8 et la grille G2 (28 $\mu$ m). Le laser 642 nm pour imager la géphyrine (marquée au Sylite) est réglé à 15%, avec un temps d'exposition de 100 ms et un gain de 15 et utilise la grille G3 (34 $\mu$ m). Après l'acquisition nous utilisons le logiciel ZEN pour la reconstruction de l'image super résolue dans l'espace de Fourier en sélectionnant le mode « structured illumination » et en gardant les paramètres de calculs automatiques. La taille de pixel dans

l'image SIM reconstruite est de 40 nm, ce qui correspond au gain en résolution d'un facteur de 2 par rapport à l'imagerie à fluorescence conventionnelle

### **3. Paramètres d'acquisition du Segment Initial Axonal en microscopie confocale**

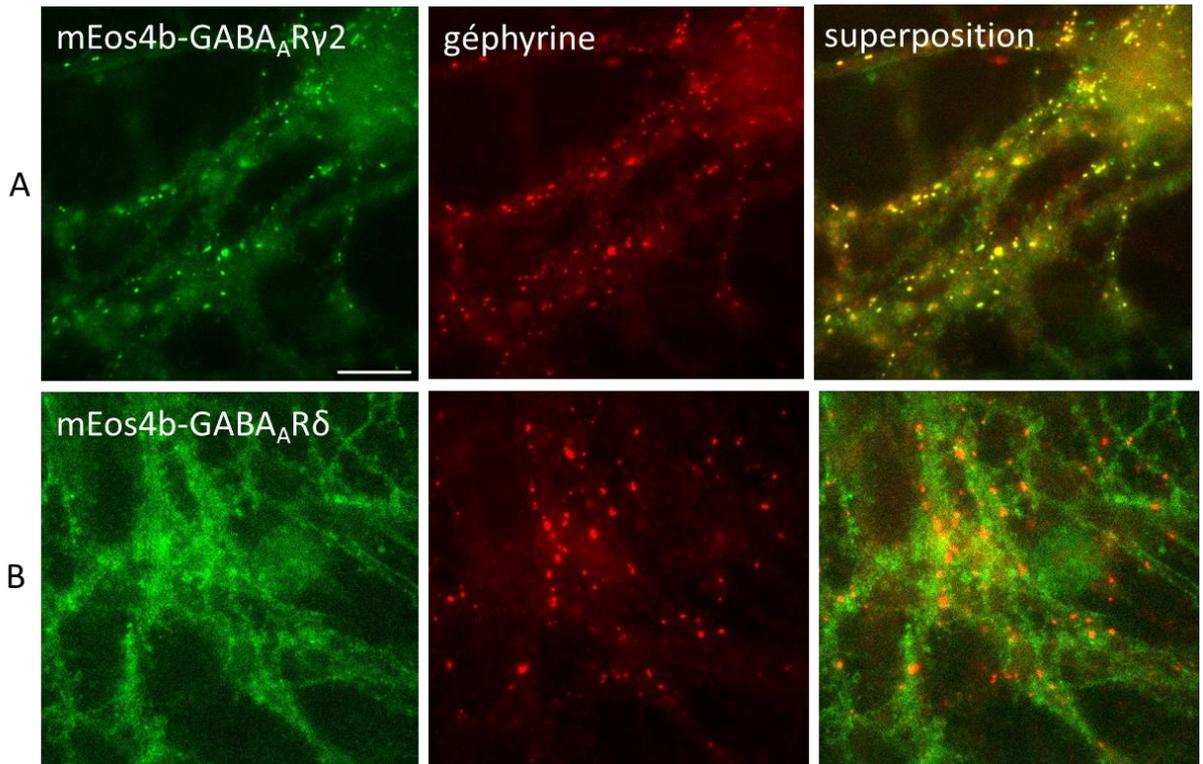
Le poste de microscopie confocale est un Leica SP8 comprenant un microscope DMI6000. 3 lasers sont utilisés : Argon à 20% de puissance, DPS5 et HeNe. Le grossissement est fait avec l'objectif 63x en immersion à huile. Le détecteur utilisé pour capter l'intensité de la fluorescence engendrée par les lasers est un photomultiplicateur hybride HyD3 mis en mode de comptage de photons. Les paramètres d'acquisition dans le logiciel Leica LAS X sont les suivants : 16 bits en mode xyz, une résolution de 512 x 512 pixels est imagée. Un zoom numérique de 3x est préalablement introduit avec une ouverture du pinhole de 1 (Airy 1), produisant une taille de pixel de 120 nm en x et y. Une seule section optique est acquise pour chaque image avec une épaisseur de  $z = 0,9 \mu\text{m}$ . Pour augmenter le signal de fluorescence et minimiser en même temps le bruit de fond relatif aux signaux de l'acquisition, l'image finale est constituée d'une accumulation de 3 images par le logiciel avec un scan séquentiel sur chaque image et dans chaque longueur d'onde. Pour procéder à l'acquisition, en double couleurs nous réglons les paramètres dans les différents canaux comme suit : Excitation dans le rouge lointain (633 nm) à 10% de la puissance du laser puis émission recueillie par le détecteur sur la plage 645-740 nm ; excitation dans le vert (488 nm) à 10% de la puissance du laser puis détection sur la plage 500-550 nm.

# Résultats

# I. Etude de l'effet des neurostéroïdes sur les GABA<sub>A</sub>R

## 1. Détection des GABA<sub>A</sub>R synaptiques et extra-synaptiques

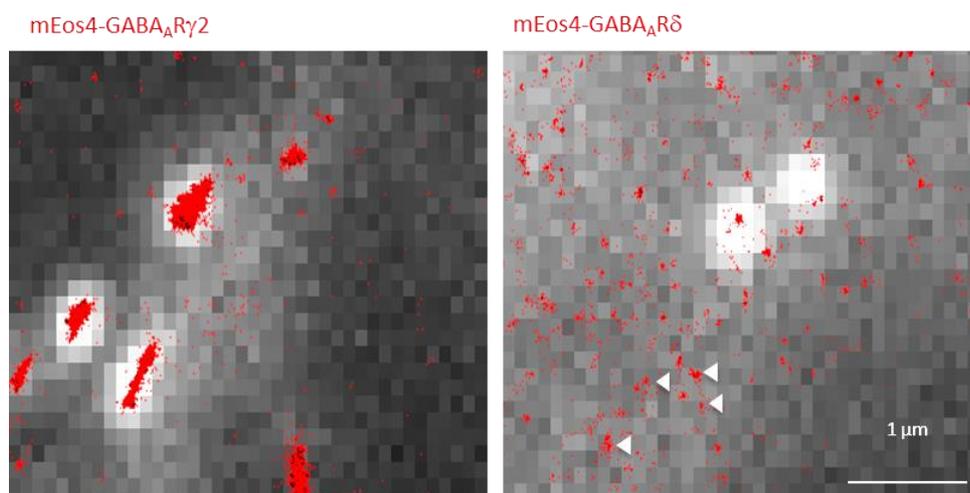
La régulation de l'inhibition neuronale via les récepteurs du GABA est contrôlée par différents ajustement dynamiques dont la mobilité des récepteurs dans la membrane synaptique (Gouzer et al. 2014). Dans le but de caractériser les changements induits par les neurostéroïdes sur la distribution synaptique et extra-synaptique des récepteurs du GABA, nous avons créé des lentivirus exprimant les sous-unités gamma2 et delta du récepteur du GABA, qui représentent respectivement les deux sous-populations synaptiques et extra-synaptiques du récepteur (Belelli et al. 2009; Brickley et Mody 2012). Ces sous-unités sont fusionnées au fluorochrome mEos4b (Segala et al. 2015) afin de pouvoir imager les sous-unités des récepteurs lorsqu'elles seront exprimées dans nos neurones d'hippocampe de souris en culture. Le choix de l'hippocampe pour faire nos cultures primaires de cellules neuronales repose sur le fait que cette zone du cerveau est impliquée dans de nombreuses pathologies notamment en lien avec l'anxiété (Joëls 2008). L'hippocampe est facilement identifiable pour être isolé, est bien décrit et utilisé dans la plupart des études se rapportant à des cultures de neurones. La première étape a donc été de vérifier la répartition de ces sous-unités en transduisant nos cultures primaires d'hippocampe avec nos lentivirus. Nous n'avons pas titré nos productions de lentivirus, sachant que des constructions précédentes utilisant le plasmide FUGW-EGFP ont déjà été titrées à environ 10<sup>8</sup> lentivirus/ml en comptant la fluorescence EGFP dans des cellules HEK (Waites et al. 2009). Les sous-unités génétiquement modifiées sont censées s'associer avec les sous-unités endogènes pour former des récepteurs du GABA fonctionnels, puis migrer dans les membranes des neurones. Pour identifier la présence des synapses, nous avons fait des marquages des neurones avec un peptide spécifique de la géphyrine, Sylite (Khayenko et al. 2022), qui est la principale protéine d'échafaudage dans les synapses inhibitrices et qui permet le regroupement synaptique des récepteurs du GABA (Tretter et al. 2012). Nous avons d'abord regardé l'expression et la distribution des récepteurs par microscopie classique, en utilisant la fluorescence de la forme non-convertie de mEos4b dans le canal vert (excitation 488 nm, émission 495-575 nm) (Figure 13).



**Figure 13** : Répartition synaptique et non-synaptique des sous-unités  $\gamma 2$  (A) et  $\delta$  (B) : Images représentatives des dendrites de neurones d'hippocampe infectés par les lentivirus après 5 jours de culture (DIV 5 pour l'anglais 'Day in Vitro'). et imagés à DIV 17 après un marquage de la géphyrine (Sylite, canal rouge lointain). Le contraste de l'image B en vert (signal mEos4b non converti) a été augmenté pour visualiser la fluorescence de mEos4b-GABA<sub>A</sub>R $\delta$ . Echelle 10 $\mu$ m. Acquisition en champs large.

On peut constater que la sous unité  $\gamma 2$  colocalise avec le marquage en amas de la géphyrine, montrant ainsi sa localisation synaptique. En revanche, la sous-unité  $\delta$  est beaucoup plus diffuse dans les neurones et ne forme pas d'amas qui colocalisent avec la géphyrine, ce qui suggère que cette sous-unité ne s'accumule pas aux synapses. D'ailleurs, le niveau d'expression de mEos4b-GABA<sub>A</sub>R $\delta$  semble beaucoup plus faible que celui de mEos4b-GABA<sub>A</sub>R $\gamma 2$ , ce qui complique la détection. Dans l'image verte ci-dessus, le contraste a été ajusté manuellement pour que le signal de mEos4b-GABA<sub>A</sub>R $\delta$  diffus devienne visible. Vu que l'intensité est proche du niveau d'autofluorescence dans le canal vert, une quantification exacte par microscopie à fluorescence conventionnelle n'est donc pas possible. En revanche, avec la microscopie PALM, nous pouvons espérer détecter de faibles quantités de protéines et des différences subtiles de répartition des sous-unités GABA<sub>A</sub>R puisque la technique nous permet de visualiser des molécules individuelles avec une haute résolution spatiale.

J'ai donc également regardé les neurones avec les mêmes marquages que précédemment en microscopie PALM (Figure 14). Pour cela, j'ai converti le fluorophore mEos4b du vert au rouge grâce à l'illumination continue avec un laser dans le spectre UV (405 nm). Après l'acquisition de plusieurs milliers d'images, les signaux des fluorophores individuels sont détectés, localisés et combinés pour reconstituer des images pointillistes, comme décrit dans les méthodes. J'ai constaté (Figure 13) une densité très élevée de détections de la construction mEos4b-GABA<sub>A</sub>R $\gamma$ 2 dans les structures marquées par la géphyrine (Sylite), ce qui confirme l'enrichissement de cette sous-unité au niveau des synapses. Grace à la précision de localisation, ces images permettent de mesurer plus exactement la taille et l'orientation des synapses inhibitrices. Dans le cas de mEos4b-GABA<sub>A</sub>R $\delta$  aucune accumulation des détections n'est observée dans les clusters de géphyrine, ce qui indique que cette sous-unité n'est pas du tout localisée au niveau synaptique. En revanche, une distribution diffuse du récepteur est clairement présente en dehors des synapses, sous forme de petits nanoclusters (indiquées par des flèches dans la figure 14). Ces clusters représentent la détection répétée de fluorophores mEos4b provenant d'un même récepteur extra-synaptique. Ces résultats valident nos constructions lentivirales et la représentativité de ces sous-unités pour distinguer les populations synaptiques et extra-synaptiques des récepteurs du GABA.



**Figure 14** : Superposition de l'image du marquage de la géphyrine (Sylite) en gris pris en microscopie classique en champs large et de l'image super-résolue pointilliste des détections en mode PALM des sous-unités  $\gamma$ 2 ou  $\delta$  du récepteur du GABA en rouge. Chaque point rouge correspond à la position d'une détection d'un fluorophore.

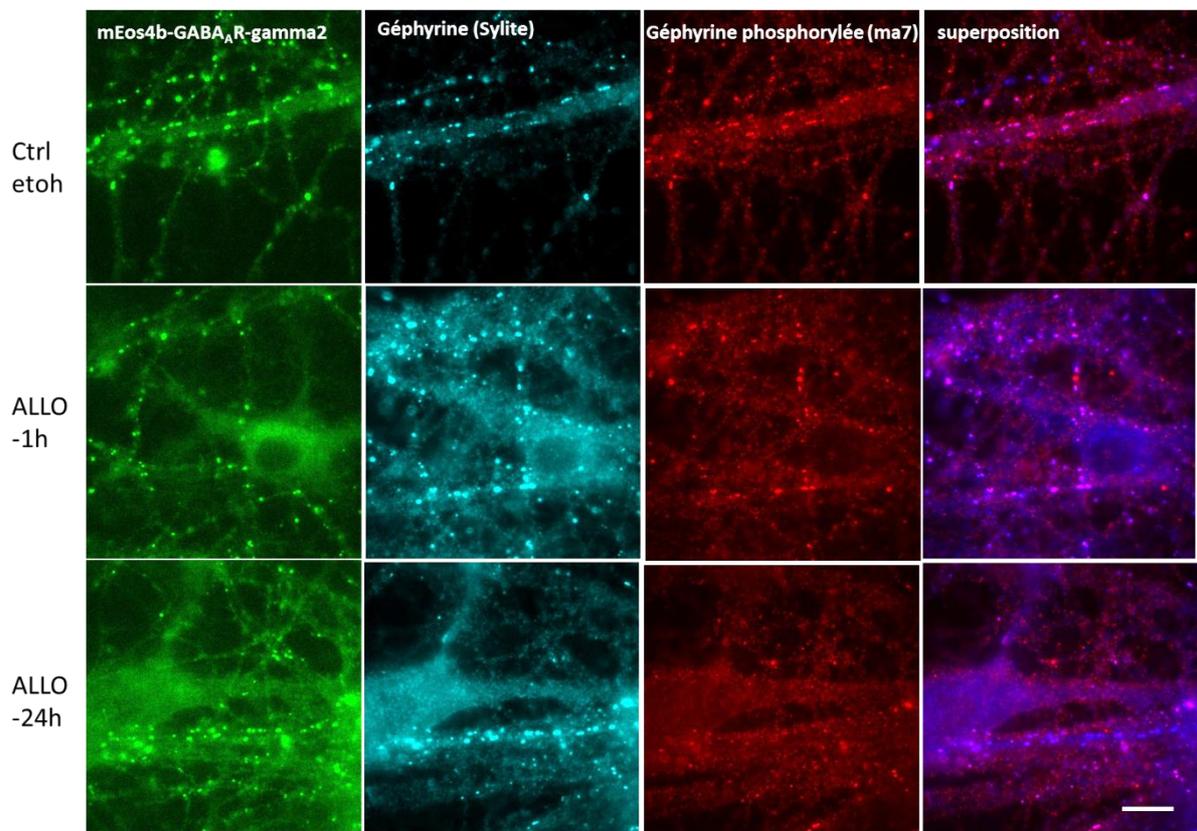
## **2. Effet des neurostéroïdes**

Pour commencer, nous avons choisi un premier neurostéroïde pour tester les conditions expérimentales de cette étude, l'alloprégnanolone (ALLO), un neurostéroïde endogène ayant un effet allostérique positif sur l'inhibition neuronale. Nous voulons évaluer son effet à court (1h) et long terme (24h) sur la répartition des récepteurs GABAergiques synaptiques et extra-synaptiques. Les neurostéroïdes auraient des effets plus marqués sur les récepteurs extra-synaptiques et faibles sur les récepteurs synaptiques (Belelli et al. 2002). De plus les effets pharmacologiques des modulateurs allostériques des GABA<sub>A</sub>Rs diffèrent selon le temps d'application, et c'est d'ailleurs un point intéressant à étudier, puisque des effets de désensibilisation à ces drogues sont généralement observés suite à des traitements prolongés (Vinkers et Olivier 2012). Dans le cas du Bréxanolone, les effets bénéfiques sur la dépression du post partum sont observés jusqu'à 30 jours après l'injection du NAS, ce qui indique qu'il y a des mécanismes ayant des effets à long terme qui se mettent en place (Edinoff et al. 2021). Nous avons ainsi utilisé l'alloprégnanolone à une concentration de 100 nM sur nos cellules pendant 1h et 24h. De même nous avons également appliqué du SAGE-217, un neurostéroïde synthétique avec un profil pharmacologique similaire à l'alloprégnanolone (Althaus et al. 2020), dont nous nous servons comme point de comparaison pour renforcer nos résultats.

Nous avons marqué les cellules avec deux marqueurs différents de la géphyrine : un anticorps anti-géphyrine (m7a) qui reconnaît un site phosphorylé de la protéine (Kuhse et al. 2012) et une sonde peptidique Sylite de haute affinité pour la géphyrine (Khayenko et al. s. d.), non dépendante de la phosphorylation, qui reconnaît le site de fixation des récepteurs du GABA. Comme expliqué dans l'introduction (I-2) l'utilisation d'un marqueur de la géphyrine sensible à la phosphorylation, nous permet d'avoir des informations sur le niveau de phosphorylation de la géphyrine qui pourrait être un mécanisme potentiel de régulation des synapses inhibitrices par les NAS.

Pour visualiser les neurones traités et immunomarqués, nous avons d'abord sélectionné les conditions expérimentales nous permettant d'observer des effets systématiques des traitements. C'est pourquoi nous avons choisi dans un premier temps de faire des acquisitions en microscopie classique à champ large pour échantillonner

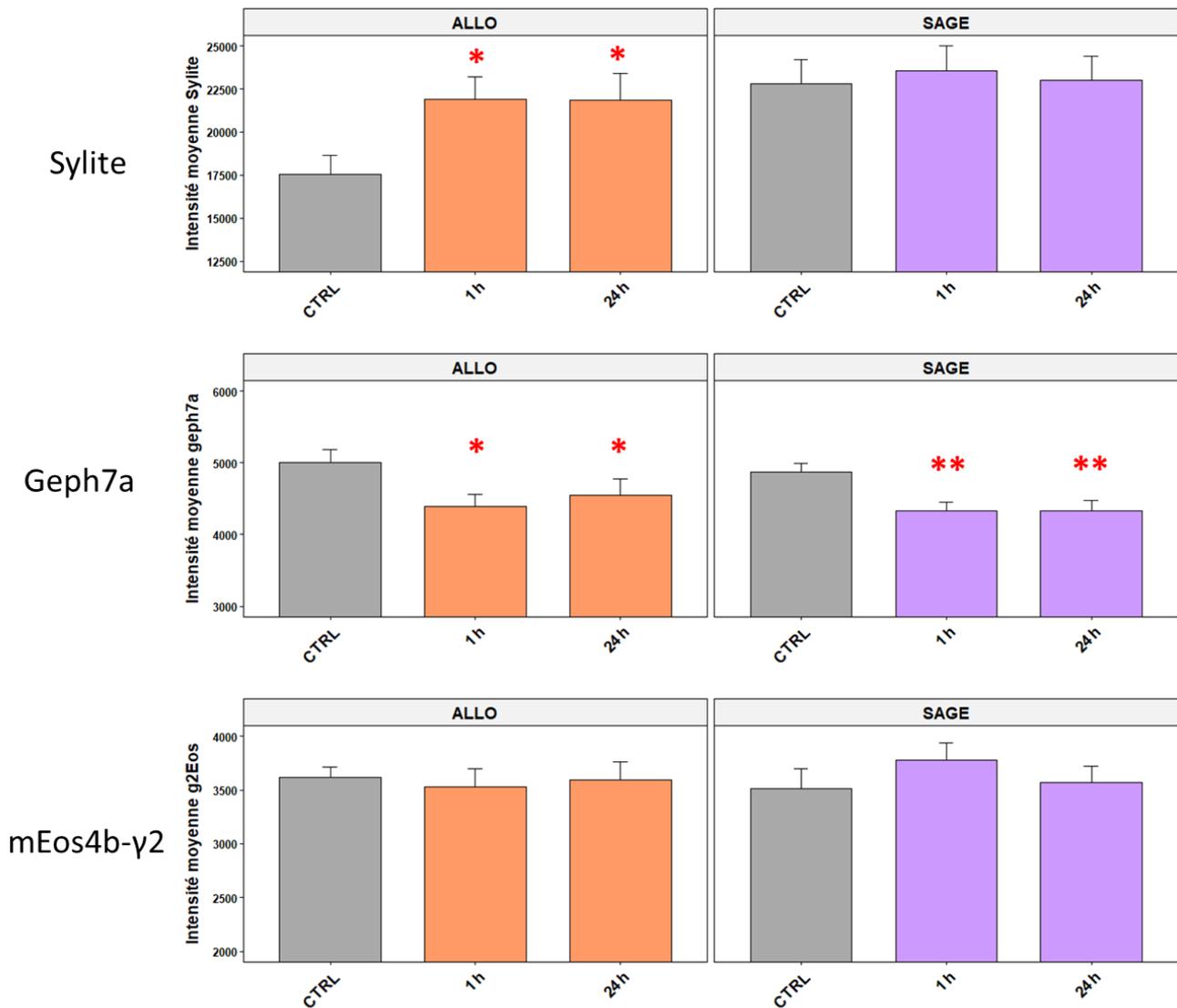
rapidement le plus de neurones possible dans les différentes conditions et observer des premières tendances en fonction des différents traitements. Etant donné que les sous-unités  $\gamma$  du récepteur ne forment pas de clusters, il est compliqué d'analyser ces récepteurs en microscopie classique (voir I-1.), c'est pourquoi les résultats montrent uniquement les expériences réalisées sur les neurones transduits par la sous-unité GABA<sub>A</sub>R $\gamma$ 2-mEos4b (Figure 15).



**Figure 15** : images représentatives de neurones infectés avec la sous-unité GABA<sub>A</sub>R $\gamma$ 2-mEos4b et marqués avec la sonde Sylite qui reconnaît la géphyrine totale et l'anticorps mAb7a qui reconnaît un épitope phosphorylé de la géphyrine. Les cellules sont fixées à DIV17 après 1h ou 24h de traitement à 100 nM d'allopérnanolone (ALLO). Echelle : 10 $\mu$ m.

Pour analyser ces images, nous avons détecté des clusters de géphyrine (Sylite) avec l'outil Spot Detector de Icy (voir méthodes). Ensuite, l'intensité de fluorescence dans ces clusters a été mesurée dans les trois canaux (vert : mEos4b, rouge : mAb7a, rouge-lointain :

Sylite (Figure 16). Bien que mes résultats préliminaires présentent une assez grande variabilité inter et intra expérimentale, nous observons des modifications systématiques qui sont probablement dues au traitement des NAS. Les seuls effets assez clairs que l'on remarque jusqu'à maintenant sont une augmentation des regroupements de géphyrine marquée avec le Sylite (après traitement ALLO à 1h et 24h,  $p = 0,013$  et  $0,017$ ) et une diminution du marquage de la géphyrine phosphorylée (ALLO à 1h et 24h  $p = 0,011$  et  $0,011$  et SAGE-217 à 1h et 24h  $p = 0,003$  et  $0,007$ ). Le poids statistique n'étant pas fort, d'autres expériences devront être faites pour renforcer ces résultats. Ces modifications constatées pourraient être liées ou indépendantes de la sous-unité  $GABA_A\gamma 2$  exprimée dans ces cellules, on ne sait pas si la surexpression de la sous-unité  $\gamma 2$  étudiée impacte le modèle, il faudra donc également vérifier si la surexpression de la sous-unité  $\gamma 2$  étudiée impacte le modèle. En revanche, les marquages des sous-unités ne montrent pas de changement significatif selon les traitements au NAS.

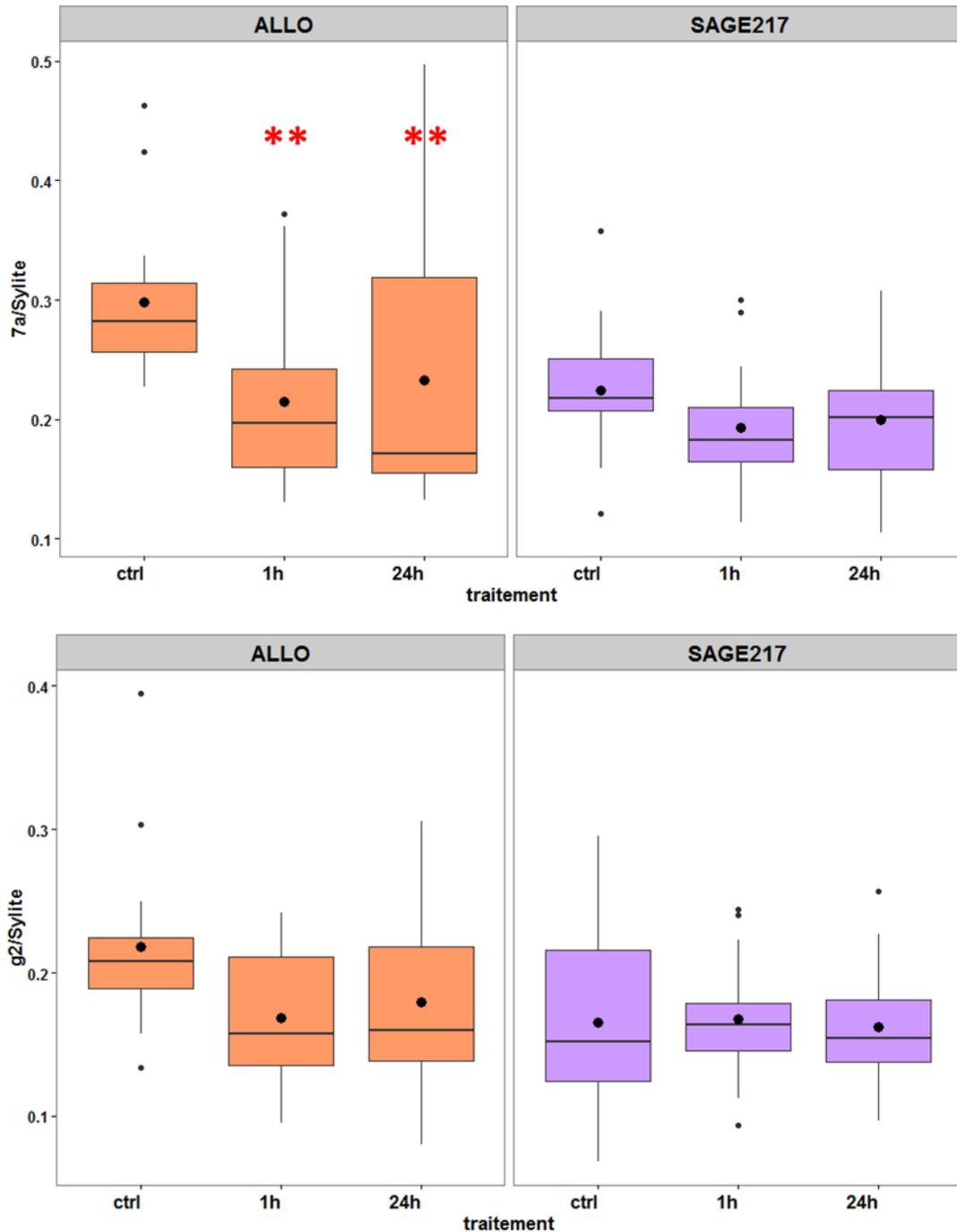


**Figure 16** : représentation des moyennes de fluorescence totale par cluster de la géphyrine marquée avec Sylite (A), la géphyrine phosphorylée avec mAb7a (B) et de mEos4b-GABA<sub>A</sub>Rγ2 (C) en condition de traitement à l'allopregnanolone (ALLO) et SAGE-217, les contrôles sont les diluants respectifs éthanol et DMSO (diméthylsulfoxyde). N = 16 images provenant de 2 lamelles différentes. Une image est la moyenne des fluorescences calculées pour environ 60 clusters de géphyrine par champ. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , test d'ANOVA non paramétrique de Kruskal-Wallis, suivi du test de Dunn de comparaison par paire. Barre d'erreur = écart-type.

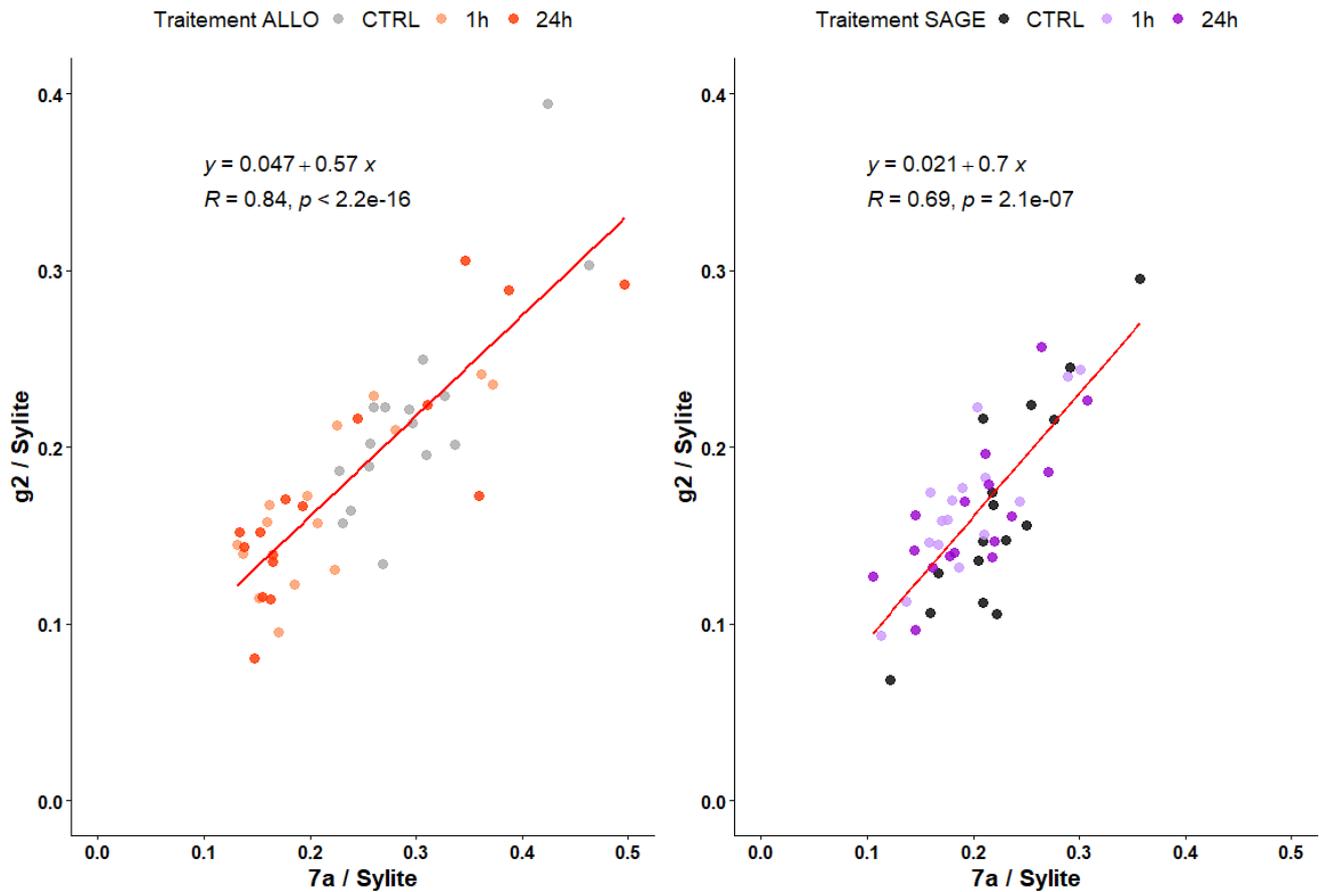
Le système expérimental étant assez variable, il est intéressant de regarder la variation des rapports d'intensité rapportée au marquage de la géphyrine totale (sylite) (Figure 17). En calculant les ratios mAb7a/Sylite et GABA<sub>A</sub>Rγ2/Sylite, les données deviennent indépendantes des tailles des synapses dans les images (types de neurones, densité de la culture, etc.), ce qui aide à diminuer une partie de la variabilité intrinsèque du modèle expérimental. Mes données montrent une diminution systématique des taux de phosphorylation de géphyrine

relative au niveau de géphyrine totale suite au traitement ALLO aiguë (1h) et long-terme (24h) ( $p=0,003$  et  $0,007$ ).

Vu la variabilité des résultats, d'autres d'expériences seront nécessaires pour valider ces observations, avant de continuer avec une analyse plus détaillée par microscopie super-résolutive. Cependant, la première conclusion qui peut être tirée, c'est que les niveaux de phosphorylation de la géphyrine changent en parallèle de la quantité de GABA<sub>A</sub>R $\gamma$ 2 aux synapses. Cela devient plus clair lorsqu'on représente la corrélation de variation du marquage de GABA<sub>A</sub>R $\gamma$ 2 en fonction des intensités du marquage de la géphyrine phosphorylée, le tout rapporté au marquage de la géphyrine totale (Figure 18).



**Figure 17** : Box-plot des intensités de fluorescence normalisées sur l'intensité du marquage de géphyrine totale (ratios mAb7a/Sylite et GABA<sub>A</sub>Rγ2/Sylite). N = 16 images provenant de 2 lamelles différentes. Une image est la moyenne des fluorescences calculées pour environ 60 clusters de géphyrine par champ. \*p ≤ 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, test d'ANOVA non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi du test de Dunn de comparaison par paire. Barre d'erreur = écart-type.



**Figure 18** : Corrélation entre la quantité de sous-unité gamma2 en fonction de la phosphorylation S270 de la géphyrine, normalisée sur la quantité de géphyrine totale. Test de corrélation de Spearman. Graphique de gauche : données en orange pour les traitements à l'ALLO 1h (clair) et 24h (foncé) et contrôle éthanol en gris. Graphique de droite : données en violet pour les traitements 1h (clair) et 24h (foncé) de SAGE-217 et contrôle DMSO en gris.

On peut observer sur la figure 18, qu'indépendamment de la quantité de géphyrine totale, une augmentation de la quantité de géphyrine phosphorylée à la position Sérine 270 (S270) est corrélée à l'augmentation de la quantité de récepteur du GABA. Ceci est vrai pour les deux jeux de données (ALLO et SAGE-217) ainsi que pour les trois groupes expérimentaux (contrôle, 1h, 24h).

### **3. Interprétation et discussion des résultats :**

Dans le but de comprendre les modes d'actions des NAS et en particulier celui de l'alloprégnanolone, nous avons observé en microscopie la répartition des sous-unités du récepteur du GABA  $\gamma 2$  et  $\delta$  couplées à la protéine fluorescente mEos4b dans des cultures primaires de neurones d'hippocampe de souris. Nous avons choisi ces deux sous-unités car elles sont représentatives des fractions synaptiques et extra synaptiques du récepteur et donc peuvent nous renseigner sur le mode de régulation induit par les NAS.

#### *3.1 Modèle cellulaire*

Nous avons choisi de travailler avec des cultures primaires plutôt qu'avec des lignées de cellules neuronales afin d'avoir des réseaux neuronaux dont les propriétés sont les plus proches possible de celles des cellules in vivo. D'ailleurs, la plupart des lignées cellulaires neuronales, n'expriment pas de GABA<sub>A</sub>Rs fonctionnels (Hales et Tyndale 1994) ou alors le phénotype exprimant les récepteurs du GABA doit être induit par incubation des cellules avec le facteur de croissance neuronale (NGF), molécule qui pourrait interférer grandement dans le système que l'on étudie. De plus, la plupart des expériences menées sur les récepteurs du GABA et les NAS, utilisent les cultures primaires de neurones plutôt que des lignées cellulaires, ce qui dans un souci de continuité de résultats nous conforte dans le choix de notre modèle cellulaire. Cependant, l'un des inconvénients majeurs de l'utilisation des cultures primaires est la difficulté d'obtenir des résultats reproductibles. En effet, le premier point à soulever dans nos résultats est la variabilité de nos observations. Le système de culture primaire de neurones est très sensible et d'une expérience à une autre beaucoup de changements sont observables dans les cultures, comme la prolifération des cellules gliales ou encore la présence de fibroblastes. Les différents types de neurones présents dans l'hippocampe contribuent également à la variabilité de nos mesures. Il est donc important de reproduire encore ces expériences afin d'avoir des résultats avec plus de confiance. Cependant d'autres facteurs rentrant en jeu peuvent nous empêcher d'observer clairement d'éventuels effets. En effet le niveau d'inhibition neuronale est interdépendant du niveau de l'excitation neuronale. Or, nous ne connaissons pas le niveau basal d'excitabilité du réseau neuronal d'une culture, et différents paramètres que nous ne maîtrisons pas peuvent faire varier cette excitabilité. C'est pourquoi il serait intéressant de bloquer les potentiels d'actions des neurones d'une culture pour ainsi réduire la variabilité entre cultures et entre

différents puits de la même culture. La tétrodotoxine (TTX) bloque les canaux sodiques responsables de l'excitation neuronale (Tukker et al. 2023) et pourrait donc servir dans notre cas afin d'éliminer cette variabilité. La TTX a été utilisée précédemment dans ce même but dans d'autres études sur la régulation de la distribution des GABA<sub>A</sub>R par des composants allostériques (Gouzer et al. 2014).

### *3.2 Caractérisation des taux de neurostéroïdes*

De plus, nous rajoutons des neurostéroïdes dans nos cultures. Or, nous ne connaissons pas les niveaux déjà présents dans les milieux de culture ainsi que les niveaux de leurs précurseurs. Afin de maîtriser au mieux ce système de culture, nous avons collecté les cellules et leurs milieux cellulaires dans plusieurs conditions expérimentales avant et après exposition aux neurostéroïdes, dans le but de les analyser en spectrométrie de masse afin de détecter les niveaux des neurostéroïdes et de leurs métabolites. La caractérisation du stéroïdome par chromatographie de phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS/MS) est faite par une plateforme spécialisée de notre unité (Liere et Schumacher 2015). Dans ce contexte, il sera intéressant de comparer la pharmacocinétique de ALLO avec celle de SAGE-217, un neurostéroïde synthétique. Cet éclairage nous permettra d'établir un meilleur contrôle et de réduire la variabilité du système de culture neuronale, ce qui nous aidera à plus facilement comparer les résultats provenant de différents laboratoires de manière générale.

Un troisième point intéressant à soulever, est l'utilisation concomitante des NAS avec des agonistes ou des antagonistes des récepteurs du GABA. Effectivement, puisque l'allostérie est dépendante de la fixation d'un agoniste sur le récepteur, nous envisageons d'utiliser du muscimol et de la gabazine, qui sont respectivement des agonistes et antagonistes du récepteur du GABA, afin d'amplifier les effets observables des NAS et également de mieux contrôler encore une fois le système. En effet, une étude (Gouzer et al. 2014) a montré que les effets additionnels de modulateurs allostériques et d'agonistes entraînent des résultats très différents que ceux obtenus avec l'utilisation de modulateurs seuls. Dans cette étude, l'effet du diazépam seul (modulateur allostérique) induit une diminution des clusters de GABA<sub>A</sub>R alors que l'effet du diazépam additionné de muscimol (agoniste) entraîne au contraire une augmentation des clusters de GABA<sub>A</sub>R. On apprend encore dans une autre étude (Kuver, Shen, et Smith 2012), que l'utilisation d'agoniste

(GABA) est nécessaire pour observer les effets de l'allopregnanolone sur la régulation des GABA<sub>A</sub>R dans les cultures de neurones d'hippocampe. Cette notion est donc un facteur important à prendre en compte dans nos études afin d'avoir conscience des différents paramètres susceptibles d'affecter nos résultats.

### *3.3 Phosphorylation de la géphyrine*

Nos résultats montrent qu'indépendamment des conditions de traitement utilisées, une diminution de la fraction phosphorylée de la géphyrine (mAb7a) aux synapses s'accompagne d'une diminution de la quantité des récepteurs aux synapses. Or, avec le traitement par des NAS, on observe une diminution de la fraction phosphorylée de la géphyrine alors que la géphyrine totale (Sylite) a tendance à augmenter (Figure 17), ce qui amplifie l'effet observé. L'anticorps anti-géphyrine 7a reconnaît une séquence de la protéine qui contient la sérine 270 (S270), et se lie uniquement si ce site est phosphorylé (Kuhse et al. 2012). Il a été montré que ce site est impliqué dans la capacité de la géphyrine à former des regroupements aux synapses (Battaglia et al. 2018), et que la diminution de la phosphorylation de ce site entraîne une diminution de la capture des récepteurs du GABA aux synapses (Niwa et al. 2019). Nos résultats sont en accord avec la littérature, et montreraient que les NAS ont un effet sur la mobilité des récepteurs du GABA via une régulation de la phosphorylation de la géphyrine. Nous constatons également une modification inverse pour ce qui est de la quantité totale de la géphyrine. Cette régulation inverse de la géphyrine totale et de la fraction phosphorylée a également été décrite précédemment (Lorenz-Guertin et al. 2019). Les auteurs de cet article ont montré que l'augmentation de la phosphorylation de S270 de la géphyrine est inversement corrélée à une diminution de la quantité de géphyrine totale dans des neurones corticaux traités au Diazépam, bien que dans ce cas, à l'inverse de nous, c'est une diminution de la géphyrine totale et une augmentation de la fraction S270 phosphorylée qui est constatée. Nous gardons en tête que la sonde peptidique Sylite se lie au site de fixation du récepteur du GABA et qu'il n'est pas exclu que la diminution des récepteurs du GABA aux synapses permette une meilleure insertion de la sonde sur la géphyrine. En d'autres termes, Sylite peut avoir une certaine préférence pour les sites de liaison des récepteurs libres, même s'il correspond généralement bien à l'intensité globale de mAb7a et de mEos4b-GABA<sub>A</sub>Rγ2, ce qui en fait une lecture précise des niveaux totaux de géphyrine (Khayenko et al. 2022.).

La littérature nous apprend que les NAS ont une action préférentielle sur l'inhibition tonique, donc non synaptique, et a priori non directement en lien avec la géphyrine. Des études sur des modèles de souris knock-out pour la sous-unité GABA<sub>A</sub>δ montrent la diminution des effets physiologiques de THDOC, un stéroïde qui agit également sur les GABA<sub>A</sub>R (Stell et al. 2003), ce qui confirme le rôle important de cette sous-unité pour transmettre l'action du NAS. Cependant, suivant le type de neurone, les sous-unités préférentielles de l'action des NAS sont variables (Lu et al. 2023). Les sites de fixation connus des NAS aux GABA<sub>A</sub>R se situant au niveau des sous-unités α et β (Germann et al. 2021), les NAS peuvent à priori agir sur les récepteurs contenant des sous-unités δ extra-synaptiques mais également les combinaisons de sous-unités contenant γ2. Ainsi, les NAS pourraient potentiellement impacter la géphyrine (et son niveau de phosphorylation) de manière indirecte via une régulation des interactions entre les GABA<sub>A</sub>R et leurs protéines d'échafaudage.

#### *3.4 Comparaison des résultats avec ceux de la littérature sur les effets des benzodiazépines*

Nous pouvons également mettre en parallèle nos résultats avec ceux de la littérature sur l'effet du Diazépam, une benzodiazépine (BZD) qui est un modulateur allostérique positif spécifique du récepteur du GABA et qui agit essentiellement sur les récepteurs synaptiques (son site de fixation de haute affinité est situé entre la sous-unité α et γ2 du récepteur (Sigel et Buhr 1997)). Les effets pharmacologiques des benzodiazépines étant comparables à ceux des NAS, il est intéressant de comparer leurs effets sur la régulation des GABA<sub>A</sub>R aux synapses avec ceux que nous observons avec les NAS. Les résultats de plusieurs études qui utilisent les BZD montrent des effets différents suivant le temps d'expositions aux BZD. Par exemple les études de (Lévi et al. 2015) et (Gouzer et al. 2014) montrent sur des cultures de neurones d'hippocampes que les BZD appliqué 1 ou 2h, augmentent la stabilisation des GABA<sub>A</sub>R aux synapses, et ce, sans changement visible sur les clusters de géphyrine. A l'inverse, les travaux de (Lorenz-Guertin et al. 2019) et (Jacob et al. 2012) révèlent une augmentation de la diffusion de des GABA<sub>A</sub>R et de la géphyrine suite aux traitements des neurones corticaux par les BZD pendant 24h. Il est important de souligner que les résultats provenant des différentes littératures sur l'effet des benzodiazépines sont assez compliqués à interpréter, car les conditions expérimentales sont rarement comparables. Or, comme

mentionné précédemment, nous avons vu que le système est très sensible à différents facteurs expérimentaux, que ce soit en termes de temps d'exposition et de concentration des molécules utilisées, des types de neurones mis en culture et des molécules additionnelles utilisées.

En résumé, étant donné les points de discussions soulevés par mes résultats encore très préliminaires, je vais continuer à tester différentes conditions pharmacologiques pour utiliser les NAS sur les cultures de neurones afin d'obtenir un système le plus reproductible possible et dont les résultats pourront être comparés avec la littérature déjà existante sur le sujet. J'ai également à ma disposition d'autres lentivirus exprimant les sous-unités mEos4b-GABA<sub>A</sub>R $\alpha$ 3,  $\alpha$ 2 et  $\beta$ 3, que je vais pouvoir utiliser afin d'avoir une idée plus spécifique des effets des NAS sur l'ensemble des configurations de récepteurs existantes. Une fois que mon système sera bien maîtrisé, je pourrais alors approfondir les résultats observés grâce à la microscopie PALM, qui permet de faire une quantification précise des quantités de récepteurs synaptiques et extra-synaptiques, de mesurer avec précision la taille et la morphologie des synapses inhibitrices en fonction de l'activité des neurostéroïdes, ou encore de mesurer la diffusion des récepteurs dans la membrane par le suivi de molécule unique dans des cellules vivantes.

## II. Analyse super-résolutive de la localisation synaptique de GlyR $\beta$ et de son rôle dans la maladie de l'Hyperekplexie.

### 1. Contexte

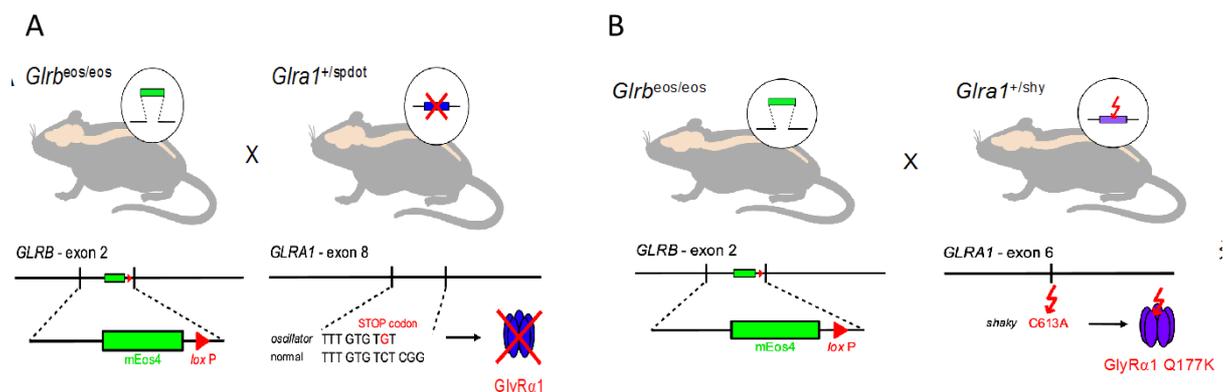
Dans cette deuxième étude, nous avons cette fois focalisé notre attention sur les synapses inhibitrices glycinergiques de la moelle épinière qui présentent des défauts de fonctionnement dans la maladie de l'hyperekplexie (Schaefer, Harvey, et Villmann 2022). Dans cette maladie, la majorité des mutations en cause touche la sous-unité alpha 1 du récepteur de la glycine (GlyR $\alpha$ 1) et peu d'informations sont disponibles sur le devenir de la sous-unité bêta non affectée dans ces conditions pathologiques. Sachant que c'est la sous-unité GlyR $\beta$  qui se lie directement à la géphyrine, la principale protéine d'échafaudage synaptique (Moss et Smart 2001), il est intéressant de l'étudier pour mieux comprendre les réorganisations qui ont lieu aux synapses dans cette maladie.

Les deux modèles de souris utilisés dans cette étude, provenant du laboratoire de Carmen Villmann, ont donc des mutations sur le gène *Gla1*. Dans le modèle *oscillator* (Gla1<sup>spdot/spdot</sup>), une microdéletion entraîne la perte du domaine transmembranaire TM4, ce qui a pour conséquence une perte totale de l'expression membranaire de GlyR $\alpha$ 1. Dans le modèle *shaky* (Gla1<sup>shy/shy</sup>), la mutation faux-sens du gène *Gla1* entraîne la formation de la sous-unité altérée au niveau d'une boucle extracellulaire. Ces deux modèles reproduisent bien les symptômes de la maladie chez l'humain, qui apparaissent dès 14 jours après la naissance. La mort survient à 3 semaines pour les souris *oscillator* et à 4-6 semaines pour le modèle *shaky*. (Buckwalter et al., 1994; Kling et al., 1997). Des expériences d'électrophysiologie ont montré des défauts de fonction des récepteurs glycinergiques dans les deux modèles de souris (Schaefer et al., 2017).

Au cours du développement, les récepteurs de la glycine sont principalement des homopentamères de la sous-unité  $\alpha$ 2, puis après la naissance cette sous-unité est remplacée progressivement par GlyR $\alpha$ 1, qui forme avec GlyR $\beta$  un hétéropentamère majoritaire chez l'adulte. Entre le 7<sup>ème</sup> et 10<sup>ème</sup> jour après la naissance, les sous-unités GlyR $\alpha$ 2 et GlyR $\alpha$ 3

diminuent dans la plupart des populations neuronales (Liu et Wong-Riley 2013). Cette interversion des sous-unités est en relation directe avec le développement des symptômes de la maladie observés chez ces souris (Schaefer et al. 2022).

En portant notre intérêt sur la sous-unité GlyR $\beta$  non affectée, et en pouvant la visualiser, nous souhaitons établir le devenir des récepteurs au niveau des synapses, et ainsi mieux comprendre les phénomènes de compensation qui peuvent avoir lieu dans ces modèles, lorsque la sous-unité GlyR $\alpha$ 1 est affectée. Dans le but de visualiser directement la sous-unité GlyR $\beta$  du récepteur, la séquence codante de la protéine photo convertible mEos4b a été introduite dans l'exon 2 de GlyR $\beta$  par recombinaison homologue (Maynard et al., 2021). Cette lignée de souris knock-in a été croisée avec les lignées *oscillator* et *shaky* (Figure 19). L'expression de la sous-unité GlyR $\beta$  taggée en N-terminal avec la protéine photo convertible mEos4b permet de faire de la microscopie PALM comme décrit précédemment (Intro, II-3.2).

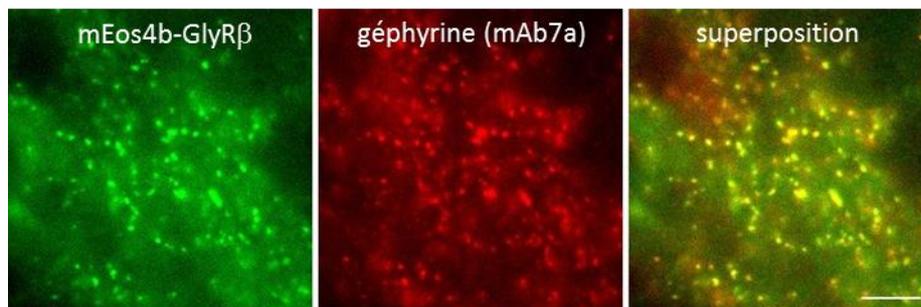


**Figure 19** : schéma des reproductions de souris pour la création des modèles *oscillator* (A) et *shaky* (B). Source : Wiessler et al, article accepté.

La plupart des analyses d'imagerie, électrophysiologiques et comportementales de cette étude ont été réalisées par l'équipe de Carmen Villmann (Würzburg, Allemagne). Pour ma part, j'ai effectué les analyses de microscopie PALM des moelles de souris des différents génotypes présentés ci-dessus. C'est pourquoi je discuterai peu des résultats dans leur contexte biologique, mais plus particulièrement des résolutions techniques que ce travail a permis. Pour plus d'informations, je joins en annexe le manuscrit en cours de soumission de cette étude (Wiessler et al, under review).

## 2. Résultats

Les moelles de souris des trois génotypes suivants ont été étudiées :  $Glra1^{+/+}/Glrb^{eos/eos}$  (souris contrôle uniquement mutée pour fusionner la sous-unité bêta avec la protéine mEos4b),  $Glra1^{spdot/spdot}/Glrb^{eos/eos}$  (souris *oscillator*),  $Glra1^{shy/shy}/Glrb^{eos/eos}$  (souris *shaky*). Un immunomarquage des coupes avec l'anticorps anti-géphyrine (mab7a), nous a permis de visualiser les clusters de géphyrine synaptique, en parallèle de la fluorescence de mEos4b-GlyR $\beta$  non convertie, regardée dans le vert, en microscopie classique (Figure 20). Sur ces images, nous pouvons constater que les détections de mEos4b-GlyR $\beta$  colocalisent presque totalement avec le marquage de la géphyrine, ce qui coïncide avec les résultats attendus décrivant que la sous-unité GlyR $\beta$  est préférentiellement adressée aux synapses de la moelle épinière (Maynard et al., 2021).

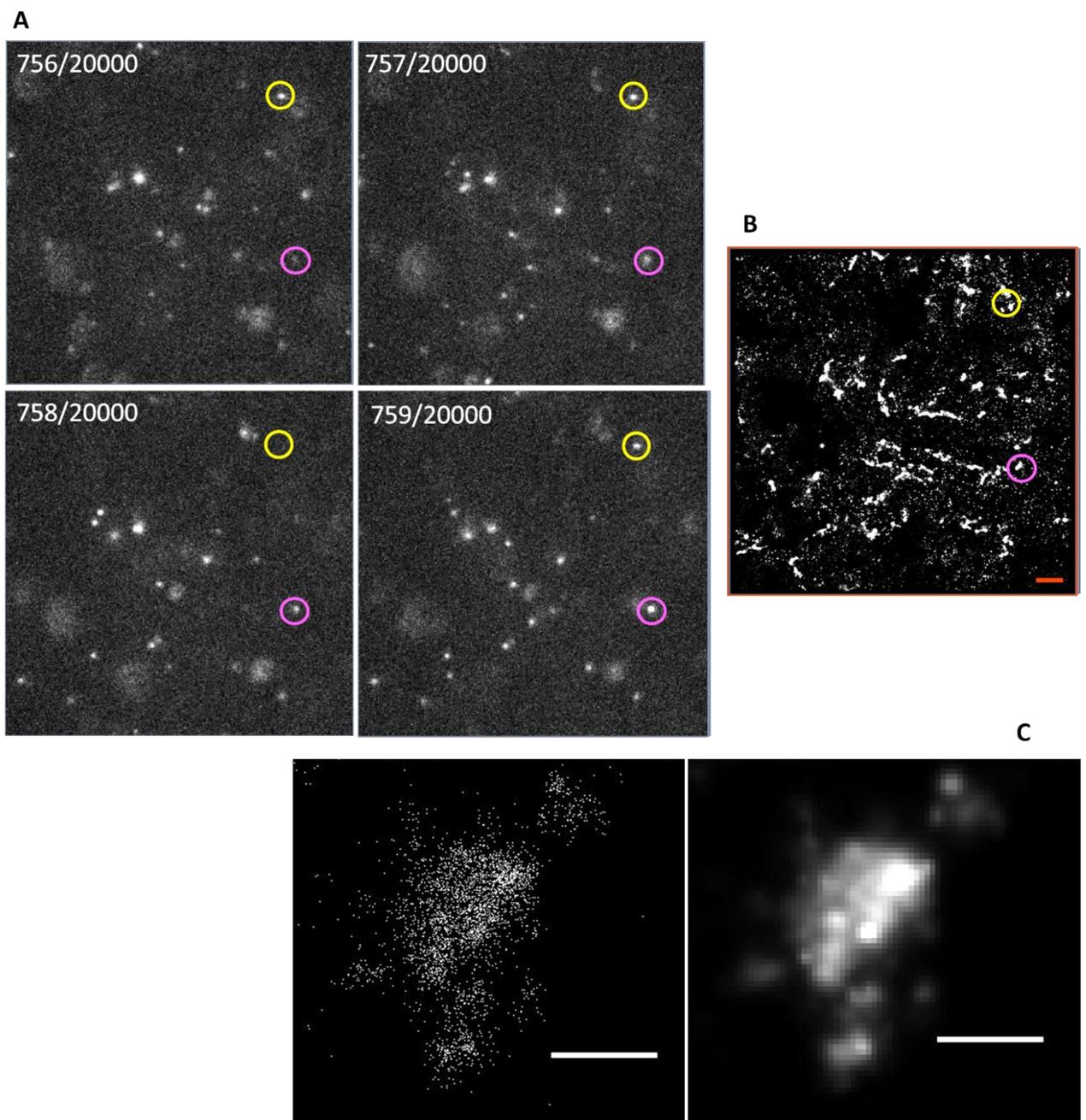


**Figure 20** : Images prises en microscopie à champs large, représentatives des moelles épinières de souris contrôles ( $Glra1^{+/+}/Glrb^{eos/eos}$ ), marquées avec l'anticorps anti-géphyrine mAb7a, épaisseur de la coupe  $\sim 8 \mu\text{m}$ . Echelle :  $5 \mu\text{m}$

### 2.1 Microscopie PALM

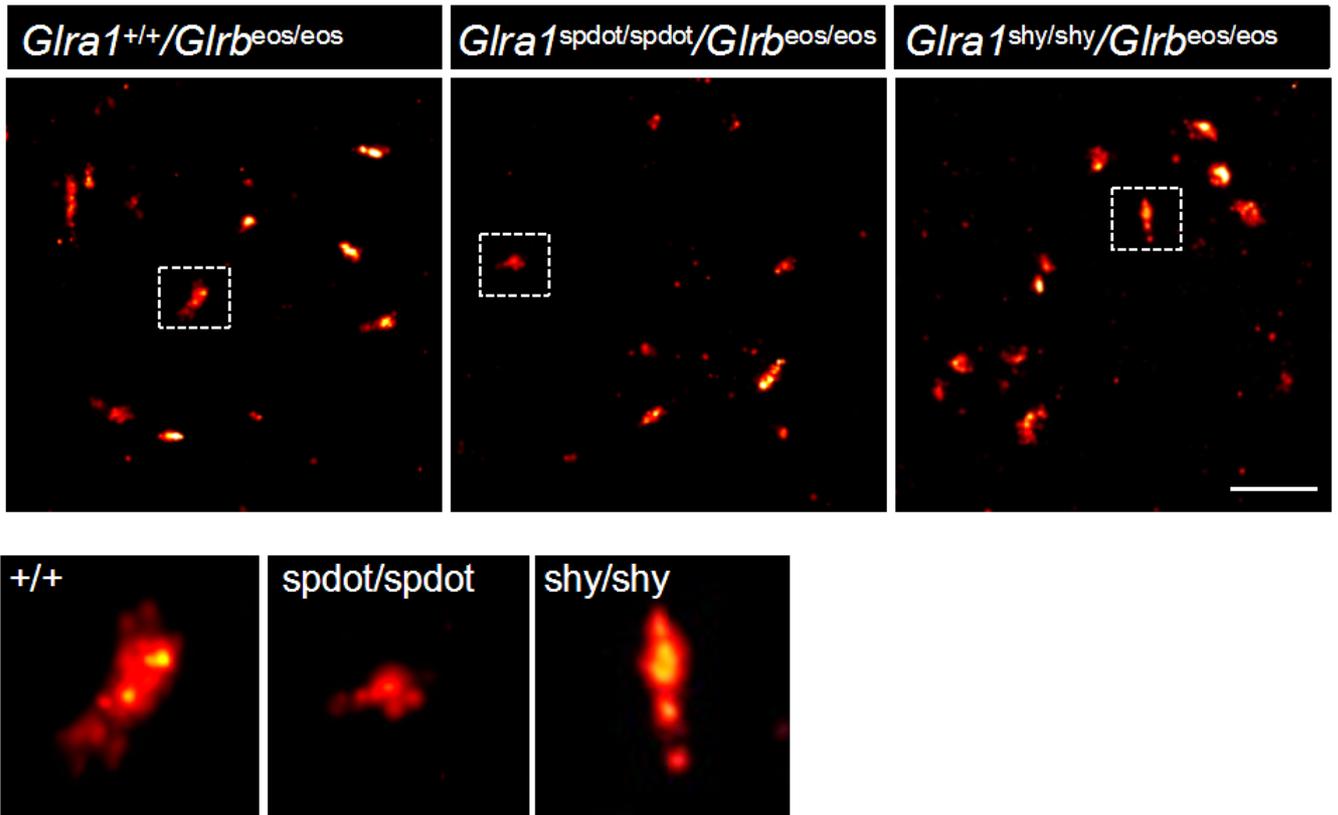
Pour étudier les différences de répartition des sous-unités du récepteur de la glycine et de la géphyrine, l'équipe de Carmen Villmann a comptabilisé le nombre de spots fluorescents pour chaque marquage (GlyR $\alpha$ , GlyR $\beta$ , géphyrine) dans des neurones de culture de moelles de souris, informant donc sur des niveaux d'expression de ces protéines et de leur distribution au niveau des dendrites. Pour compléter ces analyses avec des données sur la taille des clusters comptés, nous avons contribué à l'étude en faisant de la microscopie PALM directement sur les moelles des souris. Pour ce faire, pour chaque génotype, trois souris différentes ont été analysées. Pour chacune des moelles, j'ai réalisé 3 coupes par

génotype, et j'ai enregistré deux acquisitions PALM par coupe de la photoconversion stochastique de mEos4b du vert au rouge sous illumination UV comme décrit dans les méthodes. Le clignotement obtenu a été enregistré sur 20 000 images qui ont été analysées par le logiciel ZEN (Zeiss) pour obtenir une image super résolue où chaque détection est représentée par ses coordonnées en x et en y, avec une précision d'environ  $\sigma = 10-15$  nm (Figure 21-B). Cette image pointilliste est ensuite convertie, en représentant chaque détection comme une distribution Gaussienne avec une déviation standard  $\sigma$  correspondant à sa précision de pointage. Les intensités des différentes détéctions s'additionnent pour ainsi produire une image dite « rendered » (Figure 21-C).

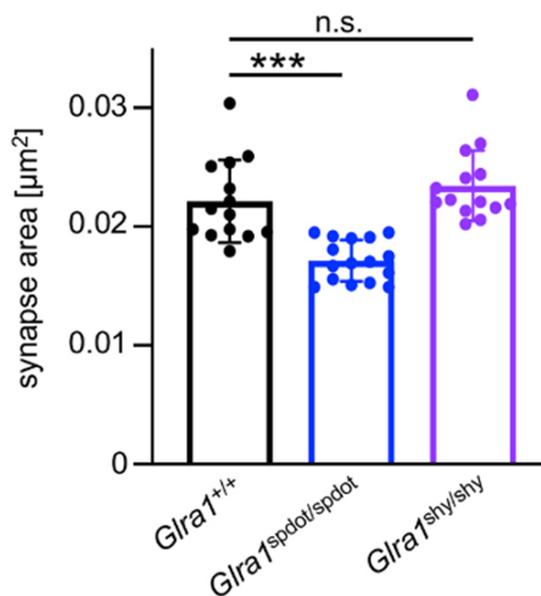


**Figure 21** : A) Série d'images d'un film PALM de 20 000 (images 756 à 759), montrant quelques détections par image. Le spot entouré de magenta montre qu'une détection peut apparaître sur plusieurs images à la suite, et peut présenter des intensités différentes. Le spot entouré de jaune montre une détection qui disparaît (758/20000) avant de réapparaître (759/20000), probablement dû à un clignotement photo-physique. B) L'addition des détections dans les 20 000 images permet de reconstituer une image pointilliste où un point représente la localisation d'une détection, échelle 2  $\mu\text{m}$ . C) Zoom sur l'image pointilliste (à gauche), et équivalent en image super-résolue 'rendered' (à droite), où chaque point est représenté par une Gaussienne correspondant à la précision de localisation de chaque détection (environ  $\sigma = 10\text{-}15\text{ nm}$ ) et avec une taille de pixel de 10 nm. Echelle : 1  $\mu\text{m}$ .

Ces images ont ensuite été analysées avec le module Spot Detector du logiciel Icy afin de quantifier la taille des clusters de sous-unités GlyR $\beta$  qui représente les accumulations synaptiques. Il a été démontré (Maynard et al., 2021) que l'organisation des GlyR aux synapses est telle que la densité de récepteurs (nombre de récepteurs divisé par l'aire) reste la même quand les tailles de synapses changent. On peut donc considérer que la taille des synapses reflète le nombre de récepteurs aux synapses. D'après mes résultats, la taille des synapses glycinergiques des souris *oscillator* (Gla1<sup>spdot/spdot</sup>/Glrbeos/eos) est significativement plus petite par rapport aux souris contrôles (Gla1<sup>+/+</sup>/Glrbeos/eos) ( $p < 0.001$ , test de Kruskal-Wallis, suivi du test de comparaison multiple Dunnett) mais je ne constate pas de différences pour les souris *shaky* (Gla1<sup>shy/shy</sup>/Glrbeos/eos) ( $p = 0.70$ ) (Figures 22 et 23).



**Figure 22** : Images super-résolues représentatives des films PALM pris pour chaque génotype de souris. Echelle : 1  $\mu\text{m}$ .



**Figure 23** : Représentation de la taille moyenne ( $\pm$  écart type) des synapses par image super-résolue en PALM.  $n = 1$  image super résolue avec en moyenne 150 synapses analysées ; oscillator  $n = 16$ , shaky  $n = 14$ , sauvage  $n = 13$ , avec 3 souris différentes par génotype et au moins 2 coupes par souris). \*\*\*  $p < 0.001$ , n.s. (non significatif).

## 2.2. Interprétation et discussion des résultats

L'équipe de Carmen Villmann a, de son côté, fourni des résultats sur l'étude de ces modèles de souris obtenus par microscopie classique et par Western-blot. Dans des cultures de cellules de moelles issues des souris *oscillator*, par immunomarquage, ils ont constaté une diminution des points de clusters fluorescents de la sous-unité GlyR $\beta$  et une augmentation de l'ensemble des sous-unités GlyR $\alpha$  (anticorps ciblant toutes les sous-unités alpha), et pas de changement du nombre de clusters de géphyrine (décompte de points de fluorescence pour 100  $\mu$ m de dendrites). Par Western blot, ils ont montré que la sous-unité GlyR $\alpha$ 2 est surexprimée dans les moelles par rapport aux contrôles, évoquant bien une surexpression compensatrice entre les différentes sous-unités alpha.

Nos résultats de microscopie PALM (Figures 22 et 23), révélant une diminution de la taille des clusters synaptiques des sous-unités GlyR $\beta$ , montrent que la sur-expression de GlyR $\alpha$ 2 ne permet pas de résoudre les défauts d'organisation synaptique. Ces derniers pourraient former soit des homopentamères extra-synaptiques, soit des hétéropentamères avec la sous-unité GlyR $\beta$  qui restent insuffisants pour effectuer une compensation fonctionnelle.

Réalisée de la même manière, leur étude faite sur les cultures de cellules de neurones issues de moelle de souris *shaky*, montre une forte diminution du nombre des clusters de sous-unité GlyR $\beta$ , une augmentation des clusters de sous-unité GlyR $\alpha$ 1 et une diminution de clusters de géphyrine. Nos résultats de microscopie PALM ne montrent pas de différence significative des tailles de synapses dans ce modèle par rapport aux souris contrôle (Figure 23). Cela indiquerait que la sous-unité GlyR $\alpha$ 1 mutée (*shaky*) forme bien des récepteurs avec GlyR $\beta$ , mais que ces récepteurs étant non fonctionnels, la surexpression de la sous-unité GlyR $\alpha$ 1 constatée, empêcherait la mise en place d'un système de compensation fonctionnel, comme par exemple une augmentation du nombre de récepteur du GABA dans ces synapses.

Les différences dans nos résultats (voir annexe : Wiessler et al., under review) sont probablement dues aux systèmes expérimentaux utilisés : dans un cas les cultures dissociées de neurones à partir de moelle embryonnaire, dans l'autre cas les coupes de moelle épinière de souris postnatales. Néanmoins, plusieurs conclusions peuvent être tirées de nos données. L'imagerie super-résolutive montre nettement une diminution de la taille des clusters

synaptiques dans *oscillator*, preuve d'un déficit structural dû au manque de récepteurs hétéromères GlyR $\alpha$ 1/ $\beta$ . En revanche, une perte de fonction dans *shaky* montre que le mécanisme de la pathologie est très différent dans ce modèle. D'ailleurs, les augmentations des sous-unités  $\alpha$  dans les deux mutants (Wiessler et al. under review) indiquent que des effets compensatoires existent, même s'ils restent insuffisants. Dans le futur, nous essayerons de maximiser l'efficacité de ces mécanismes par une approche pharmacologique, par exemple en appliquant des neurostéroïdes pour augmenter l'activité GABAergique (voir résultats I) puisque la majorité des synapses inhibitrices de la moelle épinière sont mixtes (glycinergiques et GABAergiques).

### 2.3 - Considérations techniques des acquisitions PALM

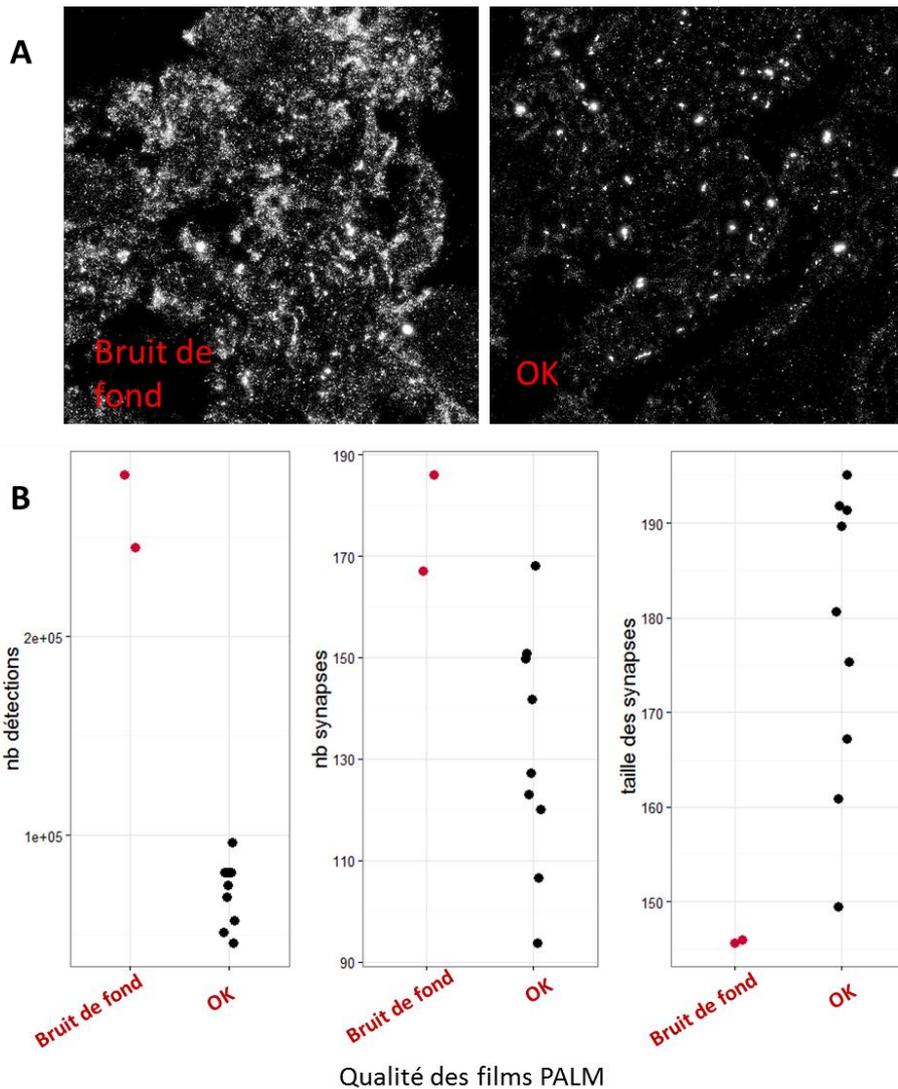
#### 2.3.1. Clignotement non –spécifique

Pendant l'acquisition, il est crucial de garder un œil critique sur la qualité visuelle du clignotement d'un échantillon. Tout d'abord, une fois que la mise au point est faite sur l'image des fluorophores non convertis dans le vert, il faut observer comment se comporte l'échantillon illuminé dans le rouge avant la photoconversion avec l'UV. Les clignotements observés, non spécifiques, doivent être limités au maximum car l'image super-résolue est constituée à partir de la fluorescence dans le rouge qui provient de la photoconversion de mEos4b, et ne doit donc pas être confondue avec d'autres signaux dans le rouge. Nous observons toujours un peu de clignotement de bruit de fond, qui est souvent photoblanchi après quelques secondes de forte illumination par le laser rouge, et qui ne sera donc pas gênant pour la suite de l'acquisition. Nous prenons ainsi la précaution de faire un cycle d'exposition de l'échantillon au laser rouge à 80% de puissance avant de lancer l'illumination des UV (405 nm) qui marque le début de chaque enregistrement d'un film PALM.

Malgré ce traitement, nous observons parfois un clignotement non spécifique trop important et persistant, qui pourrait diminuer la qualité de la reconstruction de nos images super-résolues. Au cours des analyses de nos coupes de moelles, ce phénomène est apparu, sur certaines coupes et pas sur d'autres, provenant pourtant du même tissu. Ce

clignotement parasite, repéré à l'œil nu, peut se répercuter sur les données des détections faites par le logiciel d'analyses du film PALM. Pour le moment, nous ne comprenons pas encore exactement d'où viennent ces fausses détections. Le plus probable serait que la préparation de l'échantillon (séchage, perméabilisation, immunomarquage, qualité de la lamelle) peut entraîner une autofluorescence visible dans le canal rouge. Cette autofluorescence créerait des clignotements de faible intensité sous forte illumination laser.

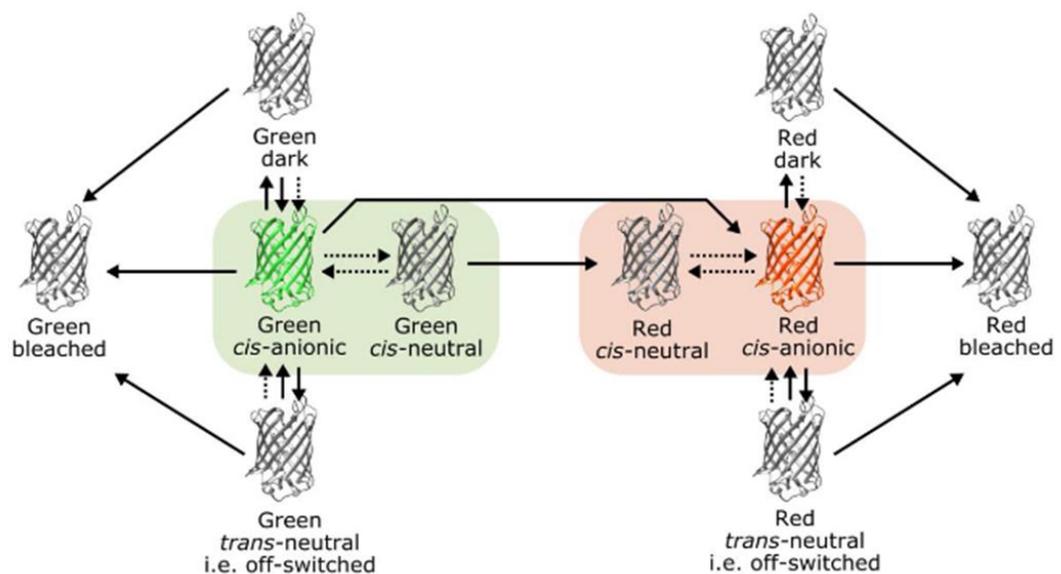
Pour les films que j'ai jugés de moins bonne qualité à l'œil nu, car contaminés par trop de clignotements non spécifiques (appelés « bruit de fond »), le nombre de détections comptabilisées est plus important que sur les autres films avec moins de clignotement parasites (Figure 24), et la quantité de photons par détection est en moyenne plus faible. Cette augmentation du nombre de détections est corrélée à une augmentation du nombre de clusters détectés avec le logiciel Spot detector ainsi qu'à une taille moyenne plus faible. Il semble donc que ces clignotements non spécifiques entraînent une sur-évaluation du nombre de synapses et une diminution de leur taille, et cela fausse les résultats.



**Figure 24** : A) Exemple d'image super-résolue pointilliste de qualité « bruit de fond » et de bonne qualité « OK ». B) Représentation graphique des détections (nombre de détections, nombre et taille des clusters) pour des films PALM de qualités variables : catégorie « bruit de fond » pour les films présentant beaucoup de clignotements non spécifiques, et catégorie « ok » pour les films de bonne qualité de clignotement.

Plusieurs fonctions du logiciel permettent de filtrer les détections que l'on souhaite garder pour reconstituer l'image super-résolue. Nous pouvons éliminer les détections avec un seuil minimum de nombre de photons à prendre en compte. Si les fausses détections ont une intensité différente que les fluorophores mEos4b, nous pouvons ainsi les supprimer de la reconstitution de l'image super-résolue. Il y a aussi la possibilité d'éliminer des détections non spécifiques en se basant sur le critère de densité. Cela signifie que pour chaque

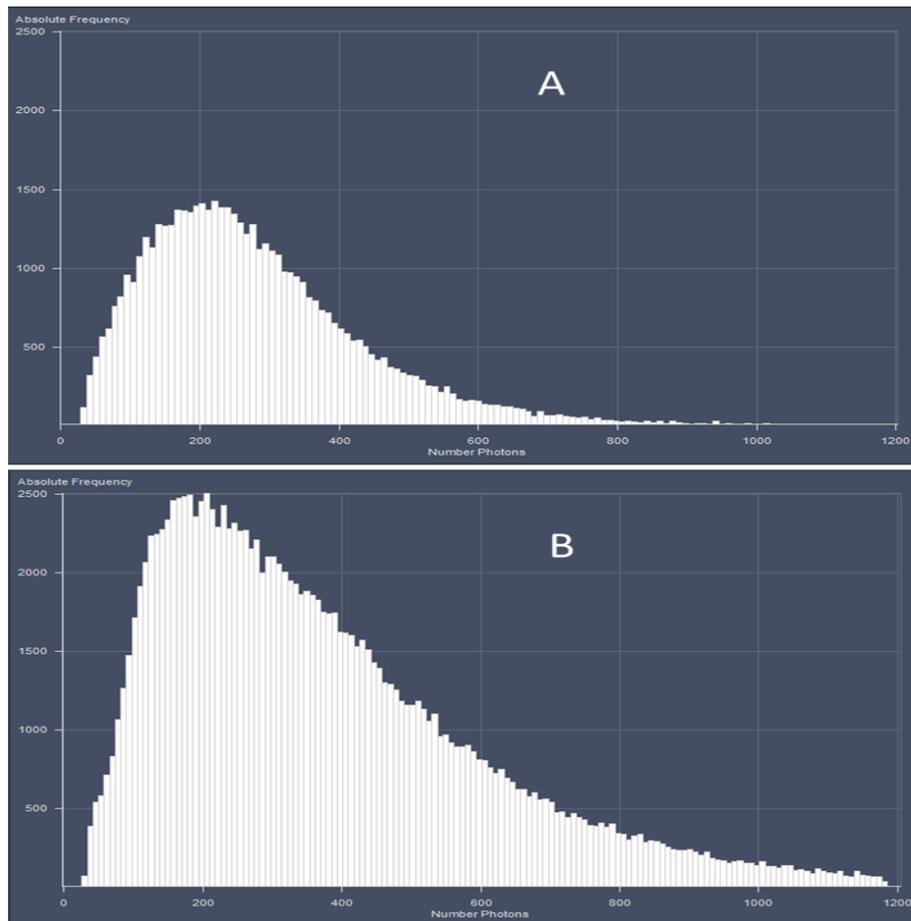
détection, le logiciel recherche s'il y a d'autres détections dans un périmètre proche, ce qui constitue en effet un filtre de densité. Par exemple, il faut un minimum de 10 autres détections à une distance maximum de 100 nm du spot détecté pour que ce dernier ne soit pas supprimé de l'image finale. Ce filtrage est expliqué par la caractéristique du cycle de photoconversion de mEos4b. En effet, la conversion de mEos4b du vert au rouge sous illumination des UV est un phénomène stochastique qui est complexe et difficile à maîtriser (Figure 25). Ainsi, un même fluorophore peut être converti dans le rouge puis rentrer dans un état inactivé avant de fluorescer à nouveau dans un nouveau cycle. Ce nombre de cycle peut être très variable d'un fluorophore à un autre. De même, la durée de la fluorescence dans le temps n'est pas identique entre les fluorophores. En général, un même fluorophore sera détecté sur plusieurs images à la suite et pourra réapparaître plus tard au cours de l'acquisition (Figure 21-A). De ce fait, avec ce filtrage, une détection unique sans voisins proches ne sera pas considérée comme une vraie détection de la protéine mEos4b.



**Figure 25** : Proposition de modèle des propriétés photophysiques de mEos4b par Wulfele et al. 2022.

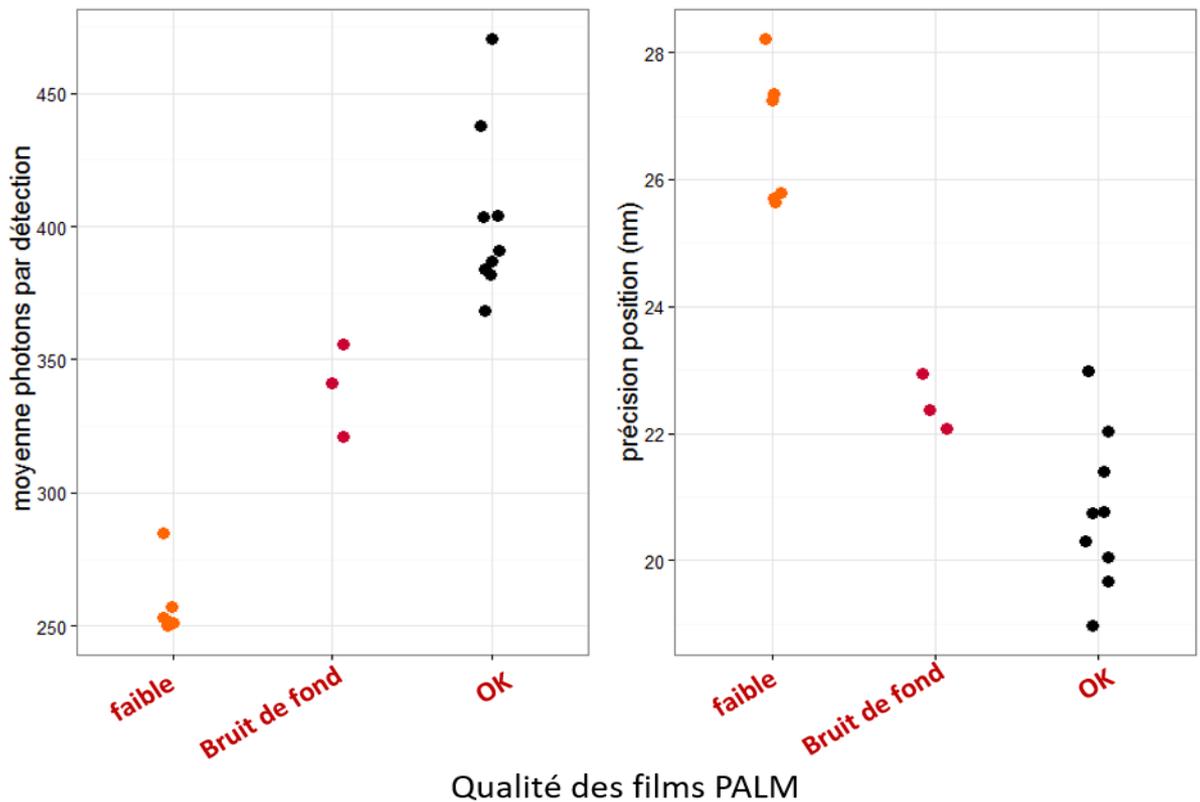
### 2.3.2. Signal faible

Nous avons remarqué sur une autre série de films PALM, que les signaux lumineux enregistrés étaient de faible intensité par rapport aux autres films. Cette observation est confirmée ensuite lorsque l'on examine le nombre de photons mesurés par la caméra pour chaque détection (Figure 26).



**Figure 26** : comparaison des histogrammes représentant le nombre de détections enregistrées en fonction du nombre de photons. A) Film PALM avec clignotement de faible intensité, B) film PALM avec une bonne qualité de clignotement.

La conséquence de cette faible intensité lumineuse du clignotement est une perte de la précision de localisation des détections. En effet, plus le nombre de photons est élevé par rapport au bruit de fond (ratio signal/bruit), plus la précision de la mesure de la position du fluorophore sera bonne (Figure 27). Là encore, un filtrage des détections avec un seuil minimum de photons peut être appliqué.



**Figure 27:** Comparaisons des paramètres de détections de plusieurs films PALM ; « faible » : les films jugés visuellement de faible intensité lumineuse, « bruit-de-fond » : les films jugés visuellement ayant beaucoup de clignotements non spécifiques, « ok » pour les films de bonne qualité.

Comme pour les films avec un bruit de fond élevé, nous ne connaissons pas encore la raison de la perte d'intensité des détections dans certaines acquisitions. Dans ce cas, le problème viendrait probablement de l'imagerie elle-même, à cause d'une bulle d'air dans l'huile d'immersion de l'objectif, ou d'un mauvais réglage de l'intensité du laser 561 nm ou d'un des filtres. Pour cette raison nous avons préféré dans les deux cas recommencer de nouveaux films pour avoir des qualités de clignotements comparables entre toutes les conditions, plutôt que d'essayer de filtrer les détections brutes. De plus, nous faisons une sorte de filtrage après la reconstitution de l'image super-résolue, puisque nous faisons une recherche de synapses avec le logiciel Spot Detector qui détecte des structures fluorescentes en fonction de leur intensité, prenant en compte le bruit de fond local (c'est-à-dire les détections de basse densité). Nous mettons comme seuil minimum une surface de 100 pixels, soit  $10^4 \text{ nm}^2$  sur les images super-résolues, ce qui, par conséquent, élimine les fausses

détections uniques et les vraies détections de mEos4b quand il s'agit de la protéine seule (récepteurs GlyR $\beta$  non-synaptiques).

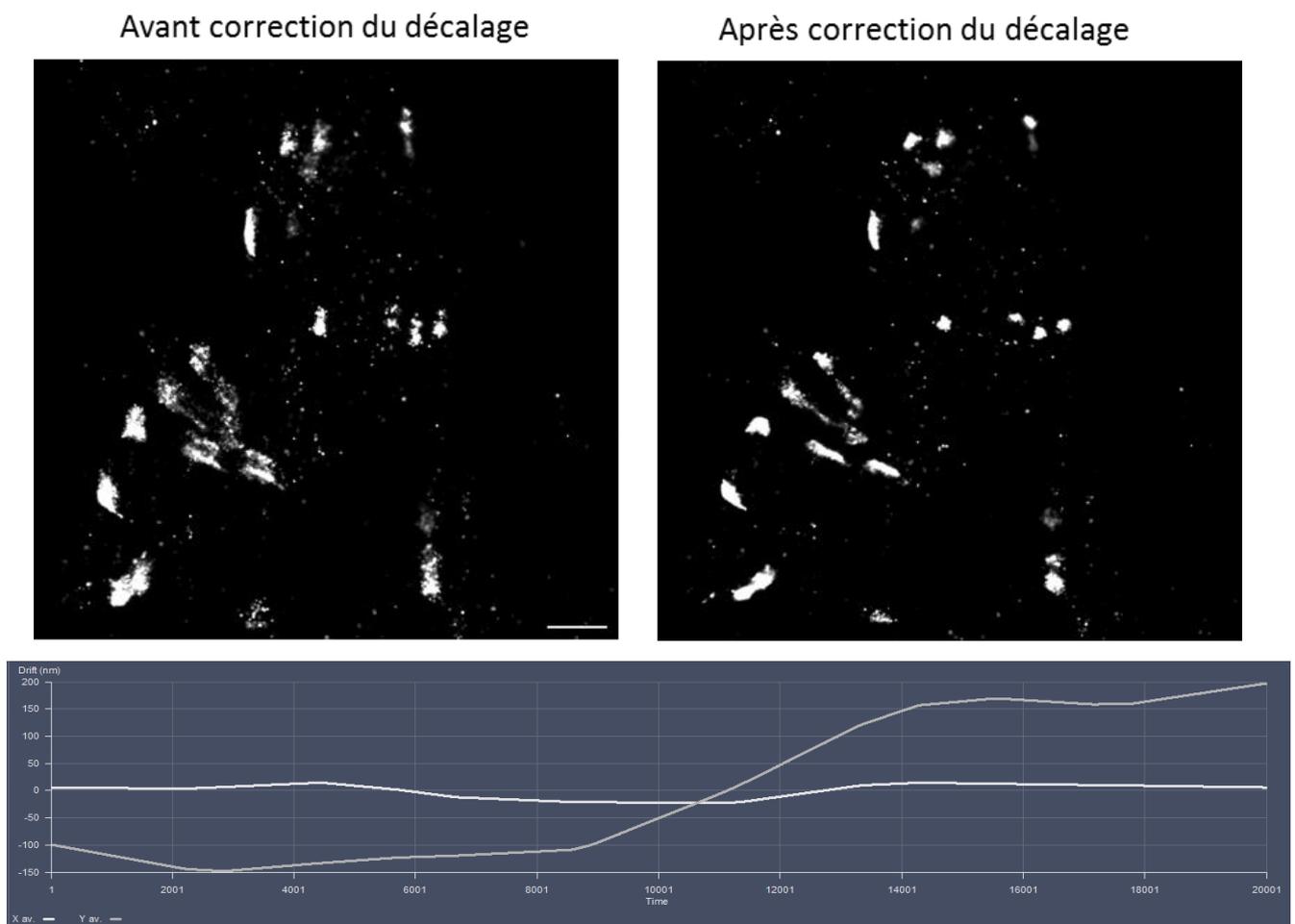
### 2.3.3. Conditions d'acquisition

Afin d'avoir une qualité de prise d'image optimale, il faut maîtriser la puissance de l'illumination par le laser UV au cours de la prise d'image. Nous souhaitons avoir ni trop, ni trop peu de détections pour chaque image enregistrée. En effet, si nous appliquons trop d'UV, le taux de protéines mEos4b converties sur une même image est trop important, ce qui augmente la probabilité que deux détections séparées d'une distance inférieure au critère de Raleigh apparaissent. Par conséquent, ces détections ne sont soit pas correctement localisées, soit ne sont pas prises en compte pour la reconstitution de l'image résolue, et donc nous perdons de l'information. D'un autre côté, si l'illumination UV est trop faible et que trop peu de détections apparaissent par image, le temps nécessaire pour faire clignoter toutes les protéines présentes est alors allongé, ce qui augmente aussi la quantité de clignotements non spécifique enregistré. Or, il faut un ratio nombre de clignotement spécifique / nombre de clignotement non spécifique le plus grand possible. Concrètement, il faut commencer avec une puissance très faible d'illumination aux UV, dans notre cas  $\sim 0.02\%$  de la puissance nominale du laser 405 nm, ce qui au début de l'activation est suffisant puisque tous les mEos4b sont disponibles à la photoconversion. Puis, au cours du temps, de plus en plus de mEos4b vont photoblanchir définitivement, et donc il faudra augmenter progressivement la puissance du laser UV afin de photo-convertir une quantité suffisante de fluorochrome de sorte qu'on puisse obtenir cette fameuse quantité visuelle de clignotement la plus constante possible. Pour pouvoir faire de la quantification de détection, il est important d'arriver à l'épuisement du clignotement avant la fin de l'enregistrement du film PALM, c'est-à-dire détecter la totalité des fluorophores mEos4b dans toutes les conditions expérimentales.

### 2.3.4. Correction du drift

Les acquisitions de films de 20 000 images durent environ 17 minutes (50 ms par image, ce qui correspond à 20 Hz), d'où la nécessité de vérifier que l'alignement de

l'échantillon avec le microscope n'a pas subi de changement au cours du temps. Pour ce faire, nous soumettons l'image PALM à une correction du décalage qui est faite par le logiciel ZEN (Zeiss) à partir d'une segmentation du film en plusieurs blocs d'images, alignés les un par rapport aux autres avec un calcul de corrélation (Figure 28). Dans la plupart des cas, cette correction est suffisante pour repositionner les détections et ainsi assurer une meilleure reconstruction de clusters synaptique de mEos4b-GlyR $\beta$ .



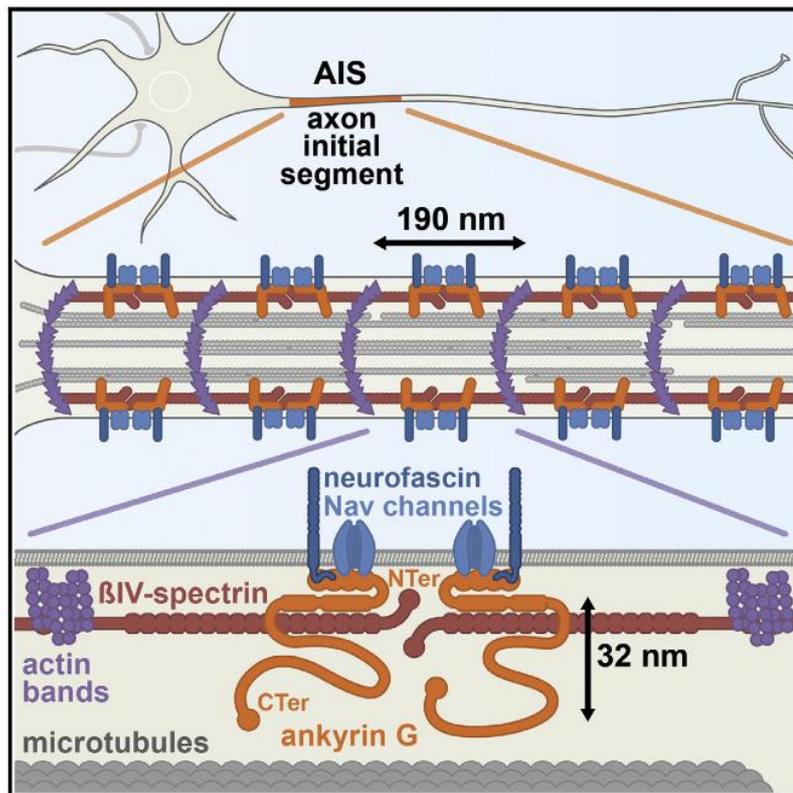
**Figure 28** : Images PALM super-résolues, avant et après correction du décalage. Echelle 1  $\mu\text{m}$ . Diagramme de déplacement en x et en y du film PALM. Dans ce cas précis, on observe surtout un décalage fort dans la direction y d'environ 300 nm entre l'image 9000 et 14000.

### III - Microscopie à illumination structurée (SIM)

#### ***1-Contexte biologique***

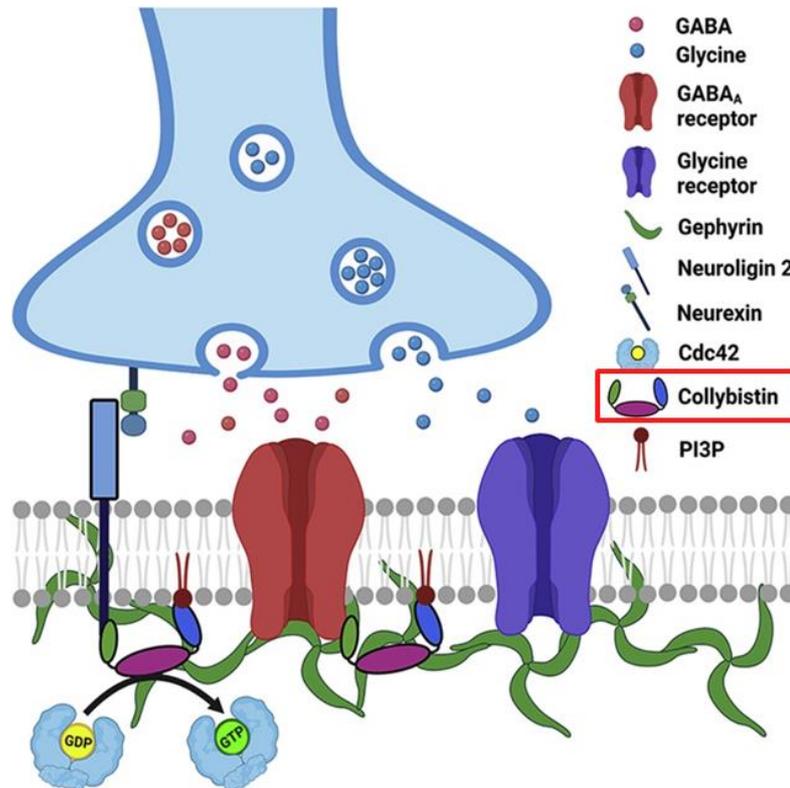
Dans cette dernière partie, je vais illustrer un exemple de l'intérêt de la technologie SIM, à travers des mises au point que j'ai faites pour un projet en collaboration avec l'équipe de recherche de Rochelle Hines, de l'université de Las Vegas (Nevada, USA).

Ce projet s'intéresse à la structure des neurones nommée segment initial axonal (SIA). Cette zone se situe entre le compartiment somato-dendritique et l'axone du neurone, et permet le maintien de la polarité des neurones. C'est également le lieu où le potentiel d'action est généré en réponse aux différents signaux électrique reçus par les dendrites et le soma de la cellule. Une fois le potentiel d'action initié, il se propage le long de l'axone pour atteindre les terminaisons axonales où se trouvent des synapses qui permettent de transmettre ce signal électrique à d'autres cellules. Le SIA a une longueur comprise entre 20 et 60  $\mu\text{m}$ , et a été défini par la microscopie électronique comme un domaine très riche en protéines membranaires et submembranaires et présentant une organisation de microtubules en faisceaux, spécifique à cette zone (discuté dans Leterrier 2016). Durant la dernière décennie, des analyses par microscopie super-résolutive ont établi l'ultra-structure du SIA ainsi que son organisation moléculaire. Le SIA est enrichi en canaux voltage sodique par rapport aux autres régions du neurone, et la structure est maintenue par un réseau de protéines d'échafaudage qui comprend la spectrine et l'ankyrine G qui se lient au squelette d'actine et de microtubule (Figure 29).



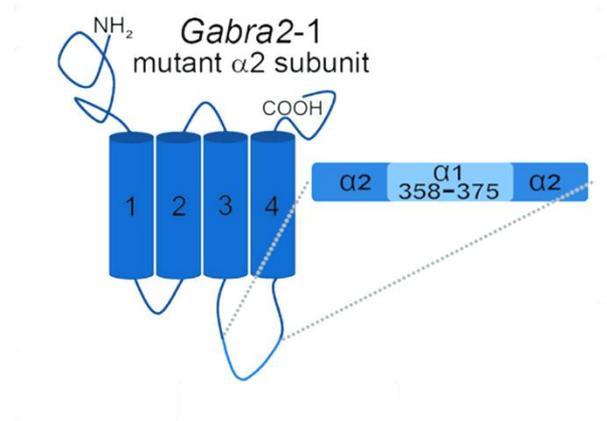
**Figure 29** : Organisation ultra-structurale du segment initial axonal, d'après Leterrier et al. 2015.

On trouve également des synapses GABAergiques le long des SIA, qui sont caractérisées par la sous-unité alpha 2 et alpha 1 dans une moindre mesure. Leur présence au niveau du SIA indique que ces activités inhibitrices contrôlent l'intégration des signaux électriques et la génération des potentiels d'action. Ce qui n'est pas encore connu c'est la manière dont ces synapses sont régulées et quel rôle elles jouent dans un contexte pathologique. L'équipe de Rochelle Hines étudie le syndrome ARHGEF9 de déficit intellectuel, une mutation qui concerne la collybistine, une autre protéine d'échafaudage qui interagit avec la géphyrine et les GABA<sub>A</sub>R dans les synapses GABAergiques (Figure 30).



**Figure 30** : Schéma montrant l'incorporation de la collybistine aux synapses GABAergiques, d'après Imam et al. 2022.

Ils ont créé un modèle de souris dont le GABA<sub>A</sub>R est muté au niveau de la sous-unité alpha 2 (*Gabra2-1*), le domaine de la grande boucle intracellulaire entre le domaine transmembranaire 3 et 4 qui interagit avec la collybistine est remplacé par celui de la sous-unité alpha 1 qui lie préférentiellement la géphyrine (Figure 31) (Hines et al. 2022). Il est intéressant de noter que ce modèle de souris présente des changements morphologiques au niveau du SIA au cours du développement, qui font l'objet de recherches dans le laboratoire du Dr Hines. Afin d'étudier comment cette mutation impacte l'organisation des SIA, enrichie en GABA<sub>A</sub>R- $\alpha$ 2, nous voulons observer les SIA sur des coupes de cerveaux de ces souris mutantes.

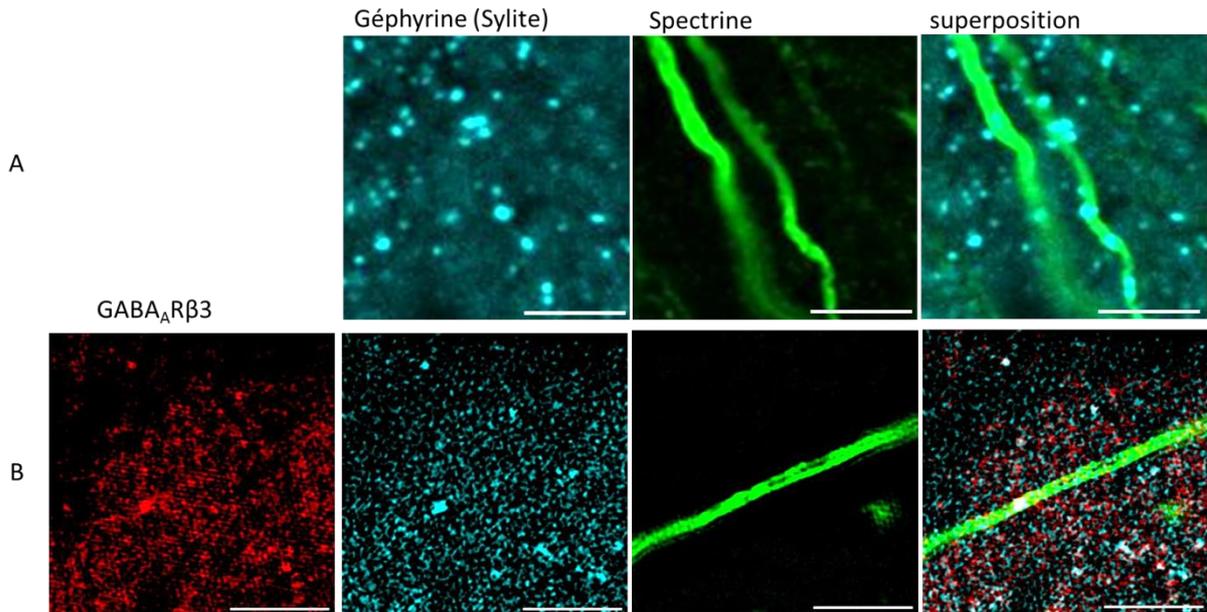


**Figure 31:** Représentation schématique de la mutation générée dans le modèle de souris *Gabra2-1*. Source : Hines et al. 2022.

Les premiers résultats de microscopie classique de l'équipe de Rochelle Hines montrent des différences de rectilignité des SIA entre les souris contrôles et les souris *Gabra2-1*, à savoir que les SIA des mutants sont plus tortueux que ceux des souris *Gabra2* sauvages. Cette observation les a amené à vouloir étudier avec plus de résolutions la structure des SIA afin de comprendre ce qui se joue au niveau de l'organisation de cette structure. Nous savons grâce aux travaux de Leterrier et al. (2015), que les SIA sont structurés par des anneaux d'actine séparés de 190 nm (Figure 29) et que cette organisation en anneau joue un rôle dans la stabilisation de la structure des SIA. Nous avons à l'aide de la microscopie SIM (Intro II-3.1) proposé d'étudier les tissus neuronaux de leur souris *Gabra2-1*, dans le but d'identifier d'éventuelles désorganisations de ce motif en anneaux. En effet, puisque la microscopie SIM permet d'augmenter la résolution des images par un facteur de deux, par rapport à la microscopie classique, nous comptons pouvoir détecter ces anneaux dont la distance de 190 nm se situe sous le seuil de résolution maximum de la microscopie classique. De plus, le SIM permet la prise d'images trois-dimensionnelles dans différents canaux de fluorescence, ce qui permet de visualiser des structures complexes dans des échantillons épais. Pour ces raisons, le SIM peut être une méthode parfaitement adaptée au modèle expérimental et à la question biologique.

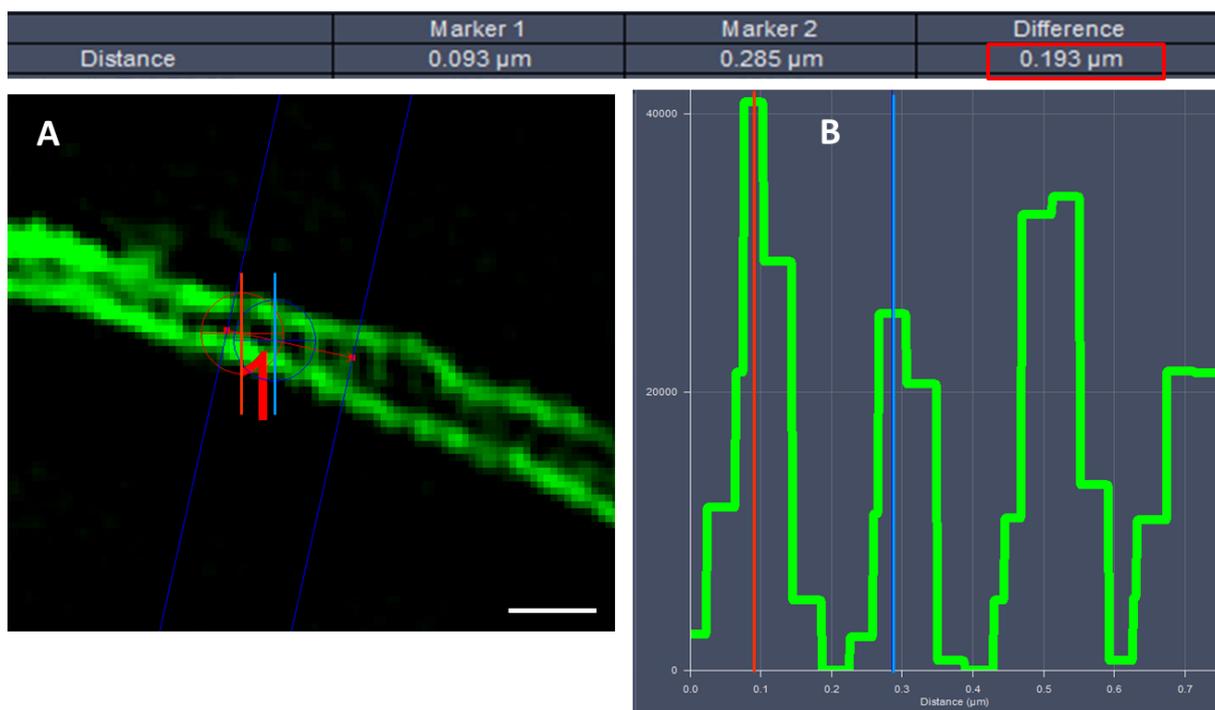
## 2-résultats

Des coupes de cerveaux des souris ont été réalisées et immunomarquées afin de détecter la spectrine au niveau des SIAs, ainsi que la géphyrine et la sous-unité alpha2 du GABA<sub>A</sub>R pour identifier les synapses GABAergiques sur les SIAs. Etant donné que la technique SIM ne requiert pas de préparation d'échantillon spécifique, les marquages ont pu être faits en parallèle pour regarder les coupes au microscope confocale et en SIM.



**Figure 32** : Comparaison des images prises au confocal (A) et en SIM (B) sur la zone du cortex de coupes de cerveaux de souris. Echelle 5  $\mu$ m.

Nous pouvons constater sur la figure 32, avec le marquage de la spectrine que l'image est mieux définie avec la microscopie SIM par rapport à l'image prise au microscope confocal. Nous distinguons une structure régulière tout le long du SIA qui n'est pas visible dans des images confocales. En zoomant sur la structure du SIA révélée par le marquage de la spectrine, nous observons un motif en anneaux (Figure 33-A). Les profils d'intensité (Figure 33-B) faits sur ce motif indiquent une distance entre les anneaux de 193 nm, ce qui correspond à la distance mesurée par (Leterrier et al. 2015), grâce à la technique de SMLM du STORM. Les marquages de la géphyrine et du GABA<sub>A</sub>R sont moins forts que celui de la spectrine et présentent un bruit de fond dit « en nid d'abeille », typique de l'artefact produit par la reconstruction SIM lorsque le signal fluorescent n'est pas assez puissant et/ou stable.



**Figure 33** : Image zoomée d'un SIA marqué par la spectrine. Mesure de la distance (de la barre rouge à la barre bleue) entre les anneaux de spectrine révélés par la microscopie SIM. Echelle : 500 nm.

### 3 -Discussion

Ces résultats préliminaires de mise au point du marquage pour l'étude SIM sont encourageants. Du fait que l'on puisse distinguer la structure en anneaux caractéristique des SIAs et même mesurer l'arrangement de ces anneaux, nous aurons la possibilité de procéder à des mesures systématiques sur un panel de SIA pour les différents génotypes de souris (*Gabra2-1* et *Gabra2* sauvage), et découvrir si le profil tortueux des SIAs est dû à une désorganisation au niveau de cette structure en anneaux. D'ailleurs, ce sera intéressant de voir si l'organisation des synapses inhibitrices au niveau du SIA est modifiée dans la souris *Gabra2-1*, ce qui pourrait indiquer des changements fonctionnels.

## Conclusion

Les différents projets auxquels je participe m'ont permis d'approfondir mes connaissances en microscopie et notamment d'avoir du recul par rapport aux avantages et inconvénients de différentes techniques à disposition au sein de notre unité. Ainsi, en tant que future responsable technique de la plateforme de microscopie de notre unité, je propose en guise de conclusion un tableau récapitulatif de quelques spécificités des différentes techniques microscopiques abordées dans ce manuscrit (tableau 3).

Lorsque l'on a besoin de faire des analyses microscopiques, on peut être tenté de choisir la technique offrant la meilleure résolution possible. Cependant pour choisir le système de microscopie le plus adapté à un projet il y a plusieurs paramètres à prendre en compte. Les techniques de SMLM, PALM et STORM sont celles qui permettent l'obtention de la meilleure résolution sur notre plateau technique. Elles seront donc choisies pour étudier une structure ou une organisation qui demande une résolution entre 25 et 100 nm environ. Le PALM sera préféré pour imager des protéines recombinantes, ce qui permet de les étudier en condition de cellules vivantes tandis qu'avec STORM l'utilisation de fluorophores organiques sera réservée aux tissus et cellules fixés. Cela permet d'observer des protéines endogènes avec un signal fluorescent généralement plus fort par rapport aux signaux émis par les protéines photoconvertibles. De plus l'imagerie de plusieurs protéines marquées avec des fluorophores de différentes couleurs est possible avec la technique STORM, et sera prochainement implémentée dans notre unité à l'aide d'un nouveau module d'imagerie SMLM de la société Abbelight. La contrepartie des techniques d'imagerie à molécules uniques est le temps long nécessaire pour acquérir les images, ainsi que la taille des fichiers générés. De plus, les échantillons doivent être les plus fins possible, pour minimiser le bruit de fond provenant de l'épaisseur de l'échantillon.

Les points forts du SIM ressemblent à ceux du microscope confocale, bien que l'approche soit très différente d'un point de vue technologique. Dans les deux cas l'imagerie peut être faite de manière séquentielle dans différentes longueurs d'onde, avec la possibilité d'une acquisition d'une image trois-dimensionnelle avec un haut contraste. Ainsi, l'épaisseur de l'échantillon avec le SIM n'est pas problématique puisque l'on peut imager plusieurs

sections en z, et ainsi reconstruire des images en trois dimensions. Tout comme au confocal, la détection de plusieurs couleurs est parfaitement compatible avec la technique SIM et ne demande pas de mise au point particulière par rapport aux immunomarquages mis en place pour la microscopie à fluorescence classique. L'avantage du SIM par rapport au confocal est le gain de résolution qui permet de descendre jusqu'à environ 100 nm de résolution spatiale, à condition d'avoir des marquages qui donnent des signaux lumineux forts et stables, conditions nécessaires à des reconstructions d'images super-résolues de bonne qualité. Pour cette même raison, les fluorophores organiques seront privilégiés aux protéines fluorescences. De plus, les temps d'acquisitions du SIM sont relativement rapides en comparaison avec les techniques de SMLM (PALM et STORM).

technologie	Résolution (x/y)	marquage	multicolore	vivant	3D	épaisseur d'échantillon	temps d'acquisition	taille des fichiers
PALM	25-50 nm	Protéine photo-activable/ photoconvertible	(-)	+	(+)	< 10 µm	Dizaines de minutes	Gb
STORM	20-40 nm	Fluorophore organique photo activable	+	-	(+)	< 10 µm	Dizaines de minutes	Gb
SIM	100 nm	Fluorophore organique	+	(-)	+	≤ 100 µm	Dizaine de secondes	Mb
Confocal	250 nm	Protéine fluorescente / fluorophore organique	+	+	+	≤ 100 µm	Dizaine de secondes	Mb
Fluo classique	250 nm	Protéine fluorescente / fluorophore organique	+	+	-	~ 10 µm	< 1 seconde	Kb

**Tableau 3** : Guide rapide pour orienter le choix de microscopie sur la plateforme. Les parenthèses ( ) montrent une préférence, mais l'autre possibilité n'est pas exclue.

## Références bibliographiques

- Althaus, Alison L., Michael A. Ackley, Gabriel M. Belfort, Steven M. Gee, Jing Dai, David P. Nguyen, Tatiana M. Kazdoba, Amit Modgil, Paul A. Davies, Stephen J. Moss, Francesco G. Salituro, Ethan Hoffmann, Rebecca S. Hammond, Albert J. Robichaud, Michael C. Quirk, et James J. Doherty. 2020. « Preclinical characterization of zuranolone (SAGE-217), a selective neuroactive steroid GABAA receptor positive allosteric modulator ». *Neuropharmacology* 181:108333. doi: 10.1016/j.neuropharm.2020.108333.
- Battaglia, Sereina, Marianne Renner, Marion Russeau, Etienne Côme, Shiva K. Tyagarajan, et Sabine Lévi. 2018. « Activity-Dependent Inhibitory Synapse Scaling Is Determined by Gephyrin Phosphorylation and Subsequent Regulation of GABA<sub>A</sub> Receptor Diffusion ». *ENEURO* 5(1):ENEURO.0203-17.2017. doi: 10.1523/ENEURO.0203-17.2017.
- Belelli, Delia, Anna Casula, Alice Ling, et Jeremy J. Lambert. 2002. « The Influence of Subunit Composition on the Interaction of Neurosteroids with GABAA Receptors ». *Neuropharmacology* 43(4):651-61. doi: 10.1016/S0028-3908(02)00172-7.
- Belelli, Delia, Neil L. Harrison, Jamie Maguire, Robert L. Macdonald, Matthew C. Walker, et David W. Cope. 2009. « Extrasynaptic GABA<sub>A</sub> Receptors: Form, Pharmacology, and Function ». *The Journal of Neuroscience* 29(41):12757-63. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3340-09.2009.
- Bode, Anna, et Joseph W. Lynch. 2014. « The Impact of Human Hyperekplexia Mutations on Glycine Receptor Structure and Function ». *Molecular Brain* 7(1):1-12. doi: 10.1186/1756-6606-7-2.
- Bohlhalter, Stephan, Hanns Mohler, et Jean-Marc Fritschy. 1994. « Inhibitory Neurotransmission in Rat Spinal Cord: Co-Localization of Glycine- and GABAA-Receptors at GABAergic Synaptic Contacts Demonstrated by Triple Immunofluorescence Staining ». *Brain Research* 642(1-2):59-69. doi: 10.1016/0006-8993(94)90905-9.
- Brickley, Stephen G., et Istvan Mody. 2012. « Extrasynaptic GABAA Receptors: Their Function in the CNS and Implications for Disease ». *Neuron* 73(1):23-34. doi: 10.1016/j.neuron.2011.12.012.
- Buckwalter, Marion S., Susan A. Cook', Muriel T. Davisson', W. Frost White, et Sally A. Camper. 1994 « A Frameshift Mutation in the Mouse Ce1 Glycine Receptor Gene (Glrai) Results in Progressive Neurological Symptoms and Juvenile Death ». *Human Molecular Genetics*; Nov1994, Vol. 3 Issue 11, p2025-2030, 6p.
- Choi, Gayoung, et Jaewon Ko. 2015. « Gephyrin: A Central GABAergic Synapse Organizer ». *Experimental & Molecular Medicine* 47(4):e158-e158. doi: 10.1038/emm.2015.5.
- Cox, Guy. 2002. « Biological confocal microscopy ». *Materials Today* 5(3):34-41. doi: 10.1016/S1369-7021(02)05329-4.
- Douglas C. Giancoli, 1989, Physique generale. Tome 1 / mecanique et thermodynamique : solutions et corrige des problemes. Prentice-Hall 2-8041-1794-4
- Edinoff, Amber N., Amira S. Odisho, Kendall Lewis, Amir Kaskas, Grace Hunt, Elyse M. Cornett, Alan D. Kaye, Adam Kaye, John Morgan, P. Scott Barrilleaux, David Lewis, Omar Viswanath, et Ivan Urits. 2021. « Brexanolone, a GABAA Modulator, in the Treatment of Postpartum Depression in Adults: A Comprehensive Review ». *Frontiers in Psychiatry* 12.
- Fritschy, Jean-Marc, et Patrizia Panzanelli. 2014. « GABA<sub>A</sub> Receptors and Plasticity of Inhibitory Neurotransmission in the Central Nervous System ». *European Journal of Neuroscience* 39(11):1845-65. doi: 10.1111/ejn.12534.

- Germann, Allison L., Spencer R. Pierce, Hiroki Tateiwa, Yusuke Sugawara, David E. Reichert, Alex S. Evers, Joe Henry Steinbach, et Gustav Akk. 2021. « Intrasubunit and Intersubunit Steroid Binding Sites Independently and Additively Mediate  $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$  GABAA Receptor Potentiation by the Endogenous Neurosteroid Allopregnanolone S ». *Mol Pharmacol.*100(1):19-31. doi: 10.1124/molpharm.121.000268.
- Gerrow, Kimberly, et Antoine Triller. 2010. « Synaptic stability and plasticity in a floating world ». *Current Opinion in Neurobiology* 20(5):631-39. doi: 10.1016/j.conb.2010.06.010.
- Gouzer, Géraldine, Christian G. Specht, Laure Allain, Toru Shinoe, et Antoine Triller. 2014. « Benzodiazepine-Dependent Stabilization of GABAA Receptors at Synapses ». *Molecular and Cellular Neuroscience* 63:101-13. doi: 10.1016/j.mcn.2014.10.004.
- Guiochon-Mantel, Anne, et Edwin Milgrom. 1999. « Récepteurs stéroïdiens et mécanismes d'action des stéroïdes sexuels ». *Journal de la Société de Biologie* 193(3):269-73. doi: 10.1051/jbio/1999193030269.
- Gustafsson, M. G. L. 2000. « Surpassing the Lateral Resolution Limit by a Factor of Two Using Structured Illumination Microscopy ». *Journal of Microscopy* 198(2):82-87. doi: 10.1046/j.1365-2818.2000.00710.x.
- Hales, G., et F. Tyndale. 1994. « Few Cell Lines with GABA, mRNAs Have Functional Receptors ». *The Journal of Neuroscience*. doi: 10.1523/JNEUROSCI.14-09-05429.1994
- Halterman, Marc W. 2005. « Neuroscience, 3rd Edition ». *Neurology* 64(4):769-a. doi: 10.1212/01.WNL.0000154473.43364.47.
- Hines, Dustin J., April Contreras, Betsua Garcia, Jeffrey S. Barker, Austin J. Boren, Christelle Moufawad El Achkar, Stephen J. Moss, et Rochelle M. Hines. 2022. « Human ARHGEF9 Intellectual Disability Syndrome Is Phenocopied by a Mutation That Disrupts Collybistin Binding to the GABAA Receptor A2 Subunit ». *Molecular Psychiatry* 27(3):1729-41. doi: 10.1038/s41380-022-01468-z.
- Huang, Claire Yu-Mei, et Matthew N. Rasband. 2018. « Axon initial segments: structure, function, and disease ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1420(1):46-61. doi: 10.1111/nyas.13718.
- Hugelier, Siewert, P. L. Colosi, et Melike Lakadamyali. 2023. « Quantitative Single-Molecule Localization Microscopy ». *Annual Review of Biophysics* 52(1):139-60. doi: 10.1146/annurev-biophys-111622-091212.
- Jacob, Tija C., Guido Michels, Liliya Silayeva, Julia Haydon, Francesca Succol, et Stephen J. Moss. 2012. « Benzodiazepine Treatment Induces Subtype-Specific Changes in GABA<sub>A</sub> Receptor Trafficking and Decreases Synaptic Inhibition ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(45):18595-600. doi: 10.1073/pnas.1204994109.
- Joëls, Marian. 2008. « Functional actions of corticosteroids in the hippocampus ». *European Journal of Pharmacology* 583(2):312-21. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.11.064.
- Khater, Ismail M., Ivan Robert Nabi, et Ghassan Hamarneh. 2020. « A Review of Super-Resolution Single-Molecule Localization Microscopy Cluster Analysis and Quantification Methods ». *Patterns* 1(3):100038. doi: 10.1016/j.patter.2020.100038.
- Khayenko, Vladimir, Clemens Schulte, Sara L. Reis, Orly Avraham, Cataldo Schietroma, Rafael Worschech, Noah F. Nordblom, Sonja Kachler, Carmen Villmann, Katrin G. Heinze, Andreas Schlosser, Ora Schueler-Furman, Philip Tovote, Christian G. Specht, et Hans Michael Maric. s. d. « A Versatile Synthetic Affinity Probe Reveals Inhibitory Synapse Ultrastructure and Brain Connectivity ». *Angewandte Chemie International Edition* n/a(n/a). doi: 10.1002/anie.202202078.

- Kling, C., M. Koch, et B. Saul. 1997. « THE FRAMESHIFT MUTATION OSCILLATOR (Gira1spd-Ot) ». *Neuroscience*. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(96\)00567-2](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(96)00567-2).
- Kudova, Eva. 2021. « Rapid effects of neurosteroids on neuronal plasticity and their physiological and pathological implications ». *Neuroscience Letters* 750:135771. doi: 10.1016/j.neulet.2021.135771.
- Kuhse, Jochen, Heba Kalbouneh, Andrea Schlicksupp, Susanne Mükusch, Ralph Nawrotzki, et Joachim Kirsch. 2012. « Phosphorylation of Gephyrin in Hippocampal Neurons by Cyclin-Dependent Kinase CDK5 at Ser-270 Is Dependent on Collybistin ». *Journal of Biological Chemistry* 287(37):30952-66. doi: 10.1074/jbc.M112.349597.
- Kuver, Aarti, Hui Shen, et Sheryl S. Smith. 2012. « Regulation of the Surface Expression of A $\beta$ 2 $\delta$  GABAA Receptors by High Efficacy States ». *Brain Research* 1463:1-20. doi: 10.1016/j.brainres.2012.04.047.
- Letierrier, Christophe. 2016. « The Axon Initial Segment, 50Years Later ». P. 185-233 in *Current Topics in Membranes*. Vol. 77. Elsevier.
- Letierrier, Christophe, Jean Potier, Ghislaine Caillol, Claire Debarnot, Fanny Rueda Boroni, et Bénédicte Dargent. 2015. « Nanoscale Architecture of the Axon Initial Segment Reveals an Organized and Robust Scaffold ». *Cell Reports* 13(12):2781-93. doi: 10.1016/j.celrep.2015.11.051.
- Lévi, Sabine, Nicolas Le Roux, Emmanuel Eugène, et Jean Christophe Poncer. 2015. « Benzodiazepine Ligands Rapidly Influence GABAA Receptor Diffusion and Clustering at Hippocampal Inhibitory Synapses ». *Neuropharmacology* 88:199-208. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.06.002.
- Lichtman, Jeff W., et José-Angel Conchello. 2005. « Fluorescence Microscopy ». *Nature Methods* 2(12):910-19. doi: 10.1038/nmeth817.
- Liere, Philippe, et Michael Schumacher. 2015. « Mass spectrometric analysis of steroids: all that glitters is not gold ». *Expert Review of Endocrinology & Metabolism* 10(5):463-65. doi: 10.1586/17446651.2015.1063997.
- Liu, Qiuli, et Margaret T. T. Wong-Riley. 2013. « Postnatal Development of Glycine Receptor Subunits A1, A2, A3, and  $\beta$  Immunoreactivity in Multiple Brain Stem Respiratory-Related Nuclear Groups of the Rat ». *Brain Research* 1538:1-16. doi: 10.1016/j.brainres.2013.09.028.
- Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore D. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science*. 2002 Feb 1;295(5556):868-72. doi: 10.1126/science.1067081. Epub 2002 Jan 10. PMID: 11786607.
- Lorenz-Guertin, Joshua M., Matthew J. Bambino, Sabyasachi Das, Susan T. Weintraub, et Tija C. Jacob. 2019. « Diazepam Accelerates GABAAR Synaptic Exchange and Alters Intracellular Trafficking ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 13:163. doi: 10.3389/fncel.2019.00163.
- Lu, Xinguo, Peter Lambert, Ann Benz, Charles F. Zorumski, et Steven J. Mennerick. 2023. « Allopregnanolone Effects on Inhibition in Hippocampal Parvalbumin Interneurons ». *Eneuro* 10(3):ENEURO.0392-22.2023. doi: 10.1523/ENEURO.0392-22.2023.
- Lynch, Joseph W. 2009. « Native glycine receptor subtypes and their physiological roles ». *Neuropharmacology* 56(1):303-9. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.07.034.
- Majtner, Tomáš. Analyzing Fluorescence Microscopic Images Through Texture Descriptors [online]. Brno, 2012 [cit. 2023-10-15]. Available from: <https://theses.cz/id/lcoh94/>. Masaryk University, Faculty of Informatics.

- Maynard, Stephanie A., Philippe Rostaing, Natascha Schaefer, Olivier Gemin, Adrien Candat, Andréa Dumoulin, Carmen Villmann, Antoine Triller, et Christian G. Specht. 2021. « Identification of a Stereotypic Molecular Arrangement of Endogenous Glycine Receptors at Spinal Cord Synapses ». *eLife* 10:e74441. doi: 10.7554/eLife.74441.
- Moss, Stephen J., et Trevor G. Smart. 2001. « Constructing Inhibitory Synapses ». *Nature Reviews Neuroscience* 2(4):240-50. doi: 10.1038/35067500.
- Niwa, Fumihito, Angela Patrizio, Antoine Triller, et Christian G. Specht. 2019. « cAMP-EPAC-Dependent Regulation of Gephyrin Phosphorylation and GABAAR Trapping at Inhibitory Synapses ». *iScience* 22:453-65. doi: 10.1016/j.isci.2019.11.013.
- Osuga, Mitsuo, Tamako Nishimura, et Shiro Suetsugu. 2021. « Development of a green reversibly photoswitchable variant of Eos fluorescent protein with fixation resistance ». *Molecular Biology of the Cell* 32(21):br7. doi: 10.1091/mbc.E21-01-0044.
- Saini, Arushi Gahlot, et Sanjay Pandey. 2020. « Hyperekplexia and Other Startle Syndromes ». *Journal of the Neurological Sciences* 416:117051. doi: 10.1016/j.jns.2020.117051.
- Schaefer, Natascha, Alexandra Berger, Johannes van Brederode, Fang Zheng, Yan Zhang, Sophie Leacock, Laura Littau, Sibylle Jablonka, Sony Malhotra, Maya Topf, Friederike Winter, Daria Davydova, Joseph W. Lynch, Christopher J. Paige, Christian Alzheimer, Robert J. Harvey, et Carmen Villmann. 2017. « Disruption of a Structurally Important Extracellular Element in the Glycine Receptor Leads to Decreased Synaptic Integration and Signaling Resulting in Severe Startle Disease ». *Journal of Neuroscience* 37(33):7948-61. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0009-17.2017.
- Schaefer, Natascha, Robert J. Harvey, et Carmen Villmann. 2022. « Startle Disease: New Molecular Insights into an Old Neurological Disorder ». *The Neuroscientist* 10738584221104724. doi: 10.1177/10738584221104724.
- Schverer, Marina, Laurence Lanfumey, Etienne-Emile Baulieu, Nicolas Froger, et Isabelle Villey. 2018. « Neurosteroids: non-genomic pathways in neuroplasticity and involvement in neurological diseases ». *Pharmacology & Therapeutics* 191:190-206. doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.06.011.
- Segala, Maria G. Paez, Mei G. Sun, Gleb Shtengel, Sarada Viswanathan, John J. Macklin, Ronak Patel, John R. Allen, Elizabeth S. Howe, Harald F. Hess, Michael W. Davidson, Yalin Wang, et Loren L. Looger. 2015. « Fixation-Resistant Photoactivatable Fluorescent Proteins for Correlative Light and Electron Microscopy ». *Nature Methods* 12, 215–218
- Sigel, Erwin, et Andreas Buhr. 1997. « The benzodiazepine binding site of GABA<sub>A</sub> receptors ». *Trends in Pharmacological Sciences* 18(11):425-29. doi: 10.1016/S0165-6147(97)01118-8.
- Solomon, Viswas Raja, Vikram J. Tallapragada, Mary Chebib, G. A. R. Johnston, et Jane R. Hanrahan. 2019. « GABA Allosteric Modulators: An Overview of Recent Developments in Non-Benzodiazepine Modulators ». *European Journal of Medicinal Chemistry* 171:434-61. doi: 10.1016/j.ejmech.2019.03.043.
- Stell, Brandon M., Stephen G. Brickley, C. Y. Tang, Mark Farrant, et Istvan Mody. 2003. « Neuroactive Steroids Reduce Neuronal Excitability by Selectively Enhancing Tonic Inhibition Mediated by  $\delta$  Subunit-Containing GABA<sub>A</sub> Receptors ». *Biological sciences* 100 (24) 14439-14444
- Tretter, Verena. 2012. « Gephyrin, the Enigmatic Organizer at GABAergic Synapses ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 16. 10.3389/fncel.2012.00023
- Tukker, Anke M., Misha F. Vrolijk, Regina G. D. M. van Kleef, Dick T. H. M. Sijm, et Remco H. S. Westerink. 2023. « Mixture effects of tetrodotoxin (TTX) and drugs targeting voltage-gated sodium channels on spontaneous neuronal activity in vitro ». *Toxicology Letters* 373:53-61. doi: 10.1016/j.toxlet.2022.11.005.

- Tyagarajan, Shiva K., Himanish Ghosh, Gonzalo E. Yévenes, Irina Nikonenko, Claire Ebeling, Cornelia Schwerdel, Corinne Sidler, Hanns Ulrich Zeilhofer, Bertran Gerrits, Dominique Muller, et Jean-Marc Fritschy. 2011. « Regulation of GABAergic synapse formation and plasticity by GSK3 $\beta$ -dependent phosphorylation of gephyrin ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(1):379-84. doi: 10.1073/pnas.1011824108.
- Vinkers, Christiaan H., et Berend Olivier. 2012. « Mechanisms Underlying Tolerance after Long-Term Benzodiazepine Use: A Future for Subtype-Selective GABAA Receptor Modulators? » *Advances in Pharmacological Sciences* 2012:416864. doi: 10.1155/2012/416864.
- Waites, C. L., C. G. Specht, K. Hartel, S. Leal-Ortiz, D. Genoux, D. Li, R. C. Drisdell, O. Jeyifous, J. E. Cheyne, W. N. Green, J. M. Montgomery, et C. C. Garner. 2009. « Synaptic SAP97 Isoforms Regulate AMPA Receptor Dynamics and Access to Presynaptic Glutamate ». *Journal of Neuroscience* 29(14):4332-45. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4431-08.2009.
- Wiedenmann, Jörg, Sergey Ivanchenko, Franz Oswald, Florian Schmitt, Carlheinz Röcker, Anya Salih, Klaus-Dieter Spindler, et G. Ulrich Nienhaus. 2004. « EosFP, a fluorescent marker protein with UV-inducible green-to-red fluorescence conversion ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(45):15905-10. doi: 10.1073/pnas.0403668101.
- Wu, Xia, Zheng Wu, Gang Ning, Yao Guo, Rashid Ali, Robert L. Macdonald, Angel L. De Blas, Bernhard Luscher, et Gong Chen. 2012. «  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Type A (GABAA) Receptor  $\alpha$  Subunits Play a Direct Role in Synaptic Versus Extrasynaptic Targeting ». *Journal of Biological Chemistry* 287(33):27417-30. doi: 10.1074/jbc.M112.360461.
- Wulffele, Jip, Daniel Thedié, Oleksandr Glushonkov, et Dominique Bourgeois. 2022. « mEos4b Photoconversion Efficiency Depends on Laser Illumination Conditions Used in PALM ». 2022.03.31.486573.
- Zorumski, Charles F., Steven M. Paul, Douglas F. Covey, et Steven Mennerick. 2019. « Neurosteroids as novel antidepressants and anxiolytics: GABA-A receptors and beyond ». *Neurobiology of Stress* 11:100196. doi: 10.1016/j.ynstr.2019.100196.

## **Annexe**

## **Role of the glycine receptor $\beta$ subunit in synaptic localization and pathogenicity in severe startle disease**

**Anna-Lena Wiessler<sup>1</sup>, Ann-Sofie Hasenmüller<sup>1</sup>, Isabell Fuhl<sup>1</sup>, Clémence Mille<sup>2</sup>, Orlando Cortes Campo<sup>1</sup>, Nicola Reinhard<sup>1</sup>, Joachim Schenk<sup>3</sup>, Katrin G Heinze<sup>3</sup>, Natascha Schaefer<sup>1</sup>, Christian G Specht<sup>2</sup> and Carmen Villmann<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>*Institute for Clinical Neurobiology, University Hospital, Julius-Maximilians-University of Würzburg, Germany,* <sup>2</sup>*French Institute of Health and Medical Research (Inserm), Université Paris-Saclay, Le Kremlin-Bicêtre, France,* <sup>3</sup>*Rudolf Virchow Center for Integrative and Translational Bioimaging, Julius-Maximilians-University of Würzburg, Germany*

### **Abstract**

Startle disease is due to the disruption of recurrent inhibition in the spinal cord. Most common causes are genetic variants in genes (*GLRA1*, *GLRB*) encoding inhibitory glycine receptor (GlyR) subunits. The adult GlyR is a heteropentameric complex composed of  $\alpha 1$  and  $\beta$  subunits that localizes at postsynaptic sites and replaces embryonically expressed GlyR $\alpha 2$  homomers. Human GlyR variants of *GLRA1* and *GLRB*, dominant and recessive, have been intensively studied *in vitro*. However, the role of unaffected GlyR $\beta$ , essential for synaptic GlyR localization, in the presence of mutated GlyR $\alpha 1$  *in vivo* is not fully understood. Here, we used knock-in mice expressing endogenous mEos4b-tagged GlyR $\beta$  that were crossed with mouse *Gla1* startle disease mutants. We explored the role of GlyR $\beta$  under disease conditions in mice carrying a missense mutation (*shaky*) or resulting from the loss of GlyR $\alpha 1$  (*oscillator*). Interestingly, synaptic targeting of GlyR $\beta$  was largely unaffected in both mouse mutants. While synaptic morphology appears unaltered in *shaky* animals, synapses were notably smaller in homozygous *oscillator* animals. Hence, GlyR $\beta$  enables transport of functionally impaired GlyR $\alpha 1$  missense variants to synaptic sites in *shaky* animals, which has an impact on the efficacy of possible compensatory mechanisms. The observed enhanced GlyR $\alpha 2$  expression in *oscillator* animals points to a compensation by other GlyR $\alpha$ -subunits. However, trafficking of GlyR $\alpha 2\beta$  complexes to synaptic sites remains functionally insufficient and homozygous *oscillator* mice still die at three weeks after birth. Thus, both functional and structural deficits can affect glycinergic neurotransmission in severe startle disease, eliciting different compensatory mechanisms *in vivo*.

## Introduction

Hyperekplexia (OMIM147100, startle disease) is a rare neurological motor disorder (Becker, 1995). Symptoms are severe and sometimes life-threatening including massive rigidity, high muscle tonus and excessive startle to unexpected acoustic or tactile stimuli. The disease is caused by mutations in genes encoding glycine receptor (GlyR) subunits or the glycine transporter 2 (GlyT2). GlyRs enable fast inhibitory neurotransmission in the adult brainstem (BS) and spinal cord (SC) and are important for proper motor control (Lynch, 2004). They belong to the superfamily of cys-loop receptors and are pentameric ligand-gated chloride channels. Each subunit consists of a large N-terminal extracellular domain (ECD), four transmembrane (TM) domains and a short extracellular C-terminus (Du et al., 2015; Huang et al., 2015). Four  $\alpha$  ( $\alpha$ 1- $\alpha$ 4) and one  $\beta$  subunit of GlyRs have been identified. GlyR $\alpha$  subunits can form homomeric pentamers located at presynapses or extrasynaptic sites (Turecek and Trussell, 2001; Xiong et al., 2014), whereas GlyR $\beta$  can only form functional ion channels when co-assembled with GlyR $\alpha$  in various subunit stoichiometries (Durisic et al., 2012; Patrizio et al., 2017; Yu et al., 2021; Zhu and Gouaux, 2021). The  $\beta$  subunit directs GlyRs to synapses due to a direct interaction with the scaffold protein gephyrin (Kneussel and Betz, 2000; Chapdelaine et al., 2021). The GlyR $\beta$  subunit has been associated with anxiety and panic disorders (Deckert et al., 2017; Schaefer et al., 2020). GlyR $\beta$  mRNA was found to be widely expressed throughout the SC and the brain (Malosio et al., 1991). A non-commercial monoclonal antibody has been generated, enabling the detection of GlyR $\beta$  at the protein level in SC, BS, and midbrain (Weltzien et al., 2012).

During development, homomeric GlyR $\alpha$ 2 represents the major form of GlyRs. A subunit switch after birth has been described resulting in the expression of mainly GlyR $\alpha$ 1 $\beta$  complexes in adult BS nuclei and SC. In contrast,  $\alpha$ 2 expression decreases after a peak at postnatal day 7 to 10 (Liu and Wong-Riley, 2013; Morelli et al., 2017). Mutations in the genes *GLRA1* (GlyR $\alpha$ 1), *GLRB* (GlyR $\beta$ ) and *SLC6A5* encoding GlyT2 are the major underlying causes of startle disease in humans and rodents (Rees et al., 2006; Chung et al., 2010; Chung et al., 2013; James et al., 2013; Bode and Lynch, 2014; Schaefer et al., 2015; Piro et al., 2021). Most mutations were found in *GLRA1* for which different mouse models exist. The mouse model *oscillator* represents an GlyR $\alpha$ 1 structural null mutation. A microdeletion leads to an early STOP codon resulting in a complete loss of GlyR $\alpha$ 1 protein expression. Homozygous *oscillator* mice show severe symptoms starting around P14 and die at three weeks of age (Buckwalter et al., 1994; Kling et al., 1997). Whether the lack of GlyR $\alpha$ 1 has an influence on the GlyR $\beta$  expression and/or localization remains unclear. Interestingly, in heterozygous *oscillator* mice, the packing density of GlyR number of 2000/ $\mu$ m<sup>2</sup> at SC synapses did not change compared to wildtype. Yet, significant alterations were observed regarding the size and morphology of glycinergic synapses (Maynard et al., 2021). The effect of the more severe, homozygous *oscillator* mutations on glycinergic synapses has not yet been analyzed. *Shaky*, another severe startle disease model carries a missense mutation Q177K in the  $\beta$ 8- $\beta$ 9 loop of the GlyR ECD. Symptoms in homozygous *shaky* mice start at P16 and increase during the following week, but the mice die somewhat later, at around 4-6 weeks. It has been suggested that *shaky* underlies altered GlyR $\alpha$ 1 synaptic targeting (Schaefer et al., 2017), however, the role of the GlyR $\beta$  subunit in this context is not yet understood.

In this study, we make use of a newly generated knock-in *Glr<sup>b</sup><sup>EOS</sup>* mouse line that allows the specific detection of GlyR $\beta$  via the mEos4b fluorescence tag (Maynard et al., 2021). This reporter mouse was crossed with two different startle disease lines, namely *oscillator* and *shaky*, to investigate the role of GlyR $\beta$  in the pathogenicity as a result of functional or structural GlyR $\alpha$ 1 deficiency.

## Materials and methods

### PCR genotyping

Genotyping from the *Glrb*<sup>eos</sup> mouse line (*Glrb*<sup>tm1(Eos4)lcs</sup>, MGI:6331065) and two hybrid mouse lines *Glra*<sup>1spdot</sup>/*Glrb*<sup>eos</sup> (*oscillator*, JAX stock #000536, RRID:IMSR\_JAX:000536) and *Glra*<sup>1shy</sup>/*Glrb*<sup>eos</sup> (*shaky*, (Schaefer et al., 2017); C. Paige, University Health Network Research, Toronto, Canada) was performed as described in (Maynard et al., 2021) and (Schaefer et al., 2018), respectively.

### Immunohistochemical stainings of brain and spinal cord tissue

Brains and SCs were extracted from deeply anesthetized *Glra*<sup>1+/+</sup>/*Glrb*<sup>eos/eos</sup> and *Glra*<sup>1spdot/spdot</sup>/*Glrb*<sup>eos/eos</sup> mice, embedded in Tissue-Tek<sup>TM</sup> (4583, Sakura Finetek, CA, U.S.) and immediately frozen on dry ice. A cryostat (CM1950, Leica, Wetzlar, Germany) with a chamber temperature of -20°C was used to cut sections of 9 µm thickness. Sections were mounted on SuperFrost Plus slides (03-0060 Langenbrinck, Emmendingen, Germany) and directly used for stainings or stored at -80°C. Sections were fixed with ice cold 2% paraformaldehyde (PFA) in phosphate-buffered saline (PBS) pH7.4 for 30 s at room temperature (RT). After washing in PBS pH7.4, sections were shortly dipped in 50 mM NH<sub>4</sub>Cl for quenching and incubated in 0.1 mM glycine for 30 min. For blocking, 10% normal goat serum (NGS) in PBS pH7.4 were used followed by primary antibody incubation with anti-mEos-Cy3 (N3102-SC3-L, 1:200, Nanotag, Göttingen, Germany), GlyRα1 (146111, RRID:AB\_887723, 1:500, Synaptic Systems, Göttingen, Germany), GlyRα2 (NBP3-03685, 1:1000, Novus Biologicals, Wiesbaden, Germany) and gephyrin (147111, RRID:AB\_887719, 1:500, Synaptic Systems, Göttingen, Germany) in blocking solution over night (ON) at 4°C. Secondary antibody goat-anti-mouse-Cy5 (115-175-146, Dianova, Hamburg, Germany) diluted 1:500 in blocking solution was incubated for 1 h in the dark at RT and nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) in PBS pH7.4 for another 10 min. Sections were mounted in Fluor Save Reagent (345789, Calbiochem, Darmstadt, Germany) and sealed with a glass coverslip.

### Spinal cord tissue preparation for spinal cord clearing and Photoactivated Localization Microscopy (PALM)

Mice were perfused with 4% w/v PFA (Polysciences, EM grade) and 0.1% v/v glutaraldehyde (GA; CliniSciences) in PBS pH7.4. Perfused animals were kept on ice for 30 min, followed by the dissection of the brain and SC in PBS. Tissue was post-fixed in 4% w/v PFA in PBS ON at 4°C, rinsed in PBS, and kept in PBS containing 30% w/v sucrose ON at 4°C.

The SCs were cut into smaller segments of thoracic and lumbar regions and either used for the spinal cord clearing protocol or embedded in Neg-50 medium (6502G, Thermo Scientific, MA, USA) before being frozen and stored at -80°C. A cryostat (CM3050S, Leica, Wetzlar, Germany) with a chamber temperature of -23°C was used to cut sections of 4 µm nominal thickness. Sections were mounted in PBS on SuperFrost Plus slides (J1800AMNZ, Thermo Scientific, MA, USA), using a glass coverslip (type #1.5, 0.17 µm thickness, cat. No. 6310134, VWR, PA, USA) and sealed with silicone polymer (picodent twinsil speed 22). The slides were directly used for PALM imaging.

### Spinal cord clearing

Spinal cord tissue-clearing was performed following the recently published ultimate DISCO (uDISCO) method (Pan et al., 2016) as it combines good clearing capability with the preservation of mEos4b fluorescent signals.

### **Primary spinal cord neurons**

Mixed SC neurons were prepared from the different mouse lines at the embryonic day 12-13. Experiments were approved by the local veterinary authority (Veterinäramt der Stadt Würzburg, Germany) and the Ethics Committee of Animal Experiments, i.e. Regierung von Unterfranken, Würzburg, Germany (license no.:55.2.2-2532.2-949-31). Neuronal cultures were prepared as described previously (Fischhaber et al., 2021). Genotyping was performed for each individual embryo individually as described above. Staining was done after 16-18 days *in vitro* (DIV16-18).

### **Immunocytochemical stainings**

*Stainings of spinal cord neurons* - Cells and cultured neurons on glass coverslips were fixed with 4% PFA/ 4% sucrose in PBS pH7.4 for 20 min at RT. Afterwards, cells were blocked and permeabilized with 5% NGS/0.2% Triton X-100 in PBS for 30 min. Primary antibodies against GFP (SC8224, RRID:AB\_2276004, 1:500, Santa Cruz, California, U.S.), gephyrin (147011, RRID:AB\_887719, 1:500, Synaptic Systems, Göttingen, Germany), GlyR $\alpha$ 1 (146111 or 146118, RRID:AB\_887723 or RRID:AB\_2832240, 1:500, Synaptic Systems, Göttingen, Germany), pan- $\alpha$ -GlyR (146011, RRID:AB\_887721, 1:250, Synaptic Systems, Göttingen, Germany) and anti-mEos-488 (N3102-At488, 1:200, Nanotag, Göttingen, Germany) in blocking solution were incubated for 1 h, followed by incubation with the secondary antibodies goat-anti-rabbit-Alexa-488 (111-546-003, RRID:AB\_2338053, Dianova, Hamburg, Germany), goat-anti-mouse-Cy3 (115-165-003, RRID:AB\_2338680, Dianova, Hamburg, Germany), goat-anti-rabbit-Cy3 (111-165-003, RRID:AB\_2338000, Dianova, Hamburg, Germany), goat-anti-mouse-Cy5 (115-175-146, Dianova, Hamburg, Germany) or goat-anti-rabbit-Cy5 (111-175-006, Dianova, Hamburg, Germany) diluted 1:500 blocking solution for 1 h in the dark. Cell nuclei were stained with DAPI in PBS for 5 min, and cells were mounted on glass slides in Mowiol.

*Immunostaining of spinal cord tissue slices used for Photoactivated Localization Microscopy (PALM)* - The slices were placed on SuperFrost Plus glass slides (see above), permeabilized and blocked in PBS containing 4% w/v BSA (A7030, Sigma) and 0.25% v/v Triton X-100 for 1 h at RT. Primary anti-gephyrin antibody (mAb7a, 147011, RRID:AB\_887719, Synaptic Systems, Göttingen, Germany) was applied at a dilution of 1:500 in blocking solution (PBS with 1% BSA and 0.06% Triton X-100) for 2.5 h at RT. After three washes for 5 min in PBS the secondary antibody goat-anti-mouse-IgG-Alexa-647 (A21236, Invitrogen) was applied at a 1:1000 dilution in blocking solution for 90 min in the dark at RT. Sections were mounted in PBS with a glass coverslip and sealed with picodent twinstil. Acquisition parameters of conventional fluorescence images (Zeiss ELYRA PS.1 setup): 10 image frames of 50 ms exposure were taken at 488 nm with 0.2% laser intensity (nominal laser power: 300 mW) and a camera gain of 300 to record the unconverted (green) mEos4b-GlyR $\beta$  fluorescence. Gephyrin immunofluorescence was detected in the far red channel, by taking 10 images of 100 ms with the 642 nm laser (nominal laser power: 150 mW) at 5% output and a camera gain of 200. The stacks of images were averaged, resulting in a single image for each fluorescence channel.

## Western blot

SC, BS and cortex of deeply anaesthetized 2-4 weeks old *Glr1<sup>+/+</sup>/Glrb<sup>eos/eos</sup>* and *Glr1<sup>spdot/spdot</sup>/Glrb<sup>eos/eos</sup>* animals of both sexes were extracted and frozen at -80°C. Lysates were prepared using a glass-homogenizer in 1 ml homogenisation buffer (in mM: 20 HEPES, 100 potassium acetate, 40 KCl, 5 EGTA, 5 MgCl<sub>2</sub>, 5 DTT, 1% Triton X-100, 1 PMSF (freshly added), protease inhibitors (Roche, Mannheim, Germany)). After a 15 min centrifugation at 10,000 x *g* at 4°C, the supernatant containing the protein samples was transferred and 20 µg of protein was used for Western blotting.

For SDS-PAGE, 11% polyacrylamide gels were freshly prepared, followed by Western blot on nitrocellulose membranes (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Membranes were blocked for 1 h with 5% BSA in TBS-T (TBS with 1% Tween 20). Primary antibodies against different glycine receptor subunits were GlyRα1 (AB5052, RRID:AB\_91659, 1:1,000, Merck, Darmstadt, Germany), GlyRα2 (NBP3-03685, 1:1,000, Novus Biologicals, Wiesbaden, Germany) and pan-α-GlyR (146008, 1:1,000, Synaptic Systems, Göttingen, Germany). Anti-GAPDH (CB1001, 1:1,000, Merck, Darmstadt, Germany) served as loading control. Following a 1 h incubation with a horseradish peroxidase-coupled secondary antibody (Dianova, Hamburg, Germany, 111-036-003, RRID:AB\_2337942 and 115-035-146, RRID:AB\_2307392, 1:15,000) at RT, immunoreactivity was detected through chemiluminescence using clarity™ Western ECL substrate (Clarity Western Peroxide Reagent, BioRad 170-5061, California, U.S.). Data analysis was performed using Fiji software (Schindelin et al., 2012).

## Electrophysiological recordings

Patch-clamp whole-cell recordings at RT were performed using recording pipettes pulled from borosilicate capillaries with open resistances of 3.5-5.5 MΩ and filled with internal buffer (in mM: 140 CsCl, 1 EGTA, 10 HEPES, 6 D-glucose; pH 7.2, adjusted with CsOH). Current amplitudes and dose-response curves (EC<sub>50</sub> values) were measured by application of glycine in a concentration series of 10-600 µM in external buffer (in mM: 130 NaCl, 3 KCl, 1.5 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 6 D-glucose, 10 TEA-Cl; pH 7.35, adjusted with NaOH). Glycine solutions were applied by the Octaflow II system (ALA Scientific Instruments, Farmingdale, NY, U.S.). To ensure that heteromeric GlyRs were expressed by the neurons, 100 µM glycine was applied in external buffer supplemented with 50 µM picrotoxinin (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) at the end of the recordings. When current amplitudes were blocked with picrotoxinin by more than 50% compared to 100 µM glycine application alone, cells were excluded from analysis since homomeric GlyRs show a higher sensitivity to picrotoxinin (Pribilla et al., 1992). Current responses were amplified with an EPC-10 amplifier (HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany) and measured at a holding potential of -60 mV using Patchmaster Next software (HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany).

## Fluorescence imaging, image processing and analysis

Images of immunocytochemical stainings in cultures were captured using a confocal Olympus Fluoview ix1000 microscope (Olympus, Hamburg, Germany) with an UPLSAPO 60x oil objective (N.A. 1.35), the software Fluoview FV 1000 and diode lasers of 405 nm, 495 nm, 560 nm and 647 nm. Immunohistochemical stainings in tissue were captured by a wide-field Zeiss Axio Imager 2 microscope (Zeiss, Jena, Germany) with an 20x air objective (N.A. 0.8), the ZEN software 2.6 and light sources of 385 nm, 469 nm, 555 nm and 630 nm. All images were captured in 1024x1024 pixels and 16 bit.

We used the Fiji software for image processing and analysis. Puncta per 100 µm dendrite length were analysed via the plugins NeuronJ and SynapcountJ. With NeuronJ

dendrites were traced in the gephyrin channel. Puncta were count with SynapcountJ for every individual channel and all combinations of colocalization of two channels by using the dendrite mask from NeuronJ and a diameter of 10 pixels for dendrite thickness. Thresholds were 132 for single channels and 60-120 for GlyR $\beta$ -gephyrin, 60-132 for GlyR $\beta$ -GlyR $\alpha$  and 60-132 for gephyrin-GlyR $\alpha$ . Extrasynaptic puncta were calculated by subtracting the puncta which colocalize with gephyrin from the whole amount of protein puncta.

### **3D - Microscopy and Image processing**

*Photoconversion and confocal image acquisition.* Photoconversion was performed prior to imaging with a laser scanning confocal microscope (TCS-SP8 Leica, Wetzlar, Germany), operated by LAS X (3.1.5.16308) software, equipped with a HC PL0-95 FLUOTAR 10x/0.30 DRY objective using a 405 nm laser at 0.2% intensity. The photoconversion was performed at 400 Hz, zoom 0.95, in a region of 1.22 x 1.22 x 0.23 mm (voxel dimensions 2.40 x 2.40 x 0.13  $\mu$ m).

Subsequently, imaging was performed by exciting mEos4b-GlyR $\beta$  at 561 nm and detecting the fluorescence emission by a Hybrid detector in the range from 570 to 630 nm. Images were collected at 400 Hz, zoom 0.95, region of 1.22 x 1.22 x 0.83 mm (voxel dimensions 0.38 x 0.38 x 3.00  $\mu$ m).

*Image processing.* The raw image was deconvolved using the Deconvolution Wizard from Huygens Professional 22.10 (Scientific Volume Imaging, B. V., Hilversum, Netherlands). Briefly, the SNR was automatically set to 1.5 and the estimated background was automatically set to 0 using a radius of 1  $\mu$ m. Using an acuity of 150, 16 iterations were needed to meet the quality criterion of 0.01.

Next, the image was segmented using Imaris 10.0.0 (Bitplane AG, Abington, U.K.) to remove objects outside the main spinal cord. The surface tool was applied with a smoothing radius of 10  $\mu$ m and objects smaller than  $1.1e7$  voxel were removed.

### **Photoactivated Localization Microscopy (PALM)**

Single molecule based super-resolution imaging (photoactivated localization microscopy, PALM) was carried with an ELYRA PS.1 (Zeiss, Jena, Germany) microscope setup. Samples were placed on the motorized XY scanning stage of the Axio Observer.Z1 SR inverted microscope, and imaged with a Plan-Apochromat 100x oil-immersion objective (N.A. 1.46) with an additional 1.6x lens in the emission path, using an Andor iXon 897 back-thinned EMCCD camera (16 bit, 512x512 pixels, 16  $\mu$ m pixel size, QE 90%), resulting in a final image pixel size of 100 nm. For wide-field imaging in the green channel, we used a 488 nm excitation laser (300 mW) and a BP 495-575 + LP 750 emission filter. PALM imaging in the red channel was done with a 405 nm laser (50 mW) for photoconversion and a 561 nm laser (200 mW) for excitation; the emitted light was filtered with a BP 570-650 + LP 750 filter. Images were acquired with Zen software (Zeiss, Zen 2012 SP5 FP3 black, 64 bit).

PALM acquisition parameters: First we identified glycinergic synapses in the gray matter of the spinal cord slices with the 488 nm laser at low intensity. Reference images of the unconverted (green) mEos4b-GlyR $\beta$  fluorescence were taken with an exposure time of 100 ms (25 frames, image size 256x256 pixels) and averaged. PALM movies of 20000 frames were then recorded with constant 561 nm laser illumination (output power 80%, 50 ms streamed acquisition, EMCCD gain 300). Photoconversion of mEos4b-GlyR $\beta$  was done by continuous 405 nm laser illumination (gradually increased from 0.01% to 5% intensity by frame 20,000).

### **PALM image analysis**

The PALM movies were analyzed with Zen PALM software using the following parameters: a mask size of 9 pixels for peak detection, an intensity threshold of 6 (signal to noise ratio), and with exclusion of overlapping molecules. The images were drift corrected by temporal correlation of the detection coordinates, and rendered super-resolution images were generated by representing each detection with a two-dimensional Gaussian distribution with a width  $\sigma$  corresponding to 0.8x the localization precision of each detection and a pixel size of 10 nm. We used the spot detector plugin from Icy software (<https://icy.bioimageanalysis.org>, v. 2.4.3.0, Institut Pasteur, parameters: scale 3 and scale 4, sensitivity 100, size filtering 100-1000 px) to detect dense clusters of mEos4b-GlyR $\beta$  in the rendered images, likely representing glycinergic synapses. The output data consist in a table of ROIs with the numbers of spots detected and the mean area of the ROIs in each image.

### **Experimental design and statistical analysis**

All experiments were performed with at least three different male or female animals per genotype. The numbers of experiments/animals and dendrites for synaptic density analysis are displayed in Tables 1-3. We used Graph Pad Prism for statistical analysis. Data are represented as mean  $\pm$  S.E.M. (standard error of the mean). Outliers were identified by ROUT (Q=1%) and removed. Normality of the data was reviewed by Shapiro-Wilk normality test ( $\alpha=0.05$ ). Statistical significance was calculated using an unpaired two-tailed Mann-Whitney test, a Kruskal-Wallis test, an one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test, or an unpaired t-test depending on the data set. All p-values are given in the results part and Tables 1-3. The 0-hypothesis was rejected at a level of  $p < 0.05$ .

## Results

### GlyR $\beta$ protein is widely expressed throughout the brain and colocalizes with GlyR $\alpha$ 1

GlyR $\beta$  is responsible for the synaptic localization of the inhibitory GlyR complexes via interaction with the scaffold protein gephyrin (Kneussel and Betz, 2000). While GlyR $\alpha$ 1 protein expression is well documented in different BS nuclei, e.g. cochlear nucleus, spinal nucleus of the trigeminal nerve, and hypoclossal nucleus (Wenthold et al., 1988), GlyR $\beta$  expression has been mainly shown at the mRNA level (Malosio et al., 1991). Recently, a *Glrb*<sup>eos</sup> mouse line carrying a GlyR $\beta$  allele with an N-terminal mEos4b fluorophore tag (*Glrb*<sup>tm1(Eos4)cs</sup>, MGI:6331065) was generated allowing the detection of GlyR $\beta$  protein expression (Maynard et al., 2021). Following large-scale screening of the whole mouse brain via vibratome-sections of 180  $\mu$ m thickness, regions with high GlyR expression were cut in 9  $\mu$ m thin cryo-sections and stained by immunohistochemistry, followed by imaging of the GlyR $\beta$  and GlyR $\alpha$ 1 immunoreactivity (Figures 1, 2).

As expected, highest expression levels were observed in SC and BS. GlyR $\alpha$ 1 was detected in *Glrb*<sup>+/+</sup> and *Glrb*<sup>eos/eos</sup> SC via a commercial GlyR $\alpha$ 1-specific antibody (mAb2b). The mEos4b-GlyR $\beta$  signal was only seen in SC sections of *Glrb*<sup>eos/eos</sup> mice (Figure 1A-B). A highly abundant mEos4b signal in the dorsal as well as in the ventral horn of the spinal cord was also observed after spinal cord clearing, imaging, and 3D reconstruction (Figure 1C-C<sub>2</sub>). GlyR $\beta$  was also highly expressed and colocalized with GlyR $\alpha$ 1-positive BS nuclei such as the hypoglossal nucleus (Figure 1D, zoomed detail in Figure D<sub>1</sub>).

GlyR $\beta$  has recently been associated with fear and panic disorders (Deckert et al., 2017; Lueken et al., 2017). Accordingly, we found high GlyR $\beta$  protein expression in the midbrain, e.g. in the periaqueductal gray (PAG) area, which plays a central role in fear and anxiety circuits (Tovote et al., 2016; Signoret-Genest et al., 2023). GlyR $\alpha$ 1 signals in the PAG were weak, but colocalized with GlyR $\beta$  in *Glrb*<sup>eos/eos</sup> mice (Figure 2A, A<sub>1</sub>). Additionally, GlyR $\beta$  has been detected in parts of the forebrain that were identified as integrating areas and relay nodes in anxiety networks (Kirouac, 2021), e.g. thalamus (TH) and hypothalamus (HY) (Figure 2B, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>). Within the thalamic nuclei, there were differences in GlyR $\beta$  expression. The parafascicular nucleus of the intralaminar part of the TH showed strong GlyR $\beta$  expression highly colocalised with GlyR $\alpha$ 1 (Figure 2B<sub>1</sub>). In contrast, GlyR $\beta$  was not identified in the lateral geniculate complex and lateral posterior nucleus of the TH. The HY showed a more constant signal for GlyR $\beta$  and GlyR $\alpha$ 1, as exemplified for the zona incerta (Figure 2B<sub>2</sub>).

For the hippocampal formation (HC), there was only a uniform and weak GlyR $\beta$  signal, with only few cells stained for GlyR $\alpha$ 1 in the CA3 region but not the CA1 region or the dentate gyrus (Figure 2B<sub>3</sub>). Therefore, it appears that GlyR $\beta$  expression the hippocampus is very low and limited to few cells.

In summary, a broad protein expression of GlyR $\beta$  in many regions of the central nervous system have been observed, that in most cases colocalized with GlyR $\alpha$ 1. The strongest signals for both GlyR subunits were found in the SC and BS, which are known to express the highest levels of GlyRs in the CNS (Wenthold et al., 1988).

### GlyR $\beta$ expression in gephyrin clusters is unchanged in *oscillator* mice

The main cause of startle disease in humans are mutations in *GLRA1*. Different spontaneous mutations of *Glra1* in mice have been discovered leading to a similar pathology. To unravel the fate of the GlyR $\beta$  subunit and a possible role in the pathophysiology of startle disease, we crossed *Glrb*<sup>eos/eos</sup> animals (with normal GlyR $\alpha$ 1 expression) with *Glra1* mutant

mouse strains. First, a hybrid *oscillator* mouse line was generated that allowed the specific detection of mEos4b-GlyR $\beta$  in the absence of GlyR $\alpha$ 1 expression (Figure 3A). *Oscillator* represents a *Glr1* null mutation due to a frameshift deletion in exon 8 resulting in an early STOP codon (Buckwalter et al., 1994; Kling et al., 1997). Crossing mice heterozygous for the *oscillator* allele and homozygous for *Glr<sup>eos</sup>* mice resulted in wildtype, heterozygous, and homozygous *oscillator* animals positive for *Glr<sup>eos</sup>*. Homozygous *oscillator* animals showed severe startle disease. First symptoms developed around day 14 after birth followed by significant weight loss from day 16 on compared to *Glr1<sup>+/+</sup>* and *Glr1<sup>+/spdot</sup>* littermates (Figure 3B, at day 16: *Glr1<sup>+/+</sup>* vs. *Glr1<sup>spdot/spdot</sup>* \*\*\* $p=0.0004$  and *Glr1<sup>+/spdot</sup>* vs. *Glr1<sup>spdot/spdot</sup>* \*\* $p=0.0052$ ). Loss of body weight is a typical sign of homozygous animals which display difficulties with milk sucking and swallowing due to impaired muscle contraction required for these processes. The onset of startle disease symptoms is characterized by tremor, muscle spasms, twitchy tail, stiffness, and poor motor control compared to age-matched littermates. At days 18/19 *Glr1<sup>spdot/spdot</sup>* mice had to be sacrificed and tissues were used for immunohistochemical experiments (see Figure 5). To determine GlyR $\beta$  localization, mixed SC cultures (N=3) of *Glr1<sup>+/+</sup>/Glr<sup>eos/eos</sup>* and *Glr1<sup>spdot/spdot</sup>/Glr<sup>eos/eos</sup>* neurons were stained for GlyR $\beta$ , GlyR $\alpha$ , and gephyrin. A variance analysis for the observed numbers of puncta per 100  $\mu$ m dendrite for the investigated proteins between different cultures did not reveal any significant changes ( $p=0.3239$ ; data not shown), hence the puncta data have not been normalized. Since homozygous *oscillator* animals (*Glr1<sup>spdot/spdot</sup>/Glr<sup>eos/eos</sup>*) do not express GlyR $\alpha$ 1, a pan- $\alpha$  antibody (mAb4A) was used to stain for all GlyR  $\alpha$ -subunits (Figure 3C). The density (puncta per 100  $\mu$ m dendrite length) was calculated for the individual proteins (GlyR $\beta$ , GlyR $\alpha$ , and gephyrin, Figure 3D-F) as well as colocalization of GlyR $\beta$  with GlyR $\alpha$  (Figure 3G) and GlyR $\beta$  or GlyR $\alpha$  in gephyrin positive clusters (Figure 3H, I). While the puncta for GlyR $\beta$  were significantly reduced in *Glr1<sup>spdot/spdot</sup>/Glr<sup>eos/eos</sup>* neurons (\* $p=0.0275$ ) consistent with previous findings (Maynard et al., 2021), GlyR $\alpha$  showed a significantly increased puncta density in *Glr1<sup>spdot/spdot</sup>/Glr<sup>eos/eos</sup>* neurons compared to wildtype (\*\* $p=0.0060$ ). The overall number of gephyrin puncta was not significantly different between the different genotypes ( $p=0.4663$ ). Interestingly, the colocalisation of GlyR $\beta$  with gephyrin that represents synaptic but may also include a minor portion of extrasynaptic GlyR $\beta$ -positive populations showed no difference between *Glr1<sup>+/+</sup>/Glr<sup>eos/eos</sup>* and *Glr1<sup>spdot/spdot</sup>/Glr<sup>eos/eos</sup>* neurons ( $p=0.1976$ ). The same was the case for the colocalization of GlyR $\alpha$  with gephyrin ( $p=0.7803$ ). The colocalisation of GlyR $\beta$  and GlyR $\alpha$  in *Glr1<sup>spdot/spdot</sup>/Glr<sup>eos/eos</sup>*, which refers to heteromeric GlyRs was increased in the same amount as GlyR $\alpha$  alone (\*\* $p=0.0072$ , Figure 3G, Table 1). Moreover, we focused on extrasynaptic GlyR $\beta$  and GlyR $\alpha$  outside of gephyrin signals. Here, we revealed no changes for GlyR $\beta$  ( $p=0.5913$ ) but again a significant increase (\*\* $p=0.0009$ ) for GlyR $\alpha$  outside of gephyrin puncta (Figure 3J, K). These findings point to a possible compensation of GlyR $\alpha$  expression in *Glr1<sup>spdot/spdot</sup>/Glr<sup>eos/eos</sup>* mice. Compensatory mechanisms have been shown previously for the startle disease model *shaky* (Schaefer et al., 2017). Instead, the likely mechanism underlying the enhanced GlyR $\alpha$  expression in *oscillator* mice lacking GlyR $\alpha$ 1 could be an increase in GlyR $\alpha$ 2 and/or GlyR $\alpha$ 3.

To investigate if GlyR $\alpha$ 2 or GlyR $\alpha$ 3 overexpression indeed drives a structural compensation in *oscillator* mice, we analysed the expression levels of the different GlyR $\alpha$  subunits via Western blots in tissue samples of *Glr1<sup>+/+</sup>/Glr<sup>eos/eos</sup>* (wildtype control) and *Glr1<sup>spdot/spdot</sup>/Glr<sup>eos/eos</sup>* animals (Figure 4, Table 2). Our data confirm the loss of GlyR $\alpha$ 1 in *Glr1<sup>spdot/spdot</sup>/Glr<sup>eos/eos</sup>* mice. As shown in Figure 4A, GlyR $\alpha$ 1 expression is absent in SC, BS, as well as cortex (CX) of homozygous *oscillator* mice (SC: \*\*\*\* $p<0.0001$ , BS: \*\*\*\* $p<0.0001$ ). In wildtype, expression levels of GlyR $\alpha$ 1 are high in SC and BS and below detection limits in CX, in line with previous mRNA data (Malosio et al., 1991). The overall protein expression of all GlyR $\alpha$  subunits was markedly higher in homozygous *oscillator* animals compared to control (Figure 4B). The pan-GlyR $\alpha$  signals were significantly increased in the SC of *Glr1<sup>spdot/spdot</sup>/Glr<sup>eos/eos</sup>* mice (\*\* $p=0.0042$ ). A similar trend was observed in BS and CX nearing significance (BS:  $p=0.0646$ , CX:  $p=0.0957$ ) confirming the increase in GlyR $\alpha$  labelling in SC cultures (Figure 3). Among the GlyR $\alpha$  subunits, a significant increase in

GlyR $\alpha$ 2 expression in SC and BS of *Gla1<sup>spdot/spdot</sup>/Glrbeos/eos* mice (SC: \*p=0.0166, BS: \*p=0.0157) and a strong positive trend in CX (n.s. p=0.0569; [Figure 4C](#)) were also detected. The significant increase of GlyR $\alpha$ 2 was also confirmed comparing the GlyR $\alpha$ 2 puncta along dendrites of spinal cord neurons from *Gla1<sup>+/+</sup>/Glrbeos/eos* and *Gla1<sup>spdot/spdot</sup>/Glrbeos/eos* mice (\*p=0.02) which reflect most likely extrasynaptic GlyR $\alpha$ 2 (\*\*\*\*p<0.0001) while GlyR $\alpha$ 2 expression in gephyrin positive clusters was unaffected (p=0.7924; [Figure 4D-G](#), [Table 3](#)). These findings indicate that GlyR $\alpha$ 2 (possibly alongside GlyR $\alpha$ 3) is the GlyR $\alpha$  subunit partially responsible for compensatory mechanisms in startle disease.

### Persistent GlyR $\alpha$ 2 expression in *oscillator* mice does not prevent lethality

Based on the results described above we conducted a more detailed analysis of GlyR subunit expression. SC cryo-sections of 9  $\mu$ m thickness were immunolabelled for GlyR $\beta$ , GlyR $\alpha$ 1, and GlyR $\alpha$ 2 ([Figure 5](#)). *Gla1<sup>spdot/spdot</sup>/Glrbeos/eos* SC did not express GlyR $\alpha$ 1 ([Figure 5A](#)), while GlyR $\alpha$ 2 was expressed in SC ([Figure 5B](#)). Interestingly, although GlyR $\alpha$ 2 is expressed and should thus be able to form functional ion channels (Pribilla et al., 1992), whole cell recordings from neurons of mixed spinal cord *Gla1<sup>spdot/spdot</sup>/Glrbeos/eos* cultures revealed almost no function following application of high glycine concentrations (300  $\mu$ M, \*\*\*\*p<0.0001). The lack of functional channels was also seen in dose-response recordings in the *oscillator* mutant compared to neurons from wildtype animals ([Figure 5C, D](#)). Although recordings from mixed spinal cord neuronal cultures did not allow to discriminate between the origin of neurons either dorsal or ventral SC, the observed upregulation of GlyR $\alpha$ 2 ([Figures 3E, 4C-E](#)) was insufficient to rescue the phenotype and severity of the disease since homozygous *oscillator* animals die at around three weeks of age.

### Localization of GlyR $\beta$ in *shaky* mice with a functional *Gla1* missense mutation

The above experiments suggest that GlyR $\beta$  expression is unaffected in startle disease caused by the absence of GlyR $\alpha$ 1 protein expression. We therefore went on to investigate the GlyR $\beta$  expression pattern in another startle disease model, *shaky*. The missense mutation C613A in exon 6 of *Gla1* in the *shaky* mutant leads to a Q177K exchange in the mature protein but does not cause a lack in GlyR $\alpha$ 1 protein expression *in vivo* (Schaefer et al., 2017). To investigate the role of GlyR $\beta$  co-assembly with mutant GlyR $\alpha$ 1, we crossed the *Glrbeos* mouse line with *Gla1<sup>shy</sup>* animals ([Figure 6A](#)). The presence of the tagged GlyR $\beta$  subunit did not change onset of symptoms on day 16 or the significant weight loss of homozygous *shaky* animals compared to wildtype and heterozygous mice from day 19 on ([Figure 6B](#); day 19: *Gla1<sup>+/+</sup>* vs. *Gla1<sup>shy/shy</sup>* \*\*p=0.0093 and *Gla1<sup>+/shy</sup>* vs. *Gla1<sup>shy/shy</sup>* \*\*p=0.0042). GlyR $\beta$  density in mixed SC cultures of *Gla1<sup>+/+</sup>/Glrbeos/eos* compared to *Gla1<sup>shy/shy</sup>/Glrbeos/eos* neurons showed a significant decrease in *Gla1<sup>shy/shy</sup>/Glrbeos/eos* neurons for synaptic (\*\*\*\*p<0.0001; [Figure 6C-D](#)) as well as extrasynaptic puncta (\*p=0.0263; [Figure 6J](#)) while the density of synaptic and extrasynaptic GlyR $\alpha$ 1 was significantly increased in *shaky* mice (\*p=0.0341 for synaptic and \*\*\*\*p<0.0001 for extrasynaptic, respectively; [Figure 6C, E, K](#)). The number of inhibitory synaptic puncta was strongly decreased in *Gla1<sup>shy/shy</sup>/Glrbeos/eos* neurons as judged by gephyrin immunoreactivity (\*\*\*\*p<0.0001, [Figure 6F](#)), concomitant to the decrease in GlyR $\beta$  density. While the number of GlyR $\beta$  in GlyR $\alpha$ 1 positive clusters was also slightly decreased (\*p=0.0386; [Figure 6G](#), [Table 4](#)), GlyR $\beta$  and GlyR $\alpha$ 1 puncta calculated as the colocalisation of the two proteins with gephyrin positive clusters were significantly reduced (GlyR $\beta$ -gephyrin: \*\*\*\*p<0.0001; GlyR $\alpha$ 1-gephyrin: \*\*\*\*p=0.0002; [Figure 6H, I](#)). This shows that overexpression of mutant GlyR $\alpha$ 1 in *shaky* mice is not capable of compensating the effects of the mutation while the amount of proper heteromeric GlyR formation at gephyrin positive sites, most likely mainly synaptic sites, is disturbed. Mutant GlyR $\alpha$ 1 may instead form extra- and/or presynaptic homomers less

involved in synaptic neurotransmission. Interestingly, colocalization with the presynaptic marker VGAT revealed less total GlyR $\alpha$  in VGAT positive puncta in spinal cord neurons from *shaky* animals (\* $p=0.0494$ ). In contrast, colocalization of GlyR $\alpha$  with VGAT was unchanged between *oscillator* and wildtype spinal cord neurons ( $p=0.2942$ ; [Figure 7A-C](#), [Table 5](#)). Hence, enhanced extrasynaptic GlyR $\alpha$  localization does most likely play a more pronounced role underlying the startle phenotype than increased presynaptic homomers. Taken together, these data suggest that GlyR $\beta$  subunits form heteromeric receptor complexes with functionally deficient mutant GlyR $\alpha 1$  subunits in the *shaky* mutant. Trafficking of these complexes to synapses may hinder alternative compensatory mechanisms, e.g., an upregulation of functionally active inhibitory GABA $_A$  receptors.

### **Oscillator but not *shaky* mice exhibit smaller glycinergic synapses**

We carried out super-resolution imaging experiments to further characterize the organization of glycinergic SC synapses in *oscillator* and *shaky* mutant animals. SC tissue was cut into 10  $\mu\text{m}$  thin slices using a cryostat, immunolabelled, and subjected to PALM. Conventional fluorescence microscopy showed that mEos4b-GlyR $\beta$  fluorescence (green) co-localized extensively with gephyrin immunoreactivity (mAb7a, red; [Figure 8A](#)). This confirms earlier results according to which the GlyR $\beta$  subunit is preferentially targeted to inhibitory SC synapses as a result of its direct gephyrin binding (Maynard et al., 2021)

For the PALM experiments, we made use of the photophysical properties of the mEos4b fluorophore that is converted from a green to a red fluorescent form upon UV illumination (405 nm). PALM super-resolution images were reconstructed by rendering the single molecule detections with a Gaussian intensity profile corresponding with the localization precision of the coordinates ([Figure 8B](#)). The rendered images were then analysed using the spot detector plugin in Icy to calculate the 2D area of the synapses. Given the stereotypic clustering of GlyRs at inhibitory SC synapses (Maynard et al., 2021) there is a close correspondence between synapse size and receptor numbers. In other words, synapse size is a useful readout for the quantification of GlyR clustering at glycinergic synapses.

According to our results, the size of glycinergic synapses was significantly reduced in *Glr $\alpha 1$ <sup>spdot/spdot</sup>* animals compared to wildtype controls (\*\*\*\* $p<0.0001$ , [Figure 8C](#)), suggesting that the lack in full-length GlyR $\alpha 1$  subunits and the concomitant reduction in GlyR complexes causes a shrinkage of the synapse with likely functional consequences ([Figure 8B](#), [B<sub>1</sub>](#)). In contrast, synapse sizes in the *shaky* mutants was indistinguishable from wildtype littermates ( $p=0.3693$ , [Figure 8C](#)). This indicates that the full-length GlyR $\alpha 1$  *shaky* mutant assembles with mEos4b-GlyR $\beta$  to form heteropentameric receptor complexes that are targeted to functionally deficient synapses (Schaefer et al., 2017). The *oscillator* and *shaky* mutations thus lead to very different structural and functional consequences, respectively.

## **Discussion**

In this paper, the *Glr $\beta$ <sup>eos</sup>* mouse line (Maynard et al., 2021) was used to investigate the synaptic role of unaffected GlyR $\beta$  in severe startle disease caused by GlyR $\alpha 1$  mutations. *GLRA1* encoding GlyR $\alpha 1$  is the most commonly affected gene underlying startle disease in humans. Dominant mutant GlyRs are generally expressed at normal levels, but show altered receptor function. In contrast, recessive mutants often display disturbed protein biogenesis (Bode and Lynch, 2014; Schaefer et al., 2022) pointing to alternative pathophysiological mechanisms. Recent *in vitro* studies included the GlyR $\beta$  subunit in functional assays to better understand a possible contribution of this subunit to inhibitory signal transduction processes. Although the structural role of GlyR $\beta$  was not analyzed, these studies identified increased maximal currents, accelerating decay rates but also slower decay of glycinergic currents (Chung et al., 2010; Zhang et al., 2015; Wang et al., 2018). Functional recordings in neurons

from mouse models of startle disease with unaffected GlyR $\beta$  but a mutation in GlyR $\alpha$ 1 showed reduced mIPSC amplitudes and frequencies but opposite effects on decay times of mIPSCs depending on the mouse model used (*oscillator* or *spasmodic*) (Graham et al., 2006).

The role of non-mutated GlyR $\beta$  in the presence of GlyR $\alpha$ 1 startle disease variants for receptor localization at synapses *in vivo* is only partially understood. GlyR $\alpha$ 1 and GlyR $\beta$  form the adult heteromeric synaptic receptor complex together with gephyrin as scaffold protein (Betz, 1991; Specht et al., 2011; Xiong et al., 2014; Patrizio et al., 2017). Investigations of the GlyR $\beta$  subunit at the protein level were mainly indirect, using gephyrin labeling to mark postsynaptic sites. The *Glr<sup>b</sup><sup>eos</sup>* mouse model makes it possible to label GlyR $\beta$  at protein level directly and investigate GlyR $\beta$  localization in the whole mouse brain and SC. Similar to earlier reports (Weltzien et al., 2012; Maynard et al., 2021), we detected the highest expression level of GlyR $\beta$  in SC where it is widely distributed throughout the dorsal and ventral horn, and in the BS, especially in the hypoglossal nucleus (cranial nerve XII). Furthermore, we have also observed GlyR $\beta$  expression in higher brain areas e.g. even in areas with low levels or lack of GlyR $\alpha$ 1, the major synaptic partner of GlyR $\beta$  in the adult central nervous system. GlyR $\beta$  is highly expressed in the forebrain in line with the reported expression of the *Glr<sup>b</sup>* transcript in this area (Fujita et al., 1991; Malosio et al., 1991), e.g. in the thalamus and more specifically in the parafascicular nucleus of the intralaminar part and in the hypothalamus. Thalamus and hypothalamus were also positive for GlyR $\alpha$ 1 arguing for synaptic heteromeric GlyR complexes in these brain areas. Presence of GlyRs in thalamus and hypothalamus by immunohistological stainings using antibodies against GlyR $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 has been shown previously (Rampon et al., 1996). Moreover, a specific functional contribution of GlyRs to fast inhibitory neurotransmission was identified in thalamic brain slice recordings in the presence of strychnine (Ghavanini et al., 2005). In the midbrain, we found GlyR $\beta$  protein expression in the PAG which displays a central role in fear and anxiety circuits (Tovote et al., 2016; Signoret-Genest et al., 2023). This is in line with a recent association of GlyR $\beta$  with fear and panic disorders (Deckert et al., 2017; Lueken et al., 2017). In contrast to GlyR $\beta$ , GlyR $\alpha$ 1 was only sparsely found in the PAG, arguing that the glycinergic contribution in fear and anxiety circuits occurs predominantly through other GlyR $\alpha$  subunits such as GlyR $\alpha$ 2 serving as partner for GlyR $\beta$  in the PAG. Changes in GlyR $\beta$  expression level have been proposed to underlie an association of GlyR $\beta$  with fear. However no anxiety-like behavior has been reported in *spastic* mice harboring <10% of full-length GlyR $\beta$  (Kingsmore et al., 1994). In contrast, altered anxiety-related behavior characterized by massively increased startle reactivity was identified in *spasmodic* mice that carry a *Glr<sup>a</sup>1* missense mutation A52S leading to functional changes in glycine affinity but no alteration in GlyR $\beta$  expression (Schaefer et al., 2020). Hence, changes in expression level alone are unable to explain changes in behavioral patterns under disease conditions. At the synaptic level, adaptations and modulation of structural receptor organization, receptor mobility, and changes in localization between synaptic and extrasynaptic sites (Specht et al., 2013) may provide mechanistic insights into the regulatory role of GlyR $\beta$ , including ways to trigger compensatory mechanisms in startle disease.

To investigate the impact of GlyR $\beta$  in startle disease due to distinct *Glr<sup>a</sup>1* mutations, *Glr<sup>b</sup><sup>eos</sup>* animals were crossed with heterozygous *oscillator* and *shaky* mice. *Glr<sup>b</sup><sup>eos</sup>* had no impact on the lethality of the homozygous carrier of the *oscillator* and *shaky* alleles which died at the reported time points (*oscillator* 3 weeks; *shaky* 4-6 weeks, (Buckwalter et al., 1994; Schaefer et al., 2017; Schaefer et al., 2018). *Oscillator* mice lack GlyR $\alpha$ 1 while *shaky* animals express mutated GlyR $\alpha$ 1 with insufficient function. The observed lower density of GlyR $\beta$  in *oscillator* animals was therefore expected. However, we also identified a significant increase of total GlyR $\alpha$  level, most likely driven by the GlyR $\alpha$ 2 subunit. Both,  $\alpha$ 2 and  $\alpha$ 3 subunits are expressed in the SC (Harvey et al., 2004). In other words, trafficking of GlyR $\alpha$ 2 $\beta$  protein assemblies from the endoplasmic reticulum (ER) together with gephyrin along microtubules, membrane insertion points and clustering at postsynaptic sites (Maas et al.,

2006; Kneussel and Loeblich, 2007) appears to be unaffected in *oscillator* mice. GlyR $\alpha$ 2 has its highest expression at embryonic stages in rodents and is downregulated after birth in the SC (Liu and Wong-Riley, 2013) while in other forebrain areas GlyR $\alpha$ 2 persists as the dominant  $\alpha$  subunit (Jonsson et al., 2012). The developmental switch from GlyR $\alpha$ 2 to GlyR $\alpha$ 1 expression in the SC *in vivo* has been suggested to accompany the onset of startle disease symptoms (Schaefer et al., 2022). The observed upregulation of GlyR $\alpha$ 2 may therefore constitute a compensatory attempt by localising GlyR $\alpha$ 2 $\beta$  at synaptic sites similar to the persistence of GlyR $\alpha$ 2 $\beta$  complexes in areas of the forebrain. Although functionality of GlyR $\alpha$ 2 $\beta$  has been demonstrated in transfected HEK-293 cells (Pribilla et al., 1992) and forebrain (Kilb et al., 2008), whole cell recordings from hypoglossal neurons of homozygous *oscillator* mice displayed only residual glycinergic currents with dramatically reduced amplitudes and frequencies (Graham et al., 2006). In line with these data, whole cell recordings from SC motoneurons of homozygous *oscillator* mice in this study also revealed only small residual glycinergic currents.

The observed smaller synapses by SMLM in homozygous *oscillator* animals may thus be the result of less GlyR $\beta$  and gephyrin and hence non-sustained structural synapses. Interestingly, smaller synapses specifically in the ventral horn have also been characterized in heterozygous *oscillator* animals (Maynard et al., 2021) suggesting that ~50% of GlyR $\alpha$ 1 has a similar deleterious effect for glycinergic synapse structural integrity *in vivo*. According to our results, the upregulated GlyR $\alpha$ 2 might preferentially form homomeric receptors or, together with GlyR $\beta$ , heteromeric extrasynaptic receptors unable to compensate for the lack of the fast synaptic kinetics of GlyR $\alpha$ 1 at spinal cord synapses, and thus inevitably result in lethality. Inconsistent with a synaptic function of GlyR $\alpha$ 2 is the slow activation kinetics (Mangin et al., 2003) and longer durations (Krashia et al., 2011) than other GlyR subtypes.

In *shaky*, the mutated GlyR $\alpha$ 1 is upregulated in homozygous animals. This argues that the mutation does not severely affect folding, as unfolded or incorrectly-folded protein assemblies are usually subjected to ER-associated proteasomal degradation pathways (Valkova et al., 2011). Our data strongly suggest that the mutant GlyR complexes are instead transported together with GlyR $\beta$  and gephyrin to synaptic sites. Synaptic integration is supported by cluster density analysis showing less GlyR $\beta$  and gephyrin clusters in general and consequently lower localization of both GlyR $\beta$  and mutated GlyR $\alpha$ 1 in gephyrin positive clusters in cultured neurons. Moreover, the upregulated GlyR $\alpha$ 1 might also result in larger numbers of homomeric and functionally impaired GlyR $\alpha$ 1 complexes at extrasynaptic sites. Despite the reduced total number of GlyR $\alpha$ 1 $\beta$  clusters in culture, however, we did not see any obvious changes in synapse size in native spinal cord tissue from homozygous *shaky* mice.

In addition, upregulation of mutant GlyR $\alpha$ 1 may also impact presynaptically localized GlyRs, which result in slightly depolarizing glycine currents regulating the release of glycine from presynaptic terminals (Xiong et al., 2014). A consequence of severely impaired homomeric presynaptic GlyR $\alpha$ 1 in *shaky* animals is less glycine release from presynapses which impacts the startle disease pathology in this mutant.

The role of unaffected GlyR $\beta$  can be interpreted in two directions. On the one hand, the presence of mutant GlyR $\beta$ -containing receptor complexes at synapses could be detrimental in that it prevents the efficacy of compensation by other GlyR $\alpha$  subunits allowing synaptic localizations of functional GlyRs. On the other hand, they could also play a beneficial role, since mutated may help to preserve the structural integrity of the synapses, notably the postsynaptic gephyrin scaffold. Consequently, gephyrin clusters would be kept in place that could then trap other receptors or adaptor proteins. In contrast, the loss of inhibitory synapses in the *oscillator* mutant makes functional compensation less likely. Nonetheless, in the models of severe startle disease studied here, neither mechanism can efficiently overcome lethality.

## References

- Becker C-M (1995) Review : Glycine Receptors: Molecular Heterogeneity and Implications for Disease. *Neuroscientist* 1:130-141.
- Betz H (1991) Glycine receptors: heterogeneous and widespread in the mammalian brain. *Trends Neurosci* 14:458-461.
- Bode A, Lynch JW (2014) The impact of human hyperekplexia mutations on glycine receptor structure and function. *Mol Brain* 7:2.
- Buckwalter MS, Cook SA, Davisson MT, White WF, Camper SA (1994) A frameshift mutation in the mouse alpha 1 glycine receptor gene (*Gla1*) results in progressive neurological symptoms and juvenile death. *Hum Mol Genet* 3:2025-2030.
- Chapdelaine T, Hakim V, Triller A, Ranft J, Specht CG (2021) Reciprocal stabilization of glycine receptors and gephyrin scaffold proteins at inhibitory synapses. *Biophys J* 120:805-817.
- Chung SK et al. (2010) Pathophysiological mechanisms of dominant and recessive *GLRA1* mutations in hyperekplexia. *J Neurosci* 30:9612-9620.
- Chung SK et al. (2013) *GLRB* is the third major gene of effect in hyperekplexia. *Hum Mol Genet* 22:927-940.
- Deckert J et al. (2017) *GLRB* allelic variation associated with agoraphobic cognitions, increased startle response and fear network activation: a potential neurogenetic pathway to panic disorder. *Mol Psychiatry* 22:1431-1439.
- Du J, Lu W, Wu S, Cheng Y, Gouaux E (2015) Glycine receptor mechanism elucidated by electron cryo-microscopy. *Nature* 526:224-229.
- Durisic N, Godin AG, Wever CM, Heyes CD, Lakadamyali M, Dent JA (2012) Stoichiometry of the human glycine receptor revealed by direct subunit counting. *J Neurosci* 32:12915-12920.
- Fischhaber N, Faber J, Bakirci E, Dalton PD, Budday S, Villmann C, Schaefer N (2021) Spinal Cord Neuronal Network Formation in a 3D Printed Reinforced Matrix-A Model System to Study Disease Mechanisms. *Adv Healthc Mater* 10:e2100830.
- Fujita M, Sato K, Sato M, Inoue T, Kozuka T, Tohyama M (1991) Regional distribution of the cells expressing glycine receptor beta subunit mRNA in the rat brain. *Brain Res* 560:23-37.
- Ghavanini AA, Mathers DA, Puil E (2005) Glycinergic inhibition in thalamus revealed by synaptic receptor blockade. *Neuropharmacology* 49:338-349.
- Graham BA, Schofield PR, Sah P, Margrie TW, Callister RJ (2006) Distinct physiological mechanisms underlie altered glycinergic synaptic transmission in the murine mutants spastic, spasmodic, and oscillator. *J Neurosci* 26:4880-4890.
- Harvey RJ, Depner UB, Wassle H, Ahmadi S, Heindl C, Reinold H, Smart TG, Harvey K, Schutz B, Abo-Salem OM, Zimmer A, Poisbeau P, Welzl H, Wolfer DP, Betz H, Zeilhofer HU, Muller U (2004) GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. *Science* 304:884-887.
- Huang X, Chen H, Michelsen K, Schneider S, Shaffer PL (2015) Crystal structure of human glycine receptor-alpha3 bound to antagonist strychnine. *Nature* 526:277-280.
- James VM, Bode A, Chung SK, Gill JL, Nielsen M, Cowan FM, Vujic M, Thomas RH, Rees MI, Harvey K, Keramidas A, Topf M, Ginjaar I, Lynch JW, Harvey RJ (2013) Novel missense mutations in the glycine receptor beta subunit gene (*GLRB*) in startle disease. *Neurobiol Dis* 52:137-149.
- Jonsson S, Morud J, Pickering C, Adermark L, Ericson M, Soderpalm B (2012) Changes in glycine receptor subunit expression in forebrain regions of the Wistar rat over development. *Brain Res* 1446:12-21.
- Kilb W, Hanganu IL, Okabe A, Sava BA, Shimizu-Okabe C, Fukuda A, Luhmann HJ (2008) Glycine receptors mediate excitation of subplate neurons in neonatal rat cerebral cortex. *J Neurophysiol* 100:698-707.
- Kingsmore SF, Giros B, Suh D, Bieniarz M, Caron MG, Seldin MF (1994) Glycine receptor beta-subunit gene mutation in spastic mouse associated with LINE-1 element insertion. *Nat Genet* 7:136-141.
- Kirouac GJ (2021) The Paraventricular Nucleus of the Thalamus as an Integrating and Relay Node in the Brain Anxiety Network. *Front Behav Neurosci* 15:627633.

- Kling C, Koch M, Saul B, Becker CM (1997) The frameshift mutation oscillator (Glr1(sp-d-ot)) produces a complete loss of glycine receptor alpha1-polyprotein in mouse central nervous system. *Neuroscience* 78:411-417.
- Kneussel M, Betz H (2000) Receptors, gephyrin and gephyrin-associated proteins: novel insights into the assembly of inhibitory postsynaptic membrane specializations. *J Physiol* 525 Pt 1:1-9.
- Kneussel M, Loeblich S (2007) Trafficking and synaptic anchoring of ionotropic inhibitory neurotransmitter receptors. *Biol Cell* 99:297-309.
- Krashia P, Lape R, Lodesani F, Colquhoun D, Sivilotti LG (2011) The long activations of alpha2 glycine channels can be described by a mechanism with reaction intermediates ("flip"). *J Gen Physiol* 137:197-216.
- Liu Q, Wong-Riley MT (2013) Postnatal development of glycine receptor subunits alpha1, alpha2, alpha3, and beta immunoreactivity in multiple brain stem respiratory-related nuclear groups of the rat. *Brain Res* 1538:1-16.
- Lueken U, Kuhn M, Yang Y, Straube B, Kircher T, Wittchen HU, Pfeleiderer B, Arolt V, Wittmann A, Strohle A, Weber H, Reif A, Domschke K, Deckert J, Lonsdorf TB (2017) Modulation of defensive reactivity by GLRB allelic variation: converging evidence from an intermediate phenotype approach. *Transl Psychiatry* 7:e1227.
- Lynch JW (2004) Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiol Rev* 84:1051-1095.
- Maas C, Tagnaouti N, Loeblich S, Behrend B, Lappe-Siefke C, Kneussel M (2006) Neuronal cotransport of glycine receptor and the scaffold protein gephyrin. *J Cell Biol* 172:441-451.
- Malosio ML, Marqueze-Pouey B, Kuhse J, Betz H (1991) Widespread expression of glycine receptor subunit mRNAs in the adult and developing rat brain. *Embo J* 10:2401-2409.
- Mangin JM, Baloul M, Prado De Carvalho L, Rogister B, Rigo JM, Legendre P (2003) Kinetic properties of the alpha2 homo-oligomeric glycine receptor impairs a proper synaptic functioning. *J Physiol* 553:369-386.
- Maynard SA, Rostaing P, Schaefer N, Gemin O, Candat A, Dumoulin A, Villmann C, Triller A, Specht CG (2021) Identification of a stereotypic molecular arrangement of endogenous glycine receptors at spinal cord synapses. *Elife* 10.
- Morelli G, Avila A, Ravanidis S, Aourz N, Neve RL, Smolders I, Harvey RJ, Rigo JM, Nguyen L, Brone B (2017) Cerebral Cortical Circuitry Formation Requires Functional Glycine Receptors. *Cereb Cortex* 27:1863-1877.
- Pan C, Cai R, Quacquarelli FP, Ghasemigharagoz A, Loubopoulos A, Matryba P, Plesnila N, Dichgans M, Hellal F, Erturk A (2016) Shrinkage-mediated imaging of entire organs and organisms using uDISCO. *Nat Methods* 13:859-867.
- Patrizio A, Renner M, Pizzarelli R, Triller A, Specht CG (2017) Alpha subunit-dependent glycine receptor clustering and regulation of synaptic receptor numbers. *Sci Rep* 7:10899.
- Piro I, Eckes AL, Kasaragod VB, Sommer C, Harvey RJ, Schaefer N, Villmann C (2021) Novel Functional Properties of Missense Mutations in the Glycine Receptor beta Subunit in Startle Disease. *Front Mol Neurosci* 14:745275.
- Pribilla I, Takagi T, Langosch D, Bormann J, Betz H (1992) The atypical M2 segment of the beta subunit confers picrotoxinin resistance to inhibitory glycine receptor channels. *Embo J* 11:4305-4311.
- Rampon C, Luppi PH, Fort P, Peyron C, Jouvet M (1996) Distribution of glycine-immunoreactive cell bodies and fibers in the rat brain. *Neuroscience* 75:737-755.
- Rees MI, Harvey K, Pearce BR, Chung SK, Duguid IC, Thomas P, Beatty S, Graham GE, Armstrong L, Shiang R, Abbott KJ, Zuberi SM, Stephenson JB, Owen MJ, Tijssen MA, van den Maagdenberg AM, Smart TG, Supplisson S, Harvey RJ (2006) Mutations in the gene encoding GlyT2 (SLC6A5) define a presynaptic component of human startle disease. *Nat Genet* 38:801-806.
- Schaefer N, Harvey RJ, Villmann C (2022) Startle Disease: New Molecular Insights into an Old Neurological Disorder. *Neuroscientist*:10738584221104724.
- Schaefer N, Signoret-Genest J, von Collenberg CR, Wachter B, Deckert J, Tovote P, Blum R, Villmann C (2020) Anxiety and Startle Phenotypes in Glrb Spastic and Glr1 Spasmodic Mouse Mutants. *Front Mol Neurosci* 13:152.

- Schaefer N, Zheng F, van Brederode J, Berger A, Leacock S, Hirata H, Paige CJ, Harvey RJ, Alzheimer C, Villmann C (2018) Functional Consequences of the Postnatal Switch From Neonatal to Mutant Adult Glycine Receptor alpha1 Subunits in the Shaky Mouse Model of Startle Disease. *Front Mol Neurosci* 11:167.
- Schaefer N, Kluck CJ, Price KL, Meiselbach H, Vornberger N, Schwarzinger S, Hartmann S, Langhofer G, Schulz S, Schlegel N, Brockmann K, Lynch B, Becker CM, Lummis SC, Villmann C (2015) Disturbed Neuronal ER-Golgi Sorting of Unassembled Glycine Receptors Suggests Altered Subcellular Processing Is a Cause of Human Hyperekplexia. *J Neurosci* 35:422-437.
- Schaefer N, Berger A, van Brederode J, Zheng F, Zhang Y, Leacock S, Littau L, Jablonka S, Malhotra S, Topf M, Winter F, Davydova D, Lynch JW, Paige CJ, Alzheimer C, Harvey RJ, Villmann C (2017) Disruption of a Structurally Important Extracellular Element in the Glycine Receptor Leads to Decreased Synaptic Integration and Signaling Resulting in Severe Startle Disease. *J Neurosci* 37:7948-7961.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9:676-682.
- Signoret-Genest J, Schukraft N, S LR, Segebarth D, Deisseroth K, Tovote P (2023) Integrated cardio-behavioral responses to threat define defensive states. *Nat Neurosci* 26:447-457.
- Specht CG, Grunewald N, Pascual O, Rostgaard N, Schwarz G, Triller A (2011) Regulation of glycine receptor diffusion properties and gephyrin interactions by protein kinase C. *EMBO J* 30:3842-3853.
- Specht CG, Izeddin I, Rodriguez PC, El Beheiry M, Rostaing P, Darzacq X, Dahan M, Triller A (2013) Quantitative nanoscopy of inhibitory synapses: counting gephyrin molecules and receptor binding sites. *Neuron* 79:308-321.
- Tovote P, Esposito MS, Botta P, Chaudun F, Fadok JP, Markovic M, Wolff SB, Ramakrishnan C, Fenno L, Deisseroth K, Herry C, Arber S, Luthi A (2016) Midbrain circuits for defensive behaviour. *Nature* 534:206-212.
- Turecek R, Trussell LO (2001) Presynaptic glycine receptors enhance transmitter release at a mammalian central synapse. *Nature* 411:587-590.
- Valkova C, Albrizio M, Roder IV, Schwake M, Betto R, Rudolf R, Kaether C (2011) Sorting receptor Rer1 controls surface expression of muscle acetylcholine receptors by ER retention of unassembled alpha-subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:621-625.
- Wang CH, Hernandez CC, Wu J, Zhou N, Hsu HY, Shen ML, Wang YC, Macdonald RL, Wu DC (2018) A Missense Mutation A384P Associated with Human Hyperekplexia Reveals a Desensitization Site of Glycine Receptors. *J Neurosci* 38:2818-2831.
- Weltzien F, Puller C, O'Sullivan GA, Paarmann I, Betz H (2012) Distribution of the glycine receptor beta-subunit in the mouse CNS as revealed by a novel monoclonal antibody. *J Comp Neurol* 520:3962-3981.
- Wenthold RJ, Parakkal MH, Oberdorfer MD, Altschuler RA (1988) Glycine receptor immunoreactivity in the ventral cochlear nucleus of the guinea pig. *J Comp Neurol* 276:423-435.
- Xiong W, Chen SR, He L, Cheng K, Zhao YL, Chen H, Li DP, Homanics GE, Peever J, Rice KC, Wu LG, Pan HL, Zhang L (2014) Presynaptic glycine receptors as a potential therapeutic target for hyperekplexia disease. *Nat Neurosci* 17:232-239.
- Yu H, Bai XC, Wang W (2021) Characterization of the subunit composition and structure of adult human glycine receptors. *Neuron* 109:2707-2716 e2706.
- Zhang Y, Dixon CL, Keramidas A, Lynch JW (2015) Functional reconstitution of glycinergic synapses incorporating defined glycine receptor subunit combinations. *Neuropharmacology* 89:391-397.
- Zhu H, Gouaux E (2021) Architecture and assembly mechanism of native glycine receptors. *Nature* 599:513-517.

## Figure Legends

### Figure 1 GlyR $\beta$ is highly expressed in spinal cord and brainstem

Immunohistochemical stainings of *Glr $\beta$ <sup>+/+</sup>* (A) and *Glr $\beta$ <sup>eos/eos</sup>* (B) spinal cord sections for mEos4b-GlyR $\beta$  (green) and GlyR $\alpha$ 1 (magenta). (C) mEos4b-GlyR $\beta$  (green) signal in spinal cord tissue of *Glr $\beta$ <sup>eos/eos</sup>* after clearing, imaging, and 3D reconstruction (xyz represent the axis in three dimensions), d dorsal, v ventral spinal cord. The gray transparent shell marks the region of interest. Yellow dotted rectangle marks slice of spinal cord shown in C<sub>1</sub>. Scale bar refers to 100  $\mu$ m. (C<sub>1</sub>) Spinal cord image (front view, for position see yellow dotted rectangle in C) with the photoconverted mEos4b signal (green). Scale bar 100  $\mu$ m. (C<sub>2</sub>) Detailed mEos4b-GlyR $\beta$  (green) signal with top view (from dorsal), front view (dorsal to ventral axis is marked by a white arrow), and side view (dorsal to ventral axis is marked by a white arrow), Scale bar 200  $\mu$ m. (D) Immunohistochemical stainings of *Glr $\beta$ <sup>eos/eos</sup>* brainstem section with higher magnifications (10x and 40x) of the hypoclossal nucleus XII (D<sub>1</sub>). Stained are mEos4b-GlyR $\beta$  (green) and GlyR $\alpha$ 1 (magenta). Scale bars refer to 500  $\mu$ m in the overview images and 10x magnification and 50  $\mu$ m in 40x magnification.

### Figure 2 High GlyR $\beta$ expression in areas of the periaqueductal gray, thalamic and hypothalamic nuclei

(A-B) Immunohistochemical stainings of *Glr $\beta$ <sup>eos/eos</sup>* midbrain and forebrain sections with higher magnifications (10x and 40x) of the periaqueductal gray (PAG) and the hippocampus (HC), thalamus (TH) and hypothalamus (HY). Stained are mEos4b-GlyR $\beta$  (green) and GlyR $\alpha$ 1 (magenta). Scale bars refer to 500  $\mu$ m in overview and 10x magnification and 50  $\mu$ m in 40x magnification (A<sub>1</sub> PAG; B<sub>1</sub> thalamus; B<sub>2</sub> hypothalamus; B<sub>3</sub> hippocampus).

### Figure 3 *Oscillator* mice with severe startle disease show unaltered synaptic localization of GlyR $\beta$

(A) Breeding scheme of *Glr $\alpha$ 1<sup>spdot/spdot</sup>/Glr $\beta$ <sup>eos/eos</sup>* mice. *Glr $\beta$ <sup>eos/eos</sup>* mice have a knock-in of an mEos4b tag in exon 2 of *Glr $\beta$*  (Maynard et al., 2021). Homozygous *Glr $\alpha$ 1<sup>spdot/spdot</sup>* mice harbour a microdeletion in exon 8 of *Glr $\alpha$ 1* leading to an early STOP codon and thus resulting in lack of GlyR $\alpha$ 1 expression. (B) Weight diagram of *Glr $\alpha$ 1<sup>+/+</sup>/Glr $\beta$ <sup>eos/eos</sup>* (n=20), *Glr $\alpha$ 1<sup>spdot/spdot</sup>/Glr $\beta$ <sup>eos/eos</sup>* (n=50), and *Glr $\alpha$ 1<sup>spdot/spdot</sup>/Glr $\beta$ <sup>eos/eos</sup>* (n=20) mice from day 10 to 21. Marked is the symptom onset of homozygous *oscillator* mice. Note, number of *Glr $\alpha$ 1<sup>spdot/spdot</sup>/Glr $\beta$ <sup>eos/eos</sup>* animals decreased after day 14 (onset of symptoms) till day 19 from 20 to 7. (C) Immunocytochemical stainings of mixed primary spinal cord neuronal cultures of *Glr $\alpha$ 1<sup>+/+</sup>/Glr $\beta$ <sup>eos/eos</sup>* and *Glr $\alpha$ 1<sup>spdot/spdot</sup>/Glr $\beta$ <sup>eos/eos</sup>* mice. Neurons were stained with antibodies against mEos4b-GlyR $\beta$  (green), GlyR pan- $\alpha$  (magenta) and gephyrin (yellow). Arrows point to colocalisation of stained proteins. Scale bars refer to 20  $\mu$ m and 2  $\mu$ m in magnifications. Quantification of synapses/100 microns dendrite of GlyR $\beta$  (D), GlyR $\alpha$  (E), gephyrin (F), GlyR $\beta$ -GlyR $\alpha$  (G), GlyR $\beta$ -gephyrin (H), GlyR $\alpha$ -gephyrin (I) as well as extrasynaptic GlyR $\beta$  (J) and GlyR $\alpha$  (K) in *Glr $\alpha$ 1<sup>+/+</sup>/Glr $\beta$ <sup>eos/eos</sup>* compared to *Glr $\alpha$ 1<sup>spdot/spdot</sup>/Glr $\beta$ <sup>eos/eos</sup>* neurons (N=3; N = independent experiments). Data are shown as mean  $\pm$  SEM and individual data points. (GlyR $\beta$ : n=102 for *Glr $\alpha$ 1<sup>+/+</sup>/Glr $\beta$ <sup>eos/eos</sup>* and n=99 for *Glr $\alpha$ 1<sup>spdot/spdot</sup>/Glr $\beta$ <sup>eos/eos</sup>*; GlyR pan- $\alpha$ : n=111 for *Glr $\alpha$ 1<sup>+/+</sup>/Glr $\beta$ <sup>eos/eos</sup>* and n=100 for *Glr $\alpha$ 1<sup>spdot/spdot</sup>/Glr $\beta$ <sup>eos/eos</sup>*; GlyR $\beta$ -GlyR pan- $\alpha$ : n=110 for *Glr $\alpha$ 1<sup>+/+</sup>/Glr $\beta$ <sup>eos/eos</sup>* and n=100 for *Glr $\alpha$ 1<sup>spdot/spdot</sup>/Glr $\beta$ <sup>eos/eos</sup>*, extrasynaptic GlyR pan- $\alpha$ : n=71 for *Glr $\alpha$ 1<sup>+/+</sup>/Glr $\beta$ <sup>eos/eos</sup>* and n=65 for *Glr $\alpha$ 1<sup>spdot/spdot</sup>/Glr $\beta$ <sup>eos/eos</sup>*; n=number of dendrites). Levels of significance: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001.

#### Figure 4 Insufficient compensation of GlyR $\alpha$ expression by GlyR $\alpha$ 2 in *oscillator* mice

(A-C) Representative Western blots of spinal cord (SC), brain stem (BS) and cortex (CX) tissue homogenates from  $Gla1^{+/+}/Glr^{eos/eos}$  and  $Gla1^{spdot/spdot}/Glr^{eos/eos}$  mice. Expression of GlyR $\alpha$ 1, all GlyR $\alpha$  subunits (pan- $\alpha$ ) and GlyR $\alpha$ 2 (48 kDa) are shown. GAPDH (30 kDa) served as housekeeping protein. Quantification of normalized expression levels of GlyR $\alpha$ 1 (A), all GlyR $\alpha$  subunits (pan- $\alpha$ ) (B) and GlyR $\alpha$ 2 (C) to GAPDH level in tissue samples of  $Gla1^{+/+}/Glr^{eos/eos}$  and  $Gla1^{spdot/spdot}/Glr^{eos/eos}$  mice. GlyR level in  $Gla1^{spdot/spdot}/Glr^{eos/eos}$  animals are always shown relative to  $Gla1^{+/+}/Glr^{eos/eos}$  SC samples (N=3). Data are presented as mean  $\pm$  SEM and individual data points. (D) Immunocytochemical stainings of mixed primary spinal cord neuronal cultures of  $Gla1^{+/+}/Glr^{eos/eos}$  and  $Gla1^{spdot/spdot}/Glr^{eos/eos}$  mice. Neurons were stained with GlyR $\alpha$ 2 (magenta) and VGAT (yellow) antibodies. White arrow heads point to colocalisation of stained proteins. Scale bars refer to 20  $\mu$ m and 2  $\mu$ m in magnifications. Quantification of synapses/100 microns dendrite of GlyR $\alpha$ 2 (E), GlyR $\alpha$ 2 in gephyrin positive clusters (F), and extrasynaptic GlyR $\alpha$ 2 (G). Level of significance: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

#### Figure 5 Synaptic GlyR $\beta$ expression is enabled by GlyR $\alpha$ 2 in *oscillator* mice with severe startle disease

Immunohistochemical stainings of  $Gla1^{spdot/spdot}/Glr^{eos/eos}$  mice. Spinal cord (A-B) sections stained for mEos4b-GlyR $\beta$  (green) and GlyR $\alpha$ 1 or GlyR $\alpha$ 2 (magenta). Scale bars refer to 500  $\mu$ m. (C) Whole cell recordings from wildtype and *oscillator* spinal cord dissociated neurons demonstrating glycinergic currents at 300  $\mu$ M glycine. (D) Dose-response curves for glycine (3, 10, 30, 60, 100, 300, 600  $\mu$ M glycine), N=3 independent biological replicates with n=11-13 cells recorded. Level of significance \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

#### Figure 6 Synaptic localization of GlyR $\beta$ in *shaky* mice

(A) Scheme of  $Gla1^{+/shy}/Glr^{eos/eos}$  mice.  $Glr^{eos/eos}$  were crossed to  $Gla1^{+/shy}$  mice. Intercrossings result in animals homozygous for the *shaky* allele harboring a missense mutation Q177K in exon 6 of the *Gla1* gene. (B) Immunocytochemical stainings of mixed primary spinal cord neuronal cultures of  $Gla1^{+/+}/Glr^{eos/eos}$  and  $Gla1^{shy/shy}/Glr^{eos/eos}$  mice. Neurons were stained with antibodies against mEos4b-GlyR $\beta$  (green), GlyR $\alpha$ 1 (magenta) and gephyrin (yellow). Arrows point to colocalisation of the shown proteins. Scale bars refer to 20  $\mu$ m and 2  $\mu$ m in magnifications). (B) Weight diagram of  $Gla1^{+/+}/Glr^{eos/eos}$  (n=19),  $Gla1^{+/shy}/Glr^{eos/eos}$  (n=23), and  $Gla1^{shy/shy}/Glr^{eos/eos}$  (n=16) mice from day 10 to 21. Marked is the symptom onset of homozygous *shaky* mice. Level of significance \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . (C) Immunocytochemical stainings of mixed primary spinal cord neuronal cultures of  $Gla1^{+/+}/Glr^{eos/eos}$  and  $Gla1^{shy/shy}/Glr^{eos/eos}$  mice. Neurons were stained with antibodies against mEos4b-GlyR $\beta$  (green), GlyR $\alpha$ 1 (magenta) and gephyrin (yellow). Colocalisation of stained proteins is marked by white arrow heads. Scale bars refer to 20  $\mu$ m and 2  $\mu$ m in magnifications. Quantification of the puncta/100 microns dendrite of GlyR $\beta$  (D), GlyR $\alpha$ 1 (E), gephyrin (F) alone, GlyR $\beta$ -GlyR $\alpha$ 1 (G), GlyR $\beta$ -gephyrin (H), and GlyR $\alpha$ 1-gephyrin (I) as well the extrasynaptic GlyR $\beta$  (J), and GlyR $\alpha$ 1 (K) in  $Gla1^{+/+}/Glr^{eos/eos}$  and  $Gla1^{shy/shy}/Glr^{eos/eos}$  neurons (N=3, N = independent experiments). Data are shown as mean  $\pm$  SEM and individual data points. (GlyR $\beta$ : n=48 for  $Gla1^{+/+}/Glr^{eos/eos}$  and n=47 for  $Gla1^{shy/shy}/Glr^{eos/eos}$ ; GlyR $\alpha$ 1: n=48 for  $Gla1^{+/+}/Glr^{eos/eos}$  and n=48 for  $Gla1^{shy/shy}/Glr^{eos/eos}$ ; gephyrin: n=48 for  $Gla1^{+/+}/Glr^{eos/eos}$  and n=48 for  $Gla1^{shy/shy}/Glr^{eos/eos}$ ; GlyR $\beta$ -GlyR $\alpha$ 1: n=47 for  $Gla1^{+/+}/Glr^{eos/eos}$  and n=48 for  $Gla1^{shy/shy}/Glr^{eos/eos}$ ; GlyR $\beta$ -gephyrin: n=48 for  $Gla1^{+/+}/Glr^{eos/eos}$  and n=48 for  $Gla1^{shy/shy}/Glr^{eos/eos}$ ; GlyR $\alpha$ 1-gephyrin: n=46 for  $Gla1^{+/+}/Glr^{eos/eos}$  and n=48 for  $Gla1^{shy/shy}/Glr^{eos/eos}$ ; extrasynaptic GlyR $\beta$ : n=33 for  $Gla1^{+/+}/Glr^{eos/eos}$  and n=40 for  $Gla1^{shy/shy}/Glr^{eos/eos}$ ; extrasynaptic GlyR $\alpha$ 1: n=46 for

*Gla1<sup>+/+</sup>/Glrbeos/eos* and n=48 for *Gla1<sup>shy/shy</sup>/Glrbeos/eos* ; n=number of dendrites). Levels of significance: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*\*p<0.0001.

**Figure 7 Presynaptic GlyR $\alpha$  in VGAT positive clusters is less affected in both, *oscillator* and *shaky* mutant mice**

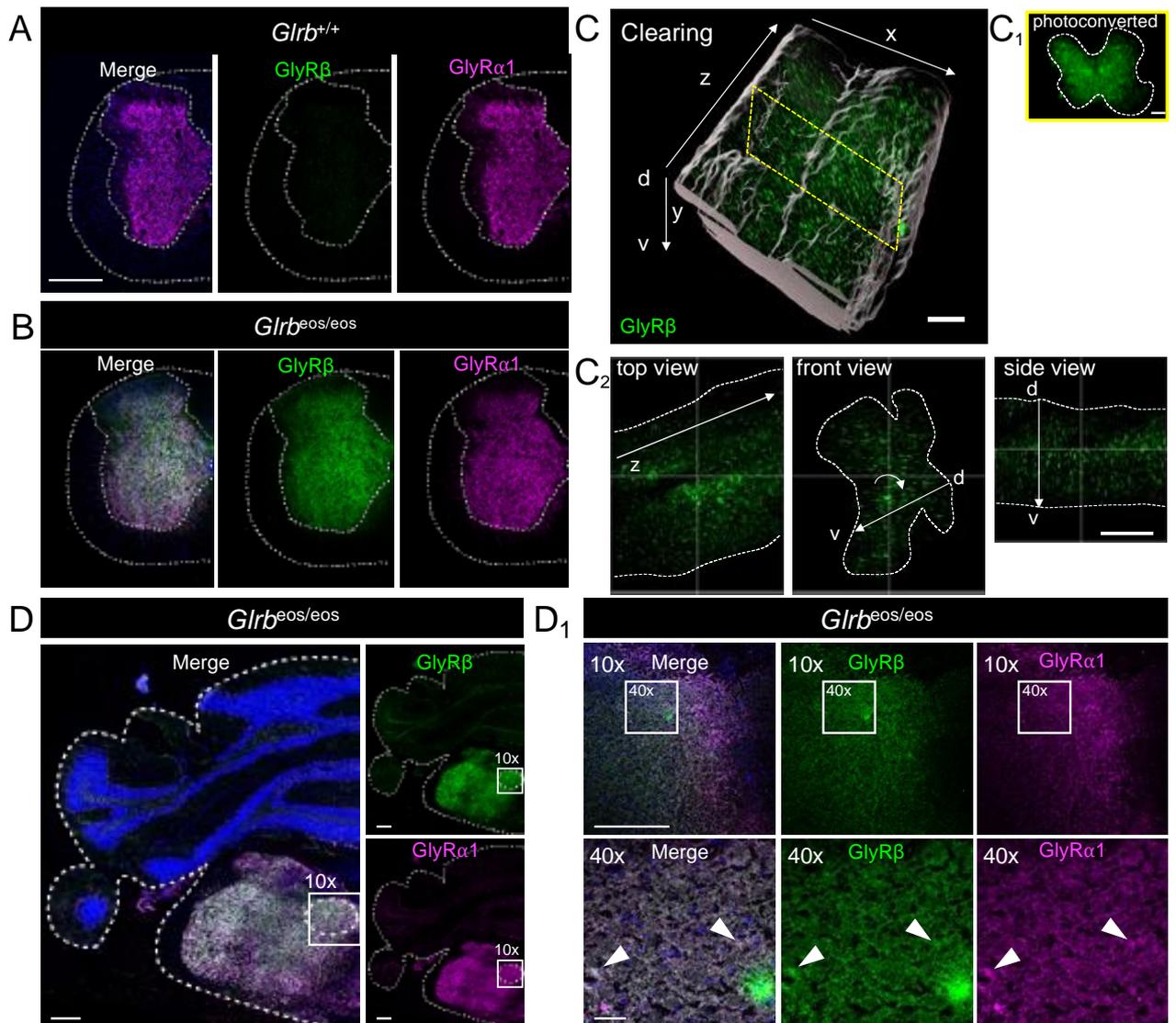
(A, B) Immunocytochemical stainings of mixed primary spinal cord neuronal cultures of *Gla1<sup>+/+</sup>/Glrbeos/eos*, *Gla1<sup>spdot/spdot</sup>/Glrbeos/eos*, and *Gla1<sup>shy/shy</sup>/Glrbeos/eos* mice. Neurons were stained with antibodies against GlyR $\alpha$  (magenta) and VGAT (yellow). Colocalisation of stained proteins is marked by white arrow heads. Scale bars refer to 20  $\mu$ m and 2  $\mu$ m in magnifications. Quantification of the puncta/100 microns dendrite of VGAT (C, D), GlyR $\alpha$ -VGAT (E, F) (N=3, N = independent experiments). Data are shown as mean  $\pm$  SEM and individual data points. (VGAT: n=113-119 for *Gla1<sup>+/+</sup>/Glrbeos/eos*, n=108 for *Gla1<sup>spdot/spdot</sup>/Glrbeos/eos*, and n=108 for *Gla1<sup>shy/shy</sup>/Glrbeos/eos*; GlyR $\alpha$ : n=113-116 for *Gla1<sup>+/+</sup>/Glrbeos/eos* and n=101 for *Gla1<sup>spdot/spdot</sup>/Glrbeos/eos*, and n=102 for *Gla1<sup>shy/shy</sup>/Glrbeos/eos*. Level of significance: \*p<0.05.

**Figure 8 Super-resolution imaging reveals smaller synapse sizes in *oscillator* compared to wildtype and *shaky* mutant mice**

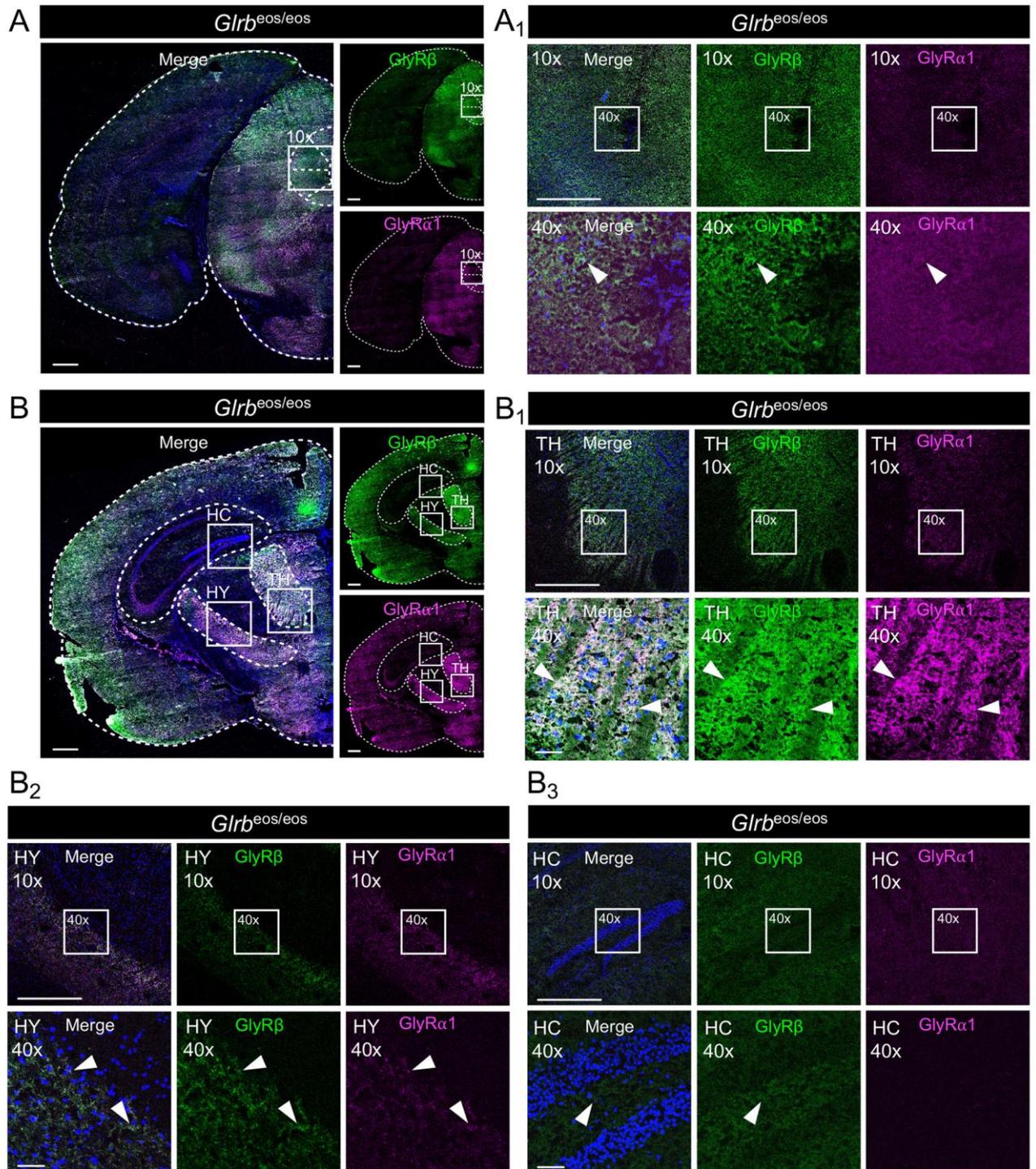
(A) Spinal cord slice of a wildtype *Gla1<sup>+/+</sup>/Glrbeos/eos* mouse (10  $\mu$ m thickness) expressing fluorescent mEos4b-GlyR $\beta$  (green), and immunolabeled for gephyrin (red). Scale bar 5  $\mu$ m. (B) Super-resolution imaging of glycinergic spinal cord synapses in wildtype, *oscillator* and *shaky* mutants. Representative PALM reconstructions of mEos4b-GlyR $\beta$  clusters in spinal cord tissue slices from *Gla1<sup>+/+</sup>/Glrbeos/eos*, *Gla1<sup>spdot/spdot</sup>/Glrbeos/eos* and *Gla1<sup>shy/shy</sup>/Glrbeos/eos* mice. Scale bar 1  $\mu$ m. (B<sub>1</sub>) Enlarged images of dotted squares in B. (C) Quantification of mEos4b-GlyR $\beta$  cluster sizes in rendered super-resolution images from *Gla1<sup>+/+</sup>/Glrbeos/eos* (n=14), *Gla1<sup>spdot/spdot</sup>/Glrbeos/eos* (n=16) and *Gla1<sup>shy/shy</sup>/Glrbeos/eos* (n=14) mice. Significance level \*\*\*p<0.001, n.s. not significant).

# FIGURES

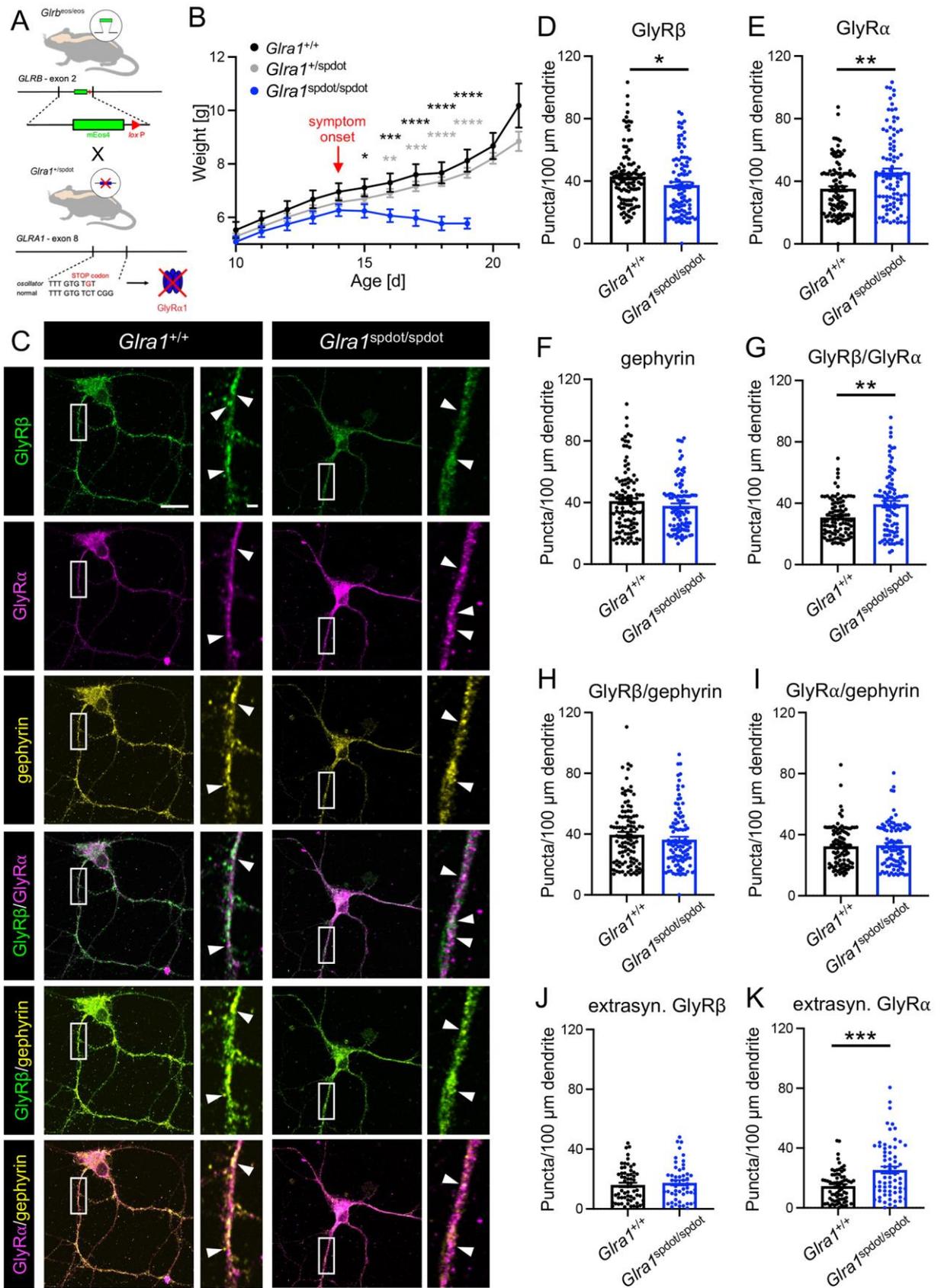
## Figure 1



**Figure 2**



**Figure 3**



**Figure 4**

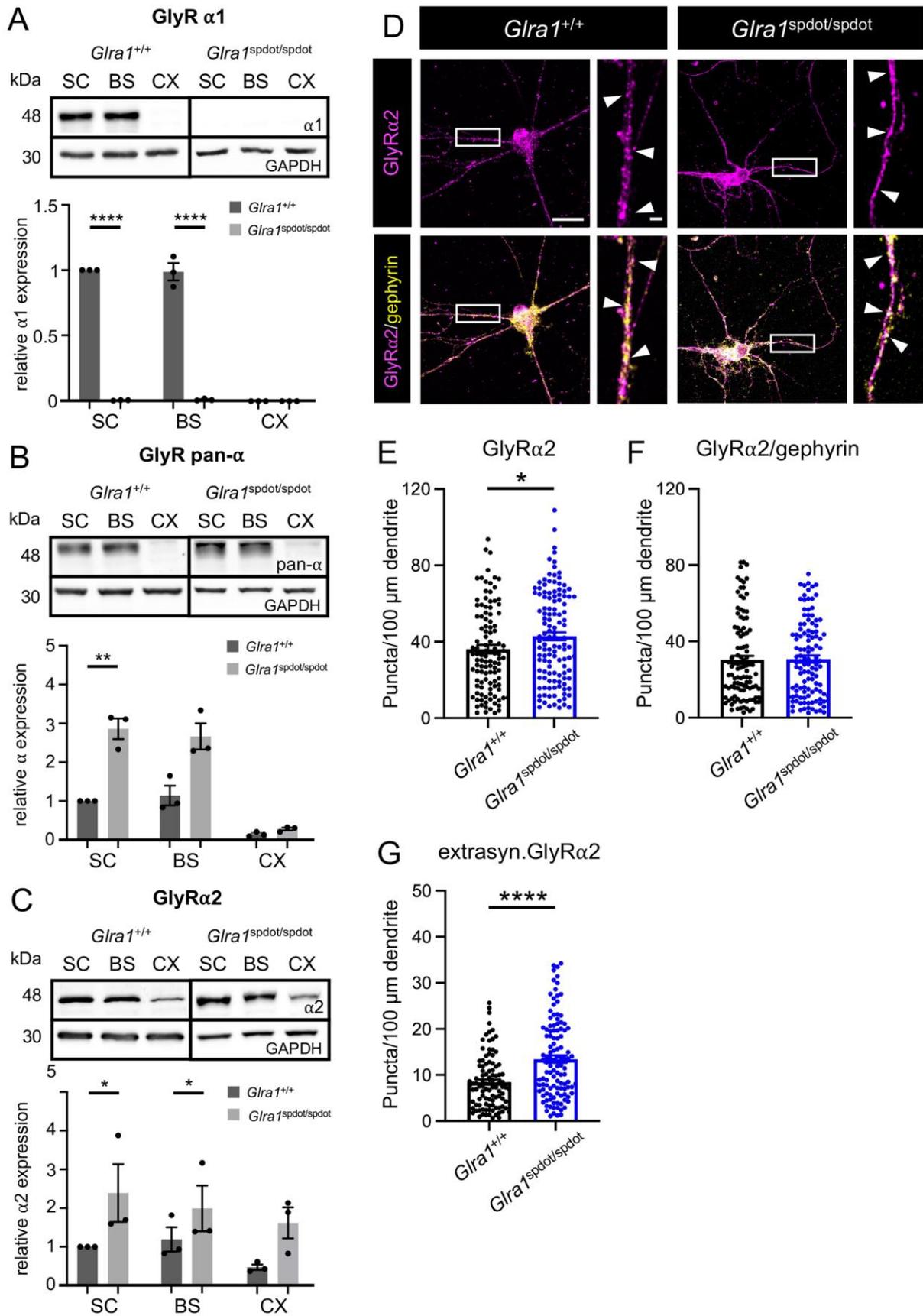
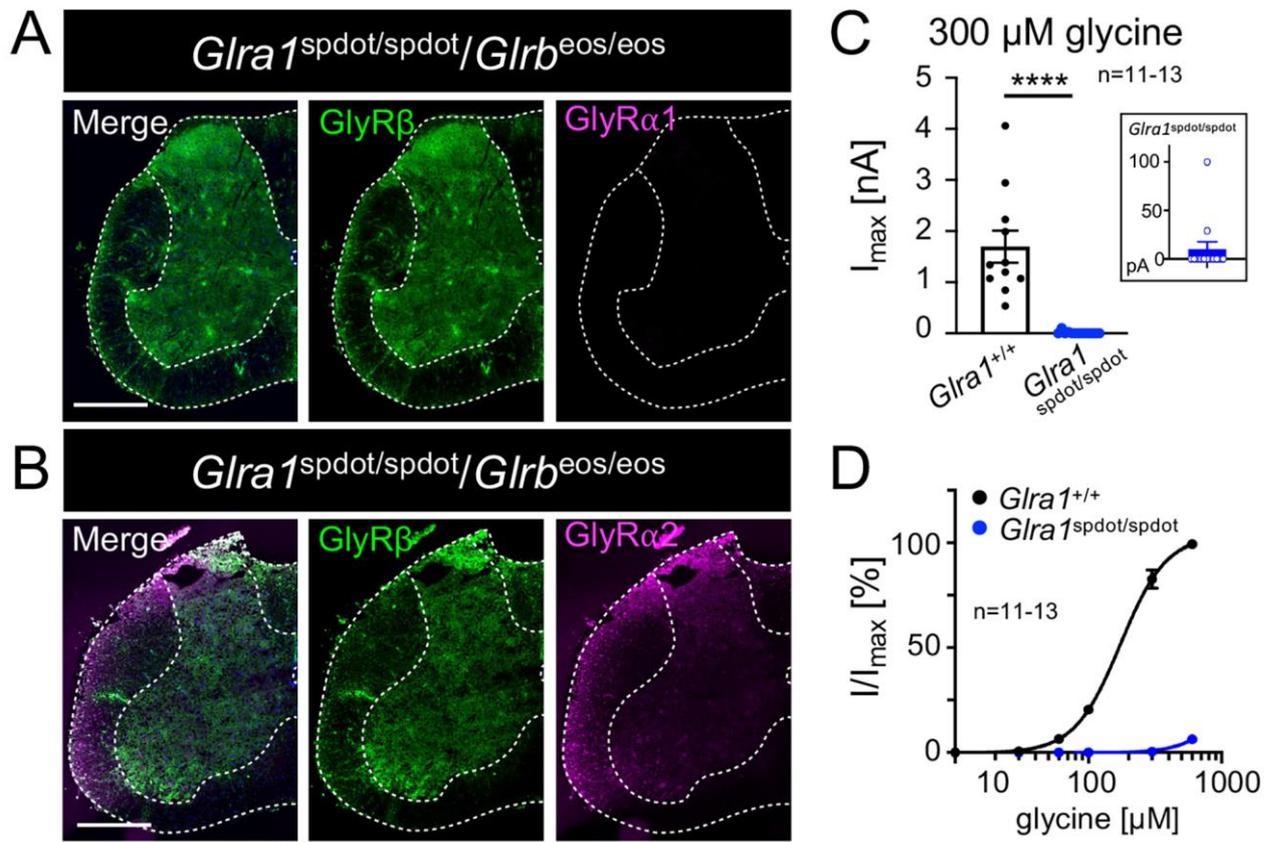


Figure 5



**Figure 6**

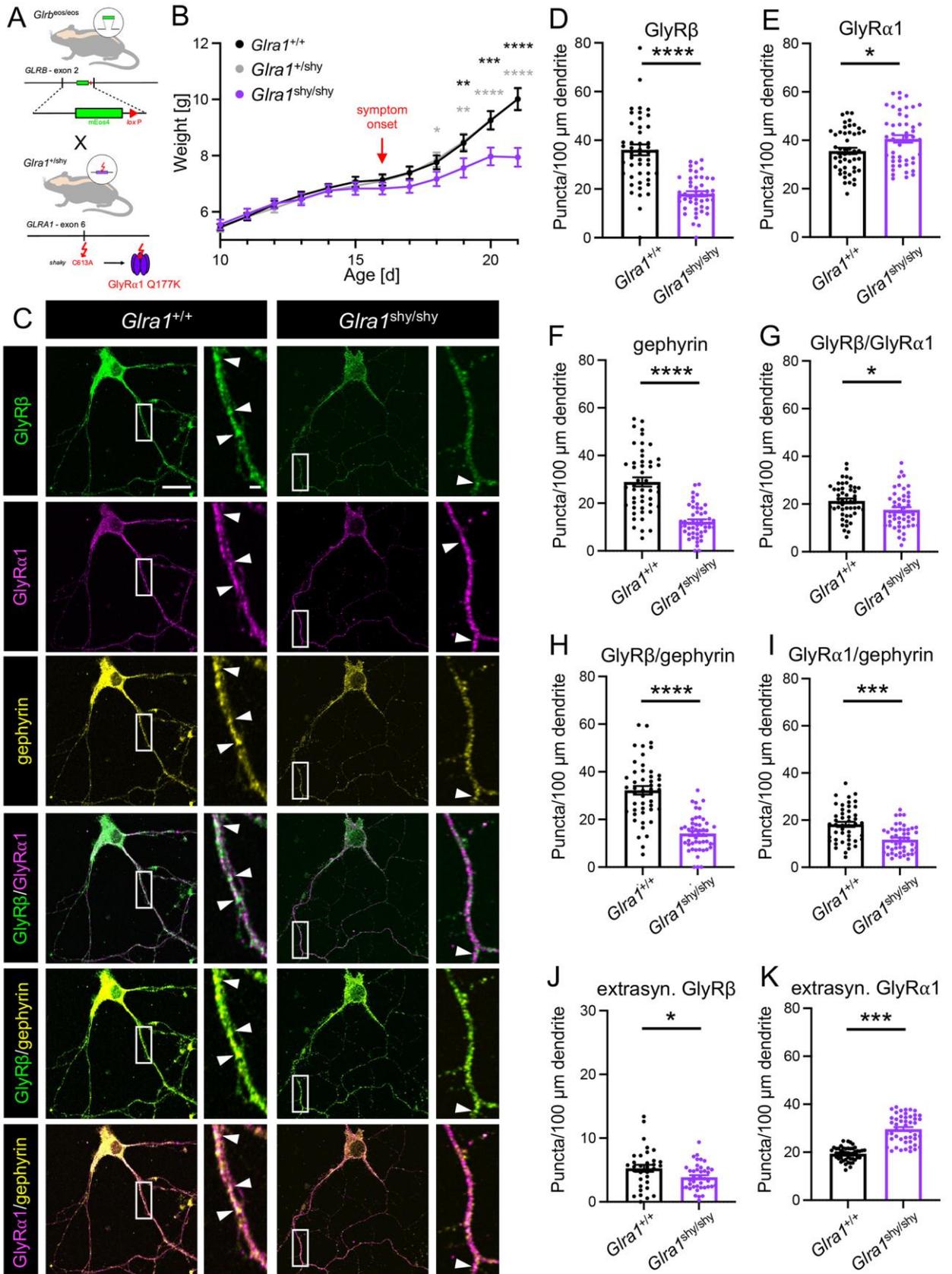
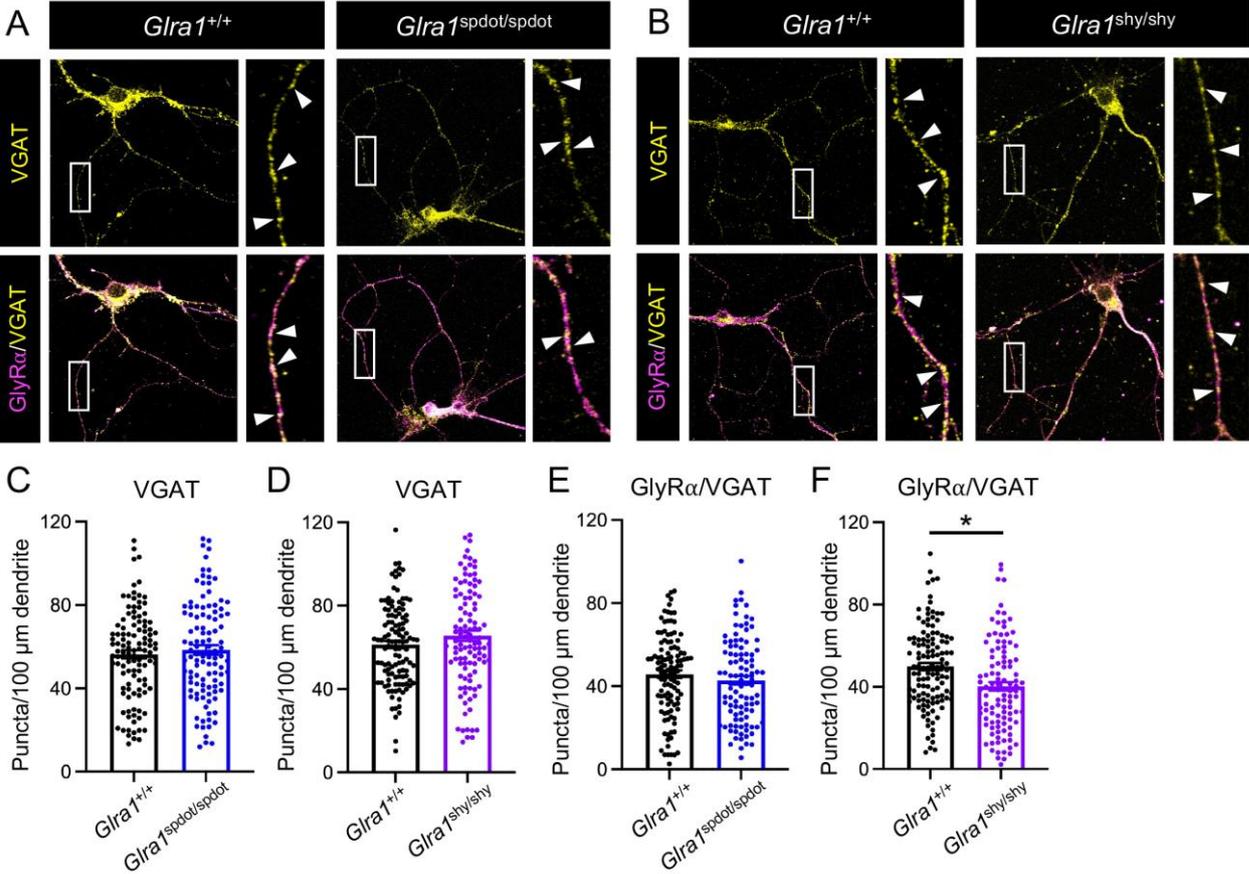
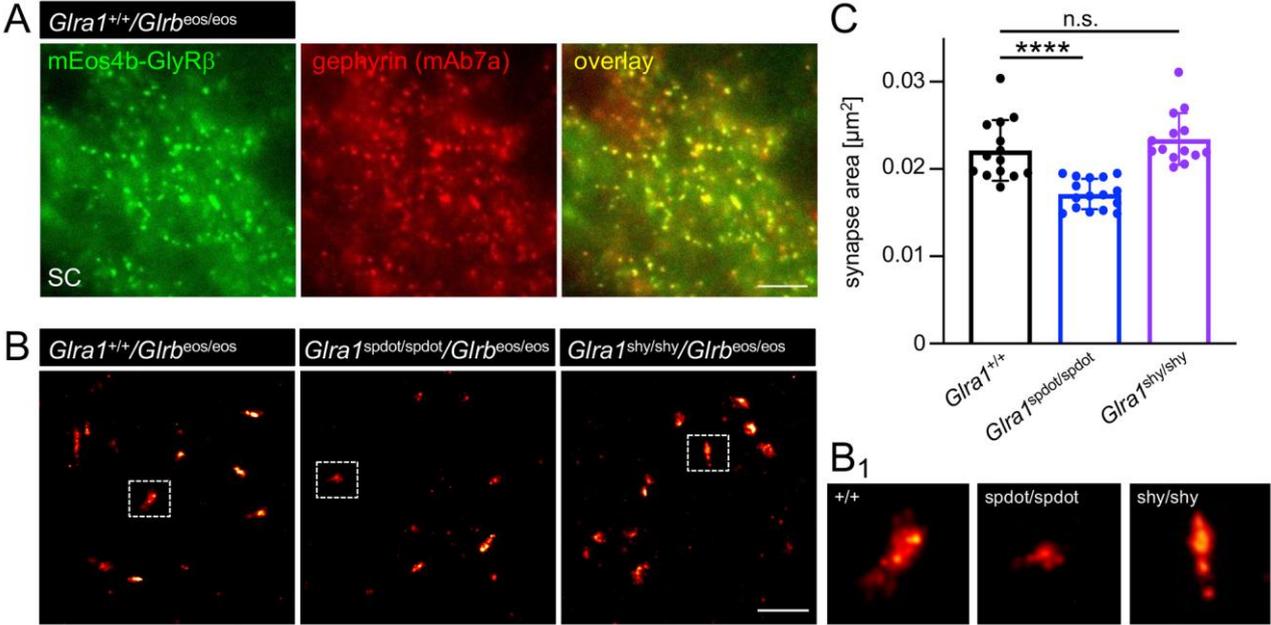


Figure 7



**Figure 8**



## Régulation des synapses inhibitrices explorée par différentes modalités d'imagerie super-résolutive

*MILLE Clémence*

*12 décembre 2023*

### Résumé

Le bon fonctionnement du système nerveux central dépend d'une étroite connexion entre excitation et inhibition neuronale. Des altérations du fonctionnement des synapses inhibitrices sont impliquées dans de nombreuses et diverses pathologies telles que l'épilepsie, la maladie de Parkinson, l'hyperekplexie, les troubles anxieux et du sommeil ou encore la dépression. L'inhibition neuronale est régulée principalement par deux neurotransmetteurs, le GABA et la glycine, qui agissent sur leurs récepteurs respectifs situés du côté post-synaptique des synapses inhibitrices (inhibition phasique), mais également sur des récepteurs non synaptiques (inhibition tonique). A travers différents projets, nous avons étudié les effets pathologiques ou les effets induits par des traitements pharmacologiques sur ces récepteurs, en mettant en place différentes techniques de microscopie à fluorescence super-résolutive.

Grâce à la technologie d'imagerie à molécules uniques (SMLM) nous avons pu mesurer et mettre en évidence une réduction de la taille des synapses glycinergiques chez une souris modèle de la maladie hyperekplexie. Nous avons également pu visualiser les populations synaptiques et extra synaptiques du récepteur du GABA dans le cadre de l'étude des effets des neurostéroïdes sur l'inhibition GABAergique. Et enfin, avec la microscopie à illumination structurée (SIM), nous avons étudié l'ultrastructure des segments initiaux axonaux afin de mettre en lumière le rôle des récepteurs du GABA dans cette structure clé de la génération des signaux électriques neuronaux.

Ensemble, ces études visent à comprendre l'organisation moléculaire des synapses inhibitrices ainsi que leur régulation dans des conditions pathologiques et pharmacologiques. Les approches d'imagerie développées ont différentes qualités qui justifient leur utilisation dans ce projet, ainsi que de futurs projets dans notre unité.

Mots clés : Microscopie super-résolutive à fluorescence - synapse GABAergique - synapse glycinergique - segment initial axonal - neurostéroïde.