

UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE
FACULTÉ DE MÉDECINE DE MARSEILLE
ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
UNITÉ DE NEUROBIOLOGIE DES CANAUX IONIQUES ET DE LA SYNAPSE
INSERM UMR1072 UNIS

THÈSE

Présentée et publiquement soutenue devant
LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE MARSEILLE

Le 15 octobre 2018

Par

Aurélie FEKETE

LES DETERMINANTS DU SEUIL DU POTENTIEL D'ACTION DANS LES NEURONES CORTICAUX

THE DETERMINANTS OF ACTION POTENTIAL THRESHOLD IN CORTICAL NEURONS

Pour obtenir le grade universitaire de DOCTEUR
Spécialité : NEUROSCIENCES

Membres du Jury de la Thèse :

Dr. Federico TRIGO - Rapporteur
Dr. Dominique ENGEL - Rapporteur
Valérie CREPEL – Examineur - Président
Romain BRETTE - Examineur
Dominique DEBANNE - Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier chaleureusement toutes les personnes qui ont participé à faire de ces quatre dernières années une expérience de vie enrichissante. J'espère que ces quelques lignes m'aideront à exprimer l'immense gratitude que je ressens envers vous tous...

En premier lieu, je remercie sincèrement mon directeur de thèse Dominique Debanne, pour m'avoir ouvert en grand les portes de son laboratoire d'excellence et m'avoir permis d'être entourée de personnes précieuses tant au niveau scientifique que personnel tout au long de cette thèse. La confiance qu'il m'a apporté dès mon stage de fin d'étude et son optimisme sans faille pendant les semaines « sans résultats » ont été d'un grand soutien dans les périples de ce projet palpitant et au combien énigmatique.

Je remercie vivement Fédérico Trigo et Dominique Engel pour l'intérêt qu'ils ont manifesté à l'égard de ma thèse en acceptant les rôles de rapporteurs. Je remercie chaleureusement Valérie Crépel et Romain Brette pour avoir accepté d'être mes examinateurs. Je tiens particulièrement à remercier Romain Brette pour sa collaboration exemplaire, ses nombreuses idées et pour la qualité de nos échanges tout au long du projet.

Je remercie également toutes les personnes du laboratoire, qui m'ont formée et ont toujours été là pour répondre à mes questions ou mes appels au secours pendant les manips ! Je commence par une montagne de remerciements à Sylvain et Mickaël Z., pour m'avoir tout appris de l'électrophysiologie, pour leur passion pour la recherche, leur intelligence et leur soutien moral et surtout amical. Grâce à Mickaël Z., j'ai pu découvrir cette merveilleuse équipe, les potentiels d'action rétropropagés (Ahhh !), la politique, et les états d'âmes de la vie ! Grâce à Sylvain, j'ai appris à me servir d'un laser (OK un laser confocal seulement!), à patcher, à faire mariner des maquereaux, à connaître Marseille autrement, et pouvoir compter sur quelqu'un à tout moment (jusqu'à la relecture de cette thèse !). Merci à Yanis, mon acolyte de bureau pour sa bonne humeur et son aide technique, merci à Michaël R. avec qui j'ai partagé mon poste d'électrophysiologie ; merci à Laure pour sa sympathie ; merci à Norah pour nos moments de partage et les pauses du midi, merci à Norbert pour son aide précieuse en modélisation et nos trajets en bus. Merci aussi aux anciens du labo, à Célia et Martial pour avoir partagé mes premiers balbutiements au labo et pour nos soirées à boire des bières, à Vincenzo pour son amitié et son aide technique, et à Fanny pour m'avoir chaleureusement accueillie au laboratoire.

Je remercie également les équipes du premier étage, en particulier Jean-Marc Goillard pour avoir su répondre à mes questions, pour ses remarques avisées et ses conversations captivantes ; Estelle, Monica, et Manon, pour leur amitié, leur soutien moral, nos fous rires et nos folles soirées avec la fine équipe du labo, Alexis pour sa sympathie et nos discussions pendant les pauses, Béatrice pour nos moments à échanger sur tout et rien (mais surtout sur la Norvège !), Christine, Pierre et Fabien pour leur bienveillance. Je tiens également à remercier toute l'équipe d'Oussama El-Far, la « lunch team » de cette dernière année avec qui j'ai partagé de nombreux repas, conversations, et rires. Merci à Oussama, Michaël S., Marion, Youyou, Cécile, Christian, Nicole et Yves pour leur gentillesse ! Merci à Jennifer pour faire de cet endroit une place chaleureuse (et amusante), merci à Chantal pour son soutien moral et pour m'avoir nourri adorablement toute cette fin de thèse avec des pâtisseries, de la confiture maison et autres régals, et pour nos chemins jusqu'à l'arrêt du bus le soir. Merci également à Valérie, Ophélie et à ceux qui sont arrivés plus tard, à Jorge, Karine et Alessandra (Bon rétablissement), Johanna (la relève !) et Paikan pour apporter votre bonne humeur à tout le laboratoire !

Je remercie aussi tous mes amis qui m'ont (supportée) côtoyée gaiement pendant la thèse et sans qui rien ne se serait passé aussi bien. En particulier Elodie et Hannah pour notre amitié précieuse, Charlotte et toute la bande pour m'avoir obligé à sortir de chez moi et profiter des apéros hebdomadaires ! Lisa pour nos fous rires et pour avoir accepté de m'embarquer en Amérique du Sud pendant mes vacances (même avec ma valise à roulette!) A mes

collocs que j'adore, pour avoir partagé ma vie parfois chaotique, Jean, Sabri, Lisa, et surtout Nabila pour m'avoir soutenue, fait à manger, et avoir été un vent de fraîcheur durant ces derniers mois de rush ! Merci à la team de Pint Of Science (ou comment voir la recherche autrement !) Julie, Juliette et Guillaume ! Et à ces personnes que je n'ai pas pu voir depuis longtemps mais auxquelles je pense énormément, en particulier Magalie, Emilie, et bien d'autres !

Enfin je voudrais remercier ma famille que j'aime infiniment pour leur soutien moral; à mon père pour ses nombreux conseils sur le travail et son réconfort, à ma mère pour nos conversations du samedi et nos weekends détentes ; à Amalthée pour sa gentillesse et pour m'avoir encouragée dans la poursuite de cette thèse, à Diane pour nos échanges fraternels. Merci également à ma très chère tante Marie pour sa bienveillance, et à mes cousins Romain et Jeremy!

Acknowledgments

I would like to warmly thank everyone who has made these last four years a rewarding life experience. I hope that these few lines will help me to express the gratitude that I feel towards you all ...

First of all, I sincerely thank Dominique Debanne, my thesis director, for opening to me the doors of his laboratory of excellence and for allowing me to be surrounded by precious people, both scientifically and personally throughout this thesis. The confidence he gave me since the end of my internship and his flawless optimism during the weeks "without results" were of great support in the pursuit of this exciting and enigmatic project.

I deeply thank Fédérico Trigo and Dominique Engel for the interest they manifested regarding my thesis, agreeing to take on the role of reviewers. I warmly thank Valérie Crépel and Romain Brette. I particularly want to thank Romain Brette for his exemplary collaboration, his numerous ideas and the quality of our exchanges throughout the project.

I also thank all the people of the laboratory, who trained me and have always been there to answer my questions or my calls for help during the experiments! I begin with a mountain of thanks to Sylvain and Mickaël Z., for having taught me everything about electrophysiology, for their passion for research, their intelligence and their moral and especially friendly support. Thanks to Mickaël Z., I was able to discover this marvelous team, the backpropagated action potentials (Ahhh!), the politics, and the states of souls of life! Thanks to Sylvain, I learned to use a laser (OK a confocal laser only!), to patch, to marinate mackerel, to discover Marseille on different grounds, and to be able to count on someone at any time (until re-reading this thesis!). Thanks to Yanis, my office sidekick for his good humor and technical help, thanks to Michael R. with whom I shared my electrophysiology setup; thanks to Laure for her sympathy; thanks to Norah for our exchanges and lunch breaks, thanks to Norbert for his invaluable help in modeling and our bus trips. Thanks also to the former people of the lab, to Célia and Martial for sharing my first steps in the lab and for our evenings drinking beers, to Vincenzo for his friendship and technical help.

I also thank the teams on the first floor, especially Jean-Marc Goillard for answering my questions, for his wise remarks and his captivating conversations; Estelle, Monica, and Manon, for their friendship, their moral support, our crazy laughs and our indecent evenings out altogether with the team of the lab, Alexis for his sympathy and our discussions during the breaks, Beatrice for our moments to discuss about everything and nothing (but especially about Norway!), Christine, Pierre and Fabien for their kindness. I would also like to thank the entire team of Oussama El-Far, the lunch team of this last year with whom I shared many meals, conversations, and laughs. Thanks to Oussama, Michaël S., Marion, Youyou, Cécile, Christian, Nicole and Yves for their kindness! Thanks to Jennifer for making this place a warm (and fun) place, thanks to Chantal for her moral support and for adorably nurturing me all this past months with pastries, homemade jam and other feast, and for our way together to the bus stop in the evenings. Thanks also to Valérie, Ophélie, and those who arrived later, Jorge, Karine and Alessandra (I wish you a good recovery), Païkan and Johanna to bring your good mood to the whole laboratory!

I also thank all my friends who rubbed me cheerfully during the thesis and without whom nothing would have been so soft. In particular, Elodie and Hannah for our precious friendship, Charlotte and the whole gang for having forced me out of my house and enjoy the weekly aperitifs! Lisa for our laughs and for agreeing to embark me in South America during my vacation (even with my suitcase on wheels!) To my room-mates I adore, for sharing my sometimes chaotic life, Jean, Sabri, Lisa, and especially Nabila for having supported me, cooked for me, and been a breeze of fresh air during these last months of rush! Thanks to the Pint Of Science team (or how to see research differently!) Julie, Juliette and Guillaume! And to those people I have not been able to see for a long time but to whom I think a lot, especially Magalie, Emilie, and many others!

Finally, I would like to thank my family that I unconditionally love for their moral support; to my father for his many tips on work and comfort, to my mother for our Saturday conversations and weekend breaks; to Amalthée for her kindness and for encouraging me in the pursuit of this thesis, to Diane for our fraternal exchanges. Thanks also to my dear Aunt Marie for her kindness, and to my cousins Romain and Jeremy!

Résumé

Les neurones sont des cellules excitables hautement polarisées structurellement et fonctionnellement. L'excitabilité neuronale, c'est-à-dire la capacité à déclencher un (ou plusieurs) potentiel d'action (PA), est une propriété essentielle du neurone. A l'heure actuelle, il est largement accepté que le segment initial de l'axone (SIA) est le lieu de génération privilégié du PA. Il est, par conséquent, une cible efficace pour réguler l'excitabilité. Nous avons examiné l'effet de plusieurs facteurs sur le seuil de voltage du PA, qui est un paramètre de lecture direct de l'excitabilité. Bien que des travaux théoriques décrivent certains des paramètres contrôlant le seuil, la confirmation expérimentale est encore manquante.

Dans la première partie de ma thèse, nous caractériserons l'impact de la résistance axiale (R_a) entre le soma et le SIA sur l'excitabilité. Les travaux théoriques indiquent qu'une augmentation de la R_a rend le neurone plus excitable, ce qui se caractérise par un abaissement du seuil de génération du PA. Nous confirmerons la théorie par une approche expérimentale électrophysiologique. L'augmentation de la R_a par pincement du tronc axonal situé entre le soma et le SIA à l'aide de 2 pipettes entraîne un abaissement du seuil de génération du PA d'environ 4 mV. Inversement, la diminution de la R_a en remplaçant dans le milieu intracellulaire les ions gluconate par du chlore, qui ont une mobilité plus élevée, entraîne un rehaussement du seuil de 2 mV environ. Dans les neurones corticaux, la R_a est donc un facteur clé de l'excitabilité.

Dans une seconde partie, nous étudierons le rôle des courants sodium et potassium sur le seuil de génération du PA. Selon la théorie, la conductance sodium (g_{Na}) est un facteur élémentaire contrôlant le seuil du PA : plus g_{Na} est faible, plus le seuil du PA est élevé. Expérimentalement, la diminution de g_{Na} par de faibles concentrations de TTX entraîne un rehaussement du seuil qui varie selon le logarithme de g_{Na} . De même l'abaissement du potentiel d'inversion du sodium élève le seuil du PA. En plus de la contribution de g_{Na} sur le seuil, la théorie prédit que l'inactivation des canaux sodium (Na_v) module également le seuil du PA. La modulation de l'inactivation des Na_v par des variations de latence du PA ou par des changements du potentiel de maintien avant le déclenchement du PA entraîne une dépolarisation du seuil du PA. Enfin, nous avons déterminé le rôle du courant potassium I_D , un courant hyperpolarisant porté par les unités $K_v1.1$, connu pour diminuer le seuil d'émission du PA. Ce courant, largement oublié des modèles théoriques, a pourtant un rôle essentiel sur l'excitabilité neuronale. Expérimentalement, nous montrerons que I_D agit dans une fenêtre temporelle précise. Ce courant n'a pas d'effet pour de courtes latences, mais pour des latences longues il diminue considérablement l'excitabilité neuronale, en abaissant le seuil du PA.

En conclusion, cette thèse montre que la R_a , g_{Na} , l'inactivation des canaux Na_v et les canaux $K_v1.1$ déterminent le seuil du PA et donc l'excitabilité neuronale.

Summary

Neurons are excitable cells that are structurally and functionally highly polarized. The neuronal excitability, i.e. its capacity to trigger one (or several) action potential (AP), is an essential property of the neuron. Currently, it is largely accepted that the axon initial segment (AIS) represents the privileged place where AP is initiated. Consequently, it is an efficient target for excitability regulation. We examined the contribution of several factors on the AP threshold, which is a direct parameter to read the excitability. Despite the fact that theoretical studies describe some of the parameters controlling the threshold, the experimental confirmation is still missing.

In the first part of my thesis, we characterized the impact of the axial resistance between the soma and the AIS (R_a) on excitability. Theoretical works indicate that a rise in R_a makes the neuron more excitable, which is characterized by a lowering in AP generation threshold. We confirm the theory by an electrophysiological experimental approach. Raising R_a by pinching the axonal trunk between the soma and the AIS with 2 pipettes results in a lowering of the AP generation threshold of approximately 4 mV. Conversely, a reduction of R_a by replacing in the intracellular medium gluconate ions by chloride ions, which have a higher mobility, causes a threshold rise of about 2 mV. In cortical neurons, R_a is therefore a key factor of excitability.

In a second part, we studied the role of sodium and potassium currents on the threshold for AP generation. According to the theory, the sodium conductance (g_{Na}) is a basic factor controlling the AP threshold: the smaller the g_{Na} , the higher the AP threshold. Experimentally, decreasing g_{Na} by low concentrations of TTX results in a threshold rise which varies as the logarithmic of g_{Na} . Similarly, lowering the sodium inversion potential raises the AP threshold. In addition to the contribution of g_{Na} to the threshold, the theory predicts that inactivation of Na_v also modulates the AP threshold. Modulation of inactivation of Na_v by varying the latency of spiking from the pulse onset or by changing the holding potential before spike induction depolarizes the AP threshold. Finally, we determined the role of the potassium current I_D , a hyperpolarizing current carried by the $K_v1.1$ units, known to lower the threshold of AP emission. This current, largely forgotten by theoretical models, has nevertheless a key role on neuronal excitability. Experimentally, we show that I_D acts in a precise time window. This current has no effect for short latencies, whereas for long latencies it considerably reduces neuronal excitability by lowering the AP threshold.

In conclusion, this thesis shows that R_a , g_{Na} , the inactivation of Na_v channels and the $K_v1.1$ channels determine the AP threshold and therefore the neuronal excitability

Abbréviations

AnkG : Ankyrine G

CAM : Molécule d'adhésion cellulaire

C_M : Capacitance membranaire

Ca_v : Canaux calciques sensibles au potentiel

Choline-Cl : chlorure de choline

d-ADF : *depolarization-induced Analogue Digital Facilitation*

DTx : Dendrotoxine

GABA : γ -aminobutyric acid

h-ADF : *hyperpolarization-induced Analogue Digital Facilitation*

HH : Hodgkin & Huxley

IF : Modèle *integrate and fire*

KO : Knockout

K_v : Canaux potassium sensibles au potentiel

L5 : (Neurone pyramidal) de la couche 5 du néocortex

Na_v : Canaux sodium sensibles au potentiel

NMDG : N-Methyl-D-glucamine

PA : Potentiel d'action

Phase plot : Graphique représentant dV/dt en fonction du potentiel V

R_a : Résistance axiale entre le soma et le segment initial de l'axone

R_i : Résistivité intracellulaire

SBFI : sonde fluorescente sensible au sodium (*sodium-binding benzofuran isophthalate*)

SIA : Segment initial de l'axone

SNC : Système nerveux central

Spikelet : Résultante d'un PA axonal envahissant le soma sans induction de PA somatique

STORM : Microscopie de reconstruction optique stochastique (de l'anglais, *Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*)

Timing (du PA) : Le temps d'émission du PA, ou sa latence

TTX : Tétródotoxine

VGC : Canaux sensibles au potentiel (de l'anglais, *Voltage-Gated Channels*)

V_M : Potentiel (ou voltage) de la membrane

Table des matières

	INTRODUCTION	14
I.	LE SEGMENT INITIAL DE L'AXONE, UNE STRUCTURE SPECIALISÉE DANS LA GENERATION DU POTENTIEL D'ACTION	16
A.	UNE ARCHITECTURE COMPLEXE	16
1.	<i>Organisation moléculaire</i>	18
2.	<i>Localisation</i>	19
B.	UNE FORTE DENSITE DE CANAUX SENSIBLES AU POTENTIEL	20
1.	<i>Structure des canaux</i>	20
2.	<i>Les canaux sodium</i>	22
3.	<i>Les canaux potassium</i>	24
C.	UN SITE SPECIALISE DANS LA GENERATION DU POTENTIEL D'ACTION	26
1.	<i>Mises en évidence expérimentales</i>	26
2.	<i>Hypothèses</i>	26
a)	Une forte densité de courant Na ⁺ au SIA	28
b)	L'isolement électrique du SIA	29
II.	LE POTENTIEL D'ACTION.....	30
A.	GENERATION DU POTENTIEL D'ACTION	30
1.	<i>Prérequis : la membrane, une structure électriquement polarisée</i>	30
a)	Le potentiel de repos.....	30
b)	Le potentiel d'équilibre d'un ion.....	30
2.	<i>Une dépolarisation brève de la membrane</i>	33
B.	MODELISATION DU NEURONE, D'APRES HODGKIN & HUXLEY.....	34
1.	<i>Équivalent circuit électrique</i>	34
2.	<i>Le formalisme de Hodgkin & Huxley</i>	36
C.	DYNAMIQUE.....	38
1.	<i>Étude de la forme du potentiel d'action</i>	38
a)	Caractéristiques principales	38
b)	Rôle sur la transmission	38
2.	<i>Initiation : disparités au soma vs à l'axone</i>	39
3.	<i>La théorie du couplage résistif</i>	42
III.	LE SEUIL DU POTENTIEL D'ACTION, PARAMETRE DE LECTURE DE L'EXCITABILITE NEURONALE	45
A.	COMMENT DEFINIR LE SEUIL ?	45
B.	UN SEUIL VARIABLE.....	47
1.	<i>Rôle du potentiel de membrane précédant le PA</i>	47
2.	<i>Rôle des canaux sodium</i>	47
3.	<i>Rôle des canaux potassium</i>	51
4.	<i>Rôle de la résistance axiale</i>	51
IV.	PROBLEMATIQUES DE LA THESE : QUELS SONT LES DETERMINANTS DU SEUIL DU POTENTIEL D'ACTION ?.....	55
A.	LE ROLE DE LA RESISTANCE AXIALE	55
B.	LE ROLE DES CANAUX SODIUM ET POTASSIUM Kv1	57

	Matériels & Méthodes	60
A.	PROCEDURES EXPERIMENTALES.....	62
1.	<i>Préparation des tranches aiguës du néocortex de rat</i>	62
2.	<i>Visualisation et identification des neurones pyramidaux L5</i>	63
3.	<i>Caractérisation des axones</i>	63
B.	ENREGISTREMENTS ELECTROPHYSIOLOGIQUES.....	64
C.	PROTOCOLES EXPERIMENTAUX.....	65
1.	<i>Protocoles et contrôle du timing du PA</i>	65
2.	<i>Enregistrement à deux pipettes</i>	65
3.	<i>Modification de la solution intracellulaire et technique de réenregistrement</i>	67
4.	<i>Modification de la solution extracellulaire</i>	68
5.	<i>Protocole de pincement et coupure d'axone</i>	68
D.	ANALYSE DES DONNEES.....	69
1.	<i>Informations générales</i>	69
2.	<i>Analyse du seuil du PA</i>	71
3.	<i>Compensation du potentiel de jonction liquide</i>	71
	Résultats	72
A.	ARTICLE 1 (EN COURS) : ACTION POTENTIAL THRESHOLD IS DETERMINED BY AXIAL RESISTANCE IN THE PRE-AIS REGION..	73
B.	RESULTATS NON PUBLIES : LE ROLE DES CANAUX SODIUM ET POTASSIUM SUR LE SEUIL DU PA.....	99
1.	Les canaux sodium contrôlent le seuil du PA.....	99
a.	Une diminution de la conductance sodium (g_{Na}) dépolarise le seuil.....	99
b.	Une diminution du courant sodium (I_{Na}) dépolarise le seuil.....	101
2.	<i>L'inactivation des canaux sodium par des variations de potentiel détermine le seuil</i>	107
a.	Évolution du seuil en fonction du potentiel.....	107
b.	Une diminution de la conductance sodium rehausse le seuil.....	109
c.	Le courant I_D rehausse le seuil.....	110
3.	Les courants I_{Na} et I_D régulent le seuil du PA en fonction de la latence.....	110
a.	Une forte latence dépolarise le seuil du PA.....	110
b.	Le courant I_D dépolarise le seuil du PA uniquement à une longue latence.....	111
c.	Étude combinée du courant I_D et I_{Na} à différentes latences.....	113
4.	Figures supplémentaires.....	116
	Discussion	118
A.	ARTICLE 1 : LE RÔLE DE LA RÉSISTANCE AXIALE SUR LE SEUIL DU PA.....	119
B.	LE ROLE DES CANAUX SODIUM ET POTASSIUM SUR LE SEUIL DU PA.....	123
C.	PERSPECTIVES EXPERIMENTALES.....	130
	Conclusion	132
	Bibliographie	134
	Annexes	142
A.	ANNEXE 1, ARTICLE 2 : THE ROLE OF AXONAL $Kv1$ CHANNELS IN CA3 PYRAMIDAL CELL EXCITABILITY.....	143
B.	ANNEXE 2, PERSPECTIVES : SOMATIC MODULATION OF ECTOPIC ACTION POTENTIAL INITIATION IN DISTAL AXONS.....	156

INTRODUCTION

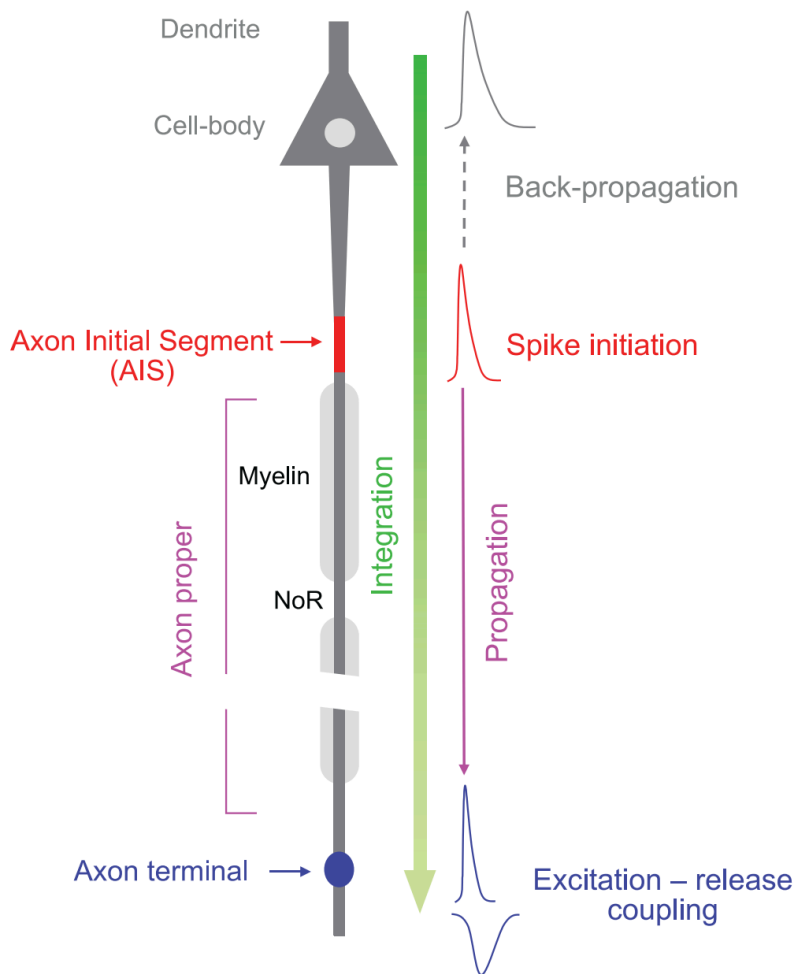


Figure 1. Résumé des fonctions axonales.

Un neurone pyramidal est schématisé avec ses différents compartiments. Quatre fonctions majeures de l'axone sont illustrées : l'initiation du potentiel d'action, sa conduction, le couplage excitation-libération de neurotransmetteurs et l'intégration. Un PA est initié au segment initial de l'axone et est propagé vers les boutons terminaux où il induit la libération de neurotransmetteurs. De plus, les signaux électriques générés dans le compartiment somatodendritique sont intégrés le long de l'axone en influençant la durée du PA et la libération de neurotransmetteur (flèche verte). D'après [Debanne, Campanac, Bialowas, Carlier, & Alcaraz, 2011](#).

I. LE SEGMENT INITIAL DE L'AXONE, UNE STRUCTURE SPECIALISÉE DANS LA GENERATION DU POTENTIEL D'ACTION

Le neurone est une unité spécialisée dans la réception, l'intégration, la conduction et l'émission d'information.

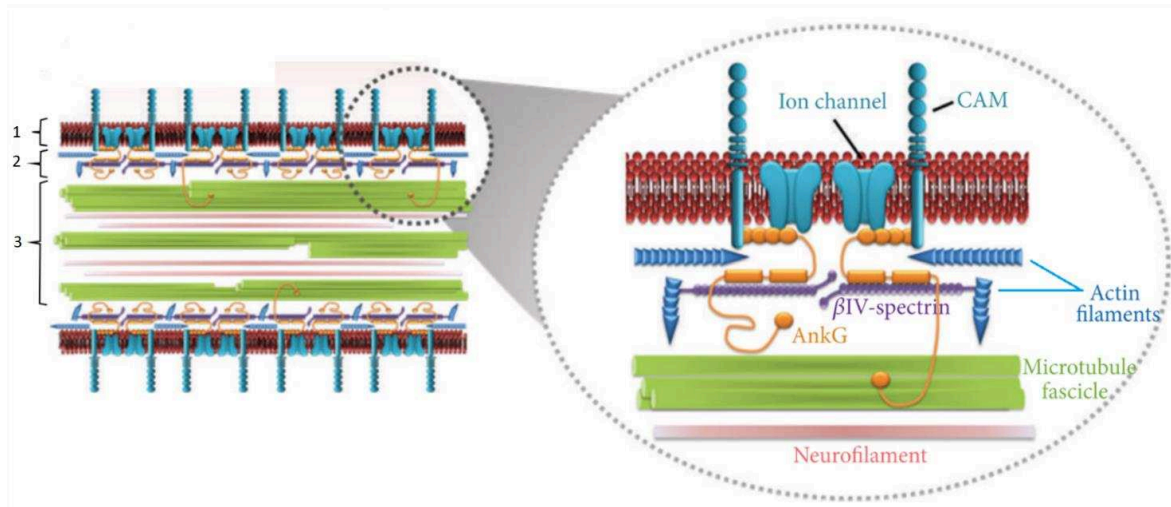
Au niveau fonctionnel, on peut distinguer deux compartiments neuronaux essentiels. Le pôle somatodendritique, composé du soma et des dendrites, reçoit l'information provenant d'autres neurones sous forme de potentiels synaptiques. De manière classique, le pôle axonal génère un message de sortie, codé en fréquence de potentiel d'action (**PA**), lorsque la somme des entrées synaptiques dépasse une valeur seuil. Le PA initié au segment initial de l'axone (**SIA**) est ensuite transmis jusqu'à sa terminaison, et également rétropropagé dans le compartiment somatodendritique dans l'immense majorité des cas (cf. [Figure 1](#))([Debanne et al., 2011](#)).

A. Une architecture complexe

Le neurone est une structure polarisée au niveau moléculaire, l'axone possédant une structure particulière, lui permettant d'assurer sa fonction de génération et de conduction du potentiel d'action.

La mise en place de cette asymétrie à l'échelle moléculaire apparaît à un stade développemental précoce du neurone, (c'est-à-dire entre E11-18 pour les neurones du néocortex chez les rongeurs, lors de l'émergence de l'axone (voir les revues [Barnes & Polleux, 2009](#); [Rasband, 2010](#)). Plus tard, c'est le SIA qui occupe une place essentielle pour maintenir la polarité mise en place ([Leterrier, 2016](#); [Rasband, 2010](#)).

A.



B.

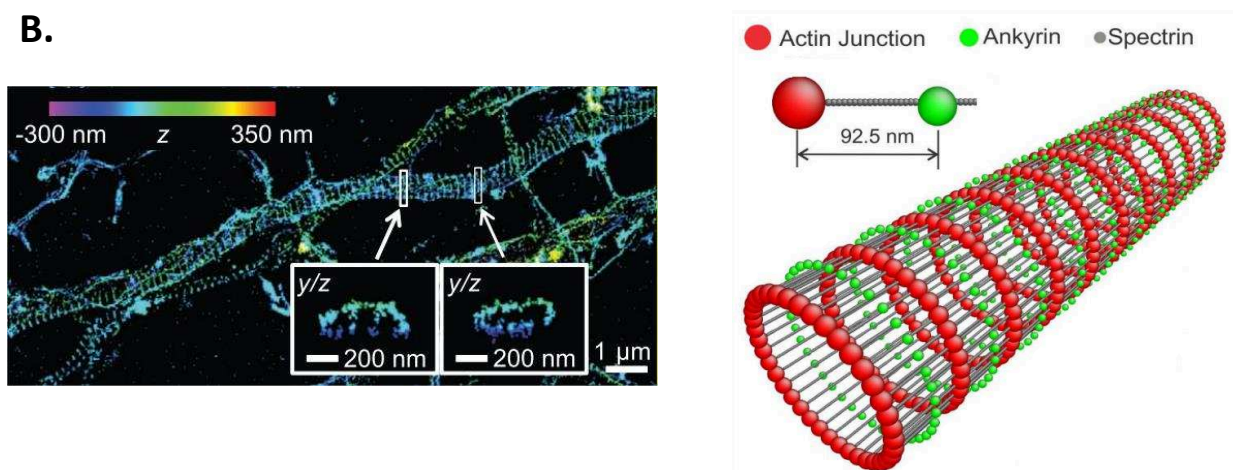


Figure 2. Organisation moléculaire du SIA

A. Le SIA peut être divisé en 3 couches: (1) la membrane plasmique, (2) le cytosquelette sous-membranaire, et (3) la structure centrale du SIA (à gauche). Chaque couche possède des protéines caractéristiques (zoom, à droite). Adapté de [Jones & Svitkina, 2016](#).

B. Visualisation et modélisation des cerceaux d'actines. A gauche, image tridimensionnelle issue de la microscopie STORM montrant les molécules d'actines sur des axones de culture d'hippocampe après 7 jours *in vitro* (DIV 7). D'après [Xu, Zhong, & Zhuang, 2013](#). A droite, modèle simplifié du cytosquelette au SIA, d'après les données obtenues en microscopie. D'après [Zhang et al., 2017](#).

1. Organisation moléculaire

Le cytosquelette complexe du SIA filtre le transport des organelles et molécules, mais aussi crée une barrière de diffusion naturelle qui permet de séparer l'axone du reste du corps cellulaire (Kobayashi, Storrie, Simons, & Dotti, 1992; Song et al., 2009). Grâce aux protéines d'ancrages membranaires qui lui sont associées, il limite la mobilité des protéines d'un compartiment à l'autre. On peut distinguer 3 couches moléculaires spécifiques (cf. Figure 2, A). La membrane plasmique, qui grâce à des protéines d'échafaudages spécifiques recrute de nombreuses protéines au SIA. En particulier, les protéines à ankyrine-G (**AnkGs**) possèdent un domaine N-terminal qui est spécifique des canaux sensibles au potentiel (**VGC**) et des molécules d'adhésion cellulaires, les **CAMs**. Sous la membrane se trouve ensuite un cytosquelette riche en AnkG, β -IV spectrines, et filaments d'actines, qui forment un réseau compact sur l'ensemble du SIA. Enfin, la structure centrale du SIA contient principalement des faisceaux de microtubules et de neurofilaments, qui sont reliés aux AnkG via leur domaine C-terminal. L'AnkG est une protéine présente spécifiquement dans le SIA et les nœuds de Ranvier et ses interactions avec les différentes couches moléculaires de l'axone en fait un acteur incontournable au maintien de la structure du SIA.

Cette architecture complexe est organisée par le cytosquelette qui forme des anneaux de filaments d'actine le long du SIA, et également le long de tout l'axone (cf. Figure 2, B). C'est en 2013, qu'une étude met en évidence cet arrangement périodique d'actine, espacée d'un peu moins de 200 nm grâce à la microscopie **STORM** (microscopie de reconstruction optique stochastique)(cf. Figure 2, B)(Xu et al., 2013). Bien que le rôle de cette structure ne soit pas encore clair, il a été montré qu'elle confère à l'axone une résistance supérieure à celle du compartiment somatodendritique, et serait donc en mesure de protéger des tensions le compartiment le plus fin du neurone, l'axone (Dubey, Jorgenson, & Roy, 2018; Unsain, Stefani, & Cáceres, 2018).

2. Localisation

La localisation et la longueur du SIA est très variable entre différents neurones mais également au sein d'une même population de neurones. Classiquement, c'est grâce au marquage immunohistochimique spécifique aux AnkGs que la position du SIA dans le neurone est déterminée. Dans la plupart des neurones, il débute à l'émergence du tronc axonal, et s'étale sur 20-60 μm . Dans des proportions non négligeables, il peut aussi débiter plus loin, notamment lorsque l'axone émerge d'une branche dendritique (Höfflin et al., 2017; Leterrier, 2018).

C'est dès la fin du 19^{ème} siècle, que Ramón y Cajal observa des neurones dont l'axone émerge non pas du soma mais d'une dendrite, et proposa l'hypothèse que cet emplacement particulier puisse favoriser les *inputs* synaptiques reçus par cette dendrite sans passer par l'intégration des signaux au soma, hypothèse qui a par la suite été testée et validée dans les neurones pyramidaux du champ CA1 (Kole & Brette, 2018; Thome et al., 2014).

Aujourd'hui, nombre d'études ont répertorié les neurones dont l'axone émerge d'une dendrite et le phénomène semble être présent dans tous les types neuronaux analysés. Une proportion de 20 à 60% a été généralement établie (voir pour revue Kole & Brette, 2018). Elle est retrouvée dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe (52% dans les CA1, 28% dans les CA3 et 21% dans les neurones du subiculum, Thome et al., 2014), ceux de la couche L5 (40%, Hamada et al., 2016), dans les interneurones (40% dans les cellules de Martinotti; 40% dans les cellules granulaires du cervelet et 40% dans les interneurones en panier ou *basket cells*, Houston et al., 2017; Höfflin et al., 2017). Une étonnante exception étant les neurones dopaminergiques de la substance noire, dans laquelle cette proportion est dominante à 75%, et où l'axone peut être situé à plus de 200 μm du soma (Gentet & Williams, 2007; Häusser, Stuart, Racca, & Sakmann, 1995; Kole & Brette, 2018).

Le rôle de la position de l'axone, qu'il émerge du soma ou d'une dendrite, n'est pas encore clair. Dans les neurones pyramidaux L5, il a été montré que plus le SIA est distal au soma, plus le tronc dendritique apical est de faible diamètre; ce qui a pour effet de normaliser le courant axonal rétropropagé au soma car il est normalisé en fonction de la capacitance somatique, ce qui entraîne une remarquable similarité dans la dynamique du PA enregistré, indépendante de la morphologie du neurone (Hamada et al., 2016).

B. Une forte densité de canaux sensibles au potentiel

Le SIA est une structure possédant de nombreux canaux ioniques dépendant du potentiel, qui sont recrutés et maintenus au SIA grâce à la matrice et les protéines d'ancrage qu'elle contient. On retrouve au SIA les canaux sodium (**Nav**), impliqués dans la dépolarisation initiale du potentiel d'action, les canaux potassium (**Kv**), impliqués dans la repolarisation du potentiel d'action ainsi que dans la forme du PA et les propriétés de décharge neuronale, et enfin les canaux calcium (**Ca_v**), qui participent à la génération et au *timing* d'émission du PA (voir les revues [Clark, Goldberg, & Rudy, 2009](#); [Debanne et al., 2011](#); [Kole & Brette, 2018](#)).

1. Structure des canaux

Les VGC font partie de la superfamille des canaux sensibles au potentiel, et comprennent les Nav, les Kv et les Cav; ils permettent le transit spécifique d'ions de part et d'autre de la membrane du neurone, respectivement le Na⁺, le K⁺ et le Ca²⁺ (cf. [Figure 3, A](#)). Les Nav sont composés d'une unique sous unité α , composée de 4 parties homologues chacune arrangée en 6 segments transmembranaires, dont les segments S-4 formant le senseur de voltage et les segments S5-6, le pore du canal.

Les canaux sensibles au potentiel Kv sont constitués différemment de 4 sous unités α assemblées en tétramères, qui ont toutefois le même arrangement, i.e. les segments S-4 forment le senseur de voltage et les segments S5-6 le pore du canal ([Jan & Jan, 2012](#); [Vacher, Mohapatra, & Trimmer, 2008](#)). Les Kv possèdent plusieurs états selon le type de canal (ouvert, ouvert-fermé, ou ouvert-fermé-inactivé) tandis que les Nav possèdent trois états (ouvert-fermé-inactivé) (cf. [Figure 3, B](#)); les ions ne peuvent circuler que lorsque le canal est ouvert.

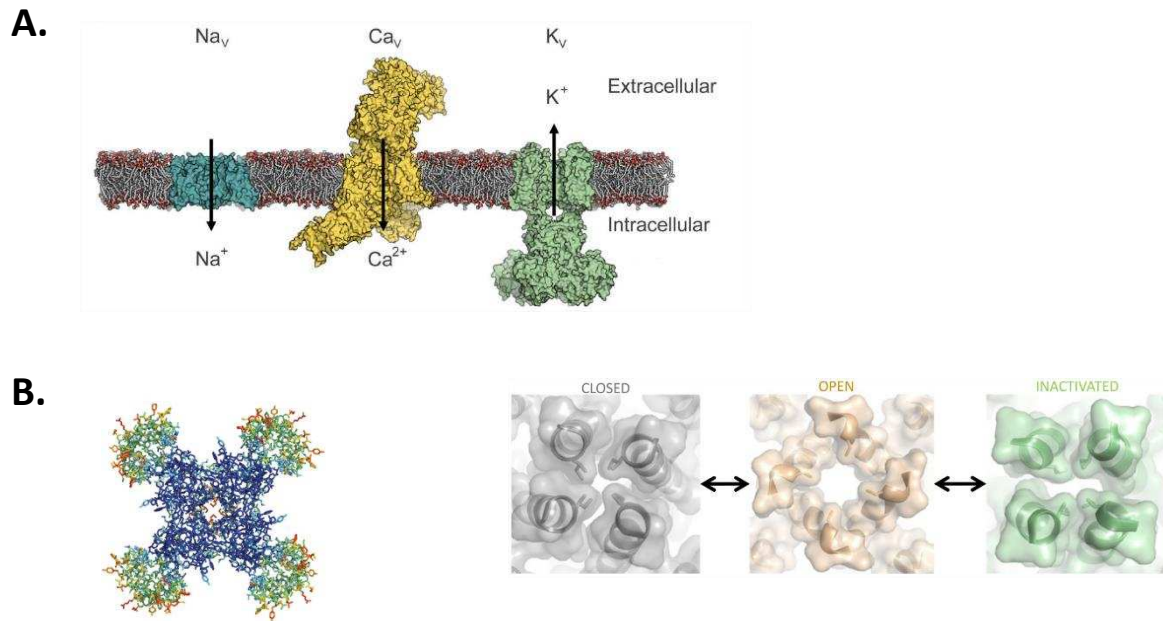


Figure 3. Structure des canaux sensibles au potentiel.

A. Les 3 familles de VGC principales au SIA sont les Na_v , les Ca_v et les K_v , sélectif des ions sodium, calcium et potassium. D'après [Zheng, Cong Bi, Marissa Brooks, 2015](#).

B. Structure du canal sodium. A gauche, structure du canal Na_vAb , homologue bactérien du Na_v . Le pore (en bleu, au centre) est entouré de 4 modules sensibles au potentiel arrangés symétriquement. A droite, zoom sur le pore vu de dessous, montrant ses différents états d'ouverture. D'après [Catterall, 2012; Lенаeus et al., 2017](#).

2. Les canaux sodium

Quatre isoformes des Nav sont retrouvés dans le SNC, les Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, et Nav1.6, et trois sont localisés au SIA de manière spécifique selon le type de neurone : les Nav1.1, Nav1.2 et Nav1.6 (détaillé dans les différentes revues [Clark, Goldberg and Rudy, 2009](#); [Debanne et al., 2011](#); [Catterall, 2012](#); [Leterrier, 2016](#)). Les canaux Nav1.2, et Nav1.6 sont largement exprimés dans le SIA des neurones excitateurs du système nerveux central (**SNC**).

Les Nav1.2 sont majoritairement présents dans le compartiment somatodendritique, et également axonal durant le développement. Les Nav1.6 sont l'isoforme principal présent dans les axones matures du SNC. Ils se substituent aux Nav1.2 au SIA et dans les nœuds de Ranvier lors de la maturation et la myélinisation de l'axone. Les Nav1.1 sont quant à eux retrouvés dans les neurones inhibiteurs du SNC, ils sont en effet présents dans le SIA des interneurons GABAergiques (**GABA**), mais aussi dans les cellules ganglionnaires de la rétine et les neurones de la moelle épinière (revue dans [Debanne et al., 2011](#); [Kole & Stuart, 2012](#); [Leterrier, 2016](#)).

D'autre part, dans les neurones pyramidaux L5, la ségrégation de deux isoformes, les Nav1.2 et les Nav1.6, opère au sein d'un même compartiment, le SIA ([Hu et al., 2009](#)) (cf. [Figure 4, A](#)). A cet endroit, les Nav1.2 sont présents sur la partie proximale du SIA, et les Nav1.6 sur la partie distale du SIA. La présence des Nav1.2 dans le tronc axonal serait responsable de la rétropropagation du PA vers le soma ([Hu et al., 2009](#), voir pour revue [Dulla and Huguenard, 2009](#)).

La caractérisation électrophysiologique des canaux Nav1.6 montre qu'ils ont une courbe d'activation et d'inactivation hyperpolarisée par rapport aux Nav1.2 ([Hu et al., 2009](#); [Rush, Dib-Hajj, & Waxman, 2005](#))(cf. [Figure 4, B](#)), et aux Nav1.1 ([Spampanato, Escayg, Meisler, & Goldin, 2001](#)). En effet, le courant Na⁺ axonal porté par les Nav1.6 a une demi-activation de -14 mV par rapport au soma (de -30 à -44 mV) et une demi-inactivation de -13 mV (de -67 à -80 mV) ([Hu et al., 2009](#)). Une hyperpolarisation moindre de ces courbes a été également observée dans les terminaisons des fibres moussues du gyrus dentelé ([Schmidt-Hieber & Bischofberger, 2010](#)).

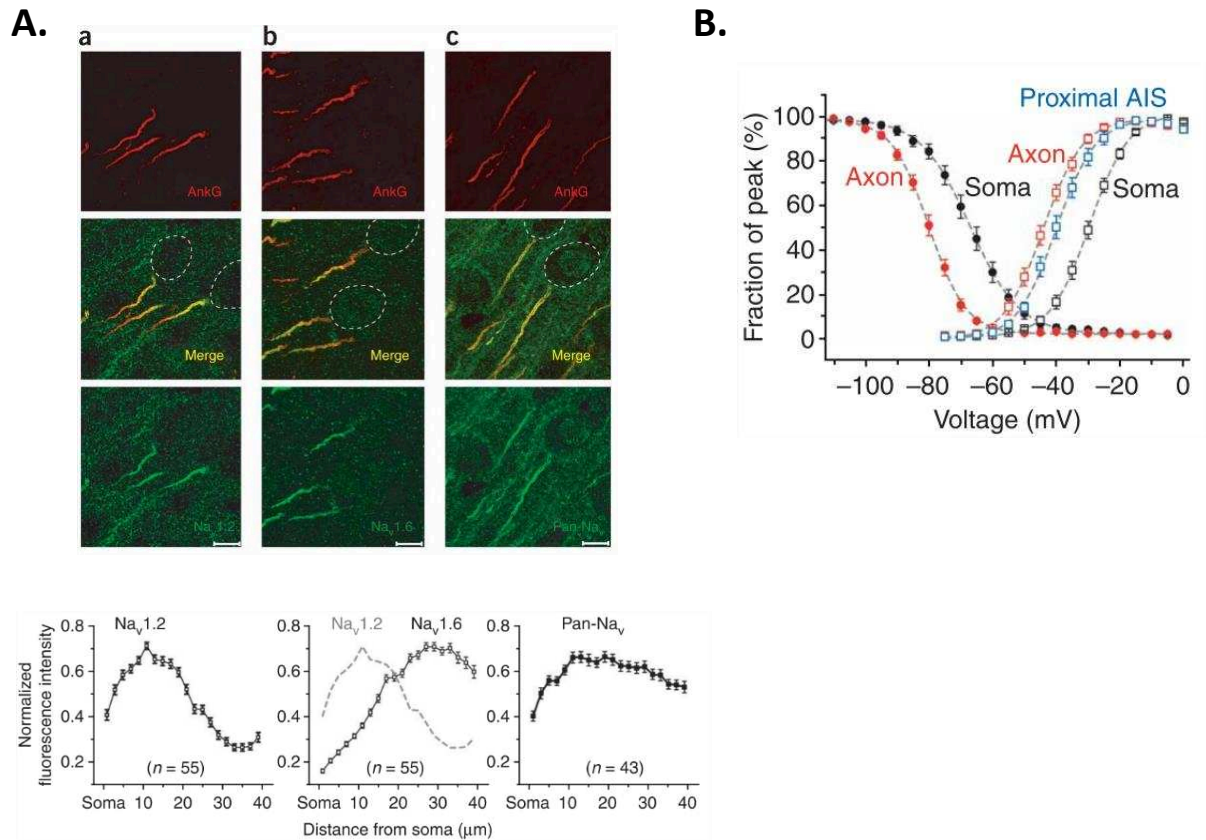


Figure 4. Localisation et propriétés électrophysiologiques des Nav1.2 et Nav1.6.

A. Des canaux Nav1.2 et Nav1.6 en forte densité au SIA. Immunohistochimie en vert (a) des Nav1.2, (b) Nav1.6, et (c) des Nav localisés clairement dans région du SIA, lui-même visible grâce au marquage AnkG, en rouge. **B. Les Nav1.6, des canaux à bas seuil d'activation.** Courbe d'activation et de disponibilité des Nav à l'axone et au soma, correspondant aux propriétés électrophysiologiques des Nav1.6 et Nav1.2 respectivement. Dans les neurones pyramidaux L5 du cortex, d'après [Hu et al., 2009](#).

3. Les canaux potassium

Plusieurs isoformes de canaux potassium sont retrouvés dans le SIA des neurones du SNC : les K_v1 ($K_v1.1$ et $K_v1.2$), K_v2 ($K_v2.1$ et 2.2) et K_v7 ($K_v7.2$ et $K_v7.3$) (voir les revues [Debanne et al., 2011](#); [Kole & Stuart, 2012](#)). Les canaux potassium les plus abondants au SIA étant les K_v1 , présent dans les neurones excitateurs et inhibiteurs corticaux, ainsi que dans les neurones de l'hippocampe (cf. [Figure 5, A](#)).

La densité des K_v1 augmente de la partie proximale à la partie distale de SIA dans les neurones corticaux et pyramidaux de l'hippocampe, et ils sont généralement positionnés plus distalement par rapport aux $Nav1.6$ ([Lorincz & Nusser, 2008](#)). La caractérisation électrophysiologique des K_v1 montre une activation rapide en dessous du seuil d'émission du PA, c'est-à-dire qu'une partie des canaux est active à des potentiels proches du potentiel de repos du neurone. Ils ont une demi-activation entre -43 mV et -23 mV et s'inactivent rapidement avec les $K_v1.4$ (30 ms, I_A) ou lentement avec les $K_v1.1$, $K_v1.2$ et $K_v1.6$ (5-10s, I_D) (cf. [Figure 5, B-C](#)) ([Cudmore, Fronzaroli-Molinieres, Giraud, & Debanne, 2010](#); [Geiger & Jonas, 2000](#); [Kole, Letzkus, & Stuart, 2007](#); [Shu, Duque, Yu, Haider, & McCormick, 2007](#); [Storm, 1988](#)).

Le courant I_D est un courant porté par les sous-unités $K_v1.1$. C'est un courant à bas seuil, dont les propriétés permettent une ouverture à des potentiels sous-liminaire, ce qui amortit les dépolarisations créées par les canaux sodium. Il réduit la pente de dépolarisation avant le PA, crée un délai au premier PA et diminue la précision temporelle d'émission du PA. Tous ces paramètres agissent de manière coordonnée pour diminuer l'excitabilité du neurone en limitant la génération du PA et en rehaussant son seuil (cf. [paragraphe III. B. 3.](#)) ([Clark et al., 2009](#); [Cudmore et al., 2010](#); [Higgs & Spain, 2011](#); [Rama et al., 2017](#); [Shu, Yu, Yang, & McCormick, 2007](#)). D'autre part, il contrôle la largeur du PA, influençant l'intervalle entre deux PAs et la fréquence de décharge ([Debanne, 2004](#); [Dodson, Barker, & Forsythe, 2002](#); [Foust, Yu, Popovic, Zecevic, & McCormick, 2011](#); [Hoppa, Gouzer, Armbruster, & Ryan, 2014](#); [Kirizs, Kerti-Szigeti, Lorincz, & Nusser, 2014](#); [Kole et al., 2007](#)).

Il est également à l'origine d'une facilitation analogue-digitale dans les neurones pyramidaux du champ CA3 : une dépolarisation somatique soutenue entraîne une inactivation

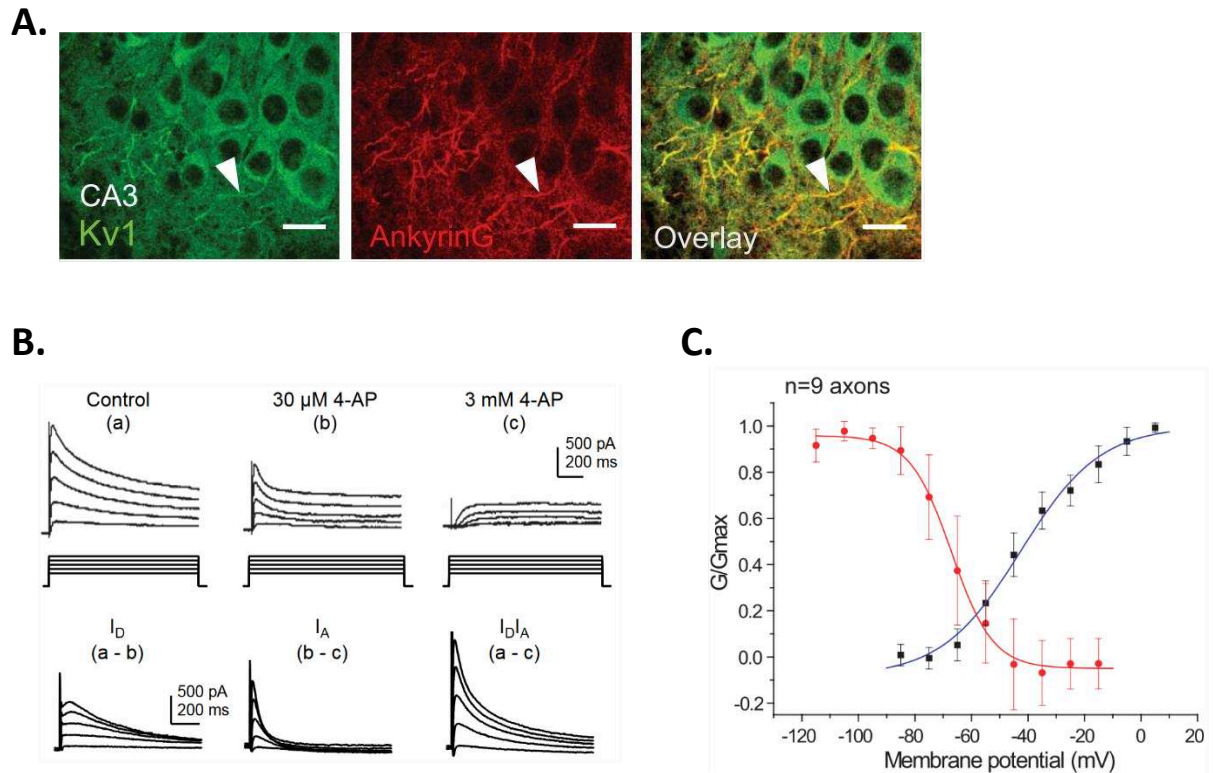


Figure 5. Localisation et caractérisation des canaux K_v1 .

A. Les canaux $K_v1.1$ sont présents au SIA des neurones pyramidaux CA3. Immunohistochimie sur tranche organotypique. La flèche pointe un SIA. D'après [Rama et al., 2017](#). **B. Les courants I_D et I_A , à activation rapide.** Exemple d'enregistrement en voltage-clamp, les courants évoqués en présence de différents créneaux de potentiel en control (a), en présence de $30 \mu\text{M}$ 4-AP (pour bloquer I_D) (b), ou de 3 mM 4-AP (pour bloquer I_D et I_A). La soustraction algébrique des courbes est appliquée pour isoler individuellement I_D , I_A , et les deux courants ensemble $I_D I_A$. Notons l'inactivation lente de I_D et rapide de I_A . D'après [Cudmore et al., 2010](#). **C. Courbes d'activation et d'inactivation du courant I_D .** Enregistrements sur des axones de neurones pyramidaux L5. D'après [Shu, Yu, et al., 2007](#).

des canaux $K_v1.1$, un élargissement du PA et une libération accrue de calcium dans les boutons présynaptiques (Bialowas et al., 2015; Rama, Zbili, & Debanne, 2018).

C. Un site spécialisé dans la génération du potentiel d'action

1. Mises en évidence expérimentales

Dès 1950, des chercheurs ont étudié la génération du potentiel d'action dans les motoneurones. Grâce à des stimulations orthodromiques (à partir du soma du motoneurone ou du nerf gastrocnémien) et antidromique (dans l'axone du motoneurone), ils ont établi que le PA était généré dans l'axone en comparant l'excitabilité des différents compartiments (Araki & Otani, 1955; Brock, Coombs, & Eccles, 1953; Coombs, Curtis, & Eccles, 1957; Fatt, 1957).

Après avoir surmonté les difficultés expérimentales nécessaires à l'étude du PA dans les axones beaucoup plus fins du SNC, l'initiation du PA dans la région proximale de l'axone a été confirmée par des enregistrements électrophysiologiques et d'imagerie sodium par plusieurs équipes (cf. Figure 6, A) (Kole et al., 2007; Palmer & Stuart, 2006; Popovic, Foust, McCormick, & Zecevic, 2011; Shu, Duque, et al., 2007)(voir pour revue Bean, 2007). Il a été prouvé que le courant sodium est maximal au SIA (cf. figure 6, B), mais que l'initiation du courant en tant que telle se passe dans la partie distale du SIA (cf. figure 6, C) (Hu et al., 2009; Popovic et al., 2011b; Baranauskas, David & Fleidervish, 2013). De ce fait, l'initiation du PA dans les neurones excitateurs se situe entre 20 et 40 μm du soma (Baranauskas, David, & Fleidervish, 2013; Popovic et al., 2011; Schmidt-Hieber & Bischofberger, 2010; Scott et al., 2014; Shu, Duque, et al., 2007).

2. Hypothèses

La question de savoir pourquoi le potentiel d'action est initié dans la région proximale de l'axone n'est pas une affaire triviale. Les premières études à s'y pencher sont des études théoriques, qui ont proposé 2 raisons principales (Moore, Stockbridge & Westerfield, 1983; Mainen et al., 1995) : **(1)** la densité de courant au SIA est la plus élevée, et **(2)** moins de courant est nécessaire pour dépolariser la membrane au SIA car elle est électriquement isolée des autres compartiments.

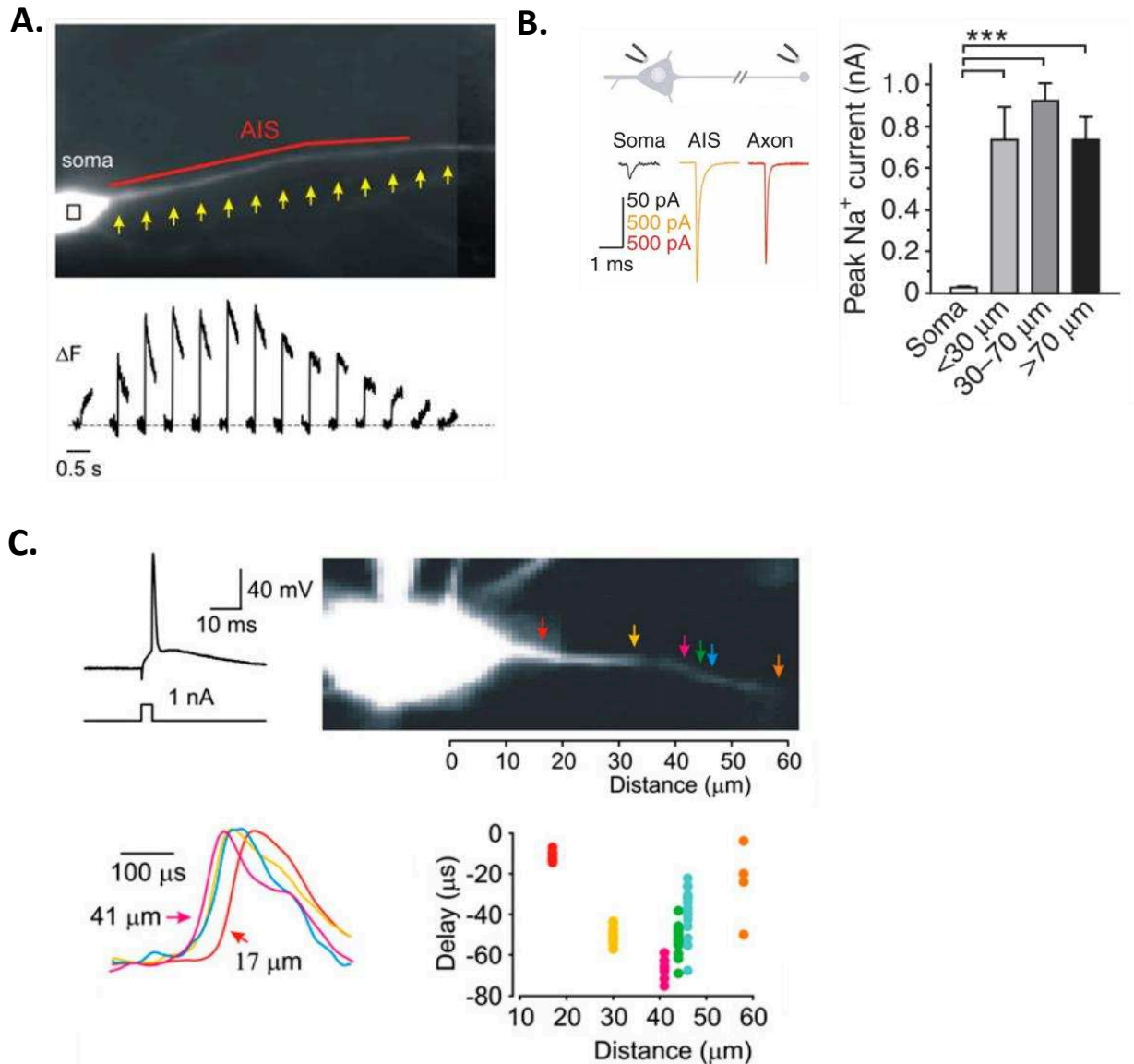


Figure 6. Un potentiel d'action initié sur la partie distale du SIA.

A. Le PA est initié dans le SIA. Imagerie sodium d'un neurone enregistré avec une caméra rapide. Le rectangle et les flèches indiquent les régions où les mesures de fluorescences ont été effectuées, grâce à une sonde fluorescente sensible au sodium, le SBFI (*Sodium-binding benzofuran isophthalate*). En dessous, la fluorescence normalisée ΔF ($n = 60$) enregistrée lors du déclenchement d'un PA unique dans le soma. D'après [Baranauskas et al., 2013](#). **B. La valeur du courant Na^+ est maximum au SIA** (en orange). A gauche, exemple du courant Na^+ obtenu sur des patch outside-out dans différents compartiments. A droite, moyenne de ces courants à différentes distances du soma. D'après [Hu et al., 2009](#). **C. Le PA est initié dans la partie distale du SIA.** En haut, protocole avec déclenchement d'un PA grâce à une pipette d'enregistrement placée au soma, et le neurone enregistré. En bas, courants d'action normalisés montrant le délai de leur apparition. Le PA est initié entre 36 et 41 μm du soma et met $\sim 70 \mu\text{s}$ pour rejoindre le soma. D'après [Baranauskas et al., 2013](#).

a) **Une forte densité de courant Na^+ au SIA**

L'impossibilité d'avoir accès à l'axone via la technique du patch classique en cellule entière (fin diamètre <1 μm et matrice cellulaire dense peu compatible avec le patch) ont considérablement retardé les études concernant la densité des canaux Na_v au SIA.

Après quelques études contradictoires, la quantification expérimentale fut d'abord obtenue en immunohistochimie en utilisant des anticorps spécifiques aux Na_v dans les cellules du ganglion de la rétine (Wollner & Catterall, 1986), puis fut ensuite confirmée de manière précise dans différents modèles expérimentaux : par des études d'imagerie sodium (Fleidervish, Lasser-Ross, Gutnick, & Ross, 2010; Kole et al., 2008), des enregistrements électrophysiologiques (Hu et al., 2009), et de microscopie électronique (Lorincz & Nusser, 2010) (revue dans Debanne et al., 2011; Kole & Stuart, 2012).

Par exemple, il a été montré dans les neurones pyramidaux L5, que le courant sodium au SIA est 34 fois plus grand que dans le soma (cf. Figure 6, B) (Hu et al., 2009), et les différentes études montrent le courant Na^+ est 5 à 55 fois plus élevé dans l'axone (Kole et al., 2008; Lorincz & Nusser, 2010).

Il y a donc bien une forte densité de Na_v qui serait à l'origine d'une forte densité de courant Na^+ au SIA, bien que les proportions dans lesquelles ceci est vrai restent discutables. Dans le même temps, la caractérisation des Na_v axonaux ($Na_v1.6$) qui possèdent des propriétés cinétiques particulières, notamment une courbe d'activation hyperpolarisée (Colbert & Johnston, 1996; Hoffman, Magee, Colbert, & Johnston, 1997; Hu et al., 2009; Kole et al., 2008), et une activation plus rapide (Schmidt-Hieber & Bischofberger, 2010) donne un argument supplémentaire pour expliquer le lieu de génération du PA.

Malgré tout, il a été récemment montré que les rats *knockout* (**KO**) pour le canal $Na_v1.6$ maintiennent une initiation du PA au SIA, avec un seuil de génération bien inférieur au soma, supporté par les canaux $Na_v1.2$ (Katz et al., 2018). La présence des $Na_v1.6$ au SIA ne semble donc pas représenter un prérequis nécessaire à l'initiation du PA au SIA, ou plutôt, n'est pas le seul facteur permettant de l'expliquer.

b) L'isolement électrique du SIA

Cette deuxième hypothèse a été globalement délaissée par les biologistes, malgré les démonstrations des physiciens (Baranauskas, Mukovskiy, Wolf, & Volgushev, 2010; Brette, 2013; Mainen, Joerges, Huguenard, & Sejnowski, 1995; Moore, Stockbridge, & Westerfield, 1983; Platkiewicz & Brette, 2010) les preuves expérimentales pour soutenir directement cette hypothèse étant incertaines. Nous verrons en détail cette hypothèse dans la [partie III. B. 4.](#)

II. LE POTENTIEL D'ACTION

A. Génération du potentiel d'action

1. Prérequis : la membrane, une structure électriquement polarisée

a) *Le potentiel de repos*

Une des spécificités des neurones réside dans le fait qu'ils ont une membrane électriquement polarisée, du fait d'ions répartis inégalement de part et d'autre. La membrane plasmique d'une cellule est composée d'une bicouche lipidique. Les propriétés des lipides font de cette bicouche un isolant électrique, capable de maintenir une tension électrique en place de part et d'autre de la membrane, limitant le passage des ions à travers le feuillet lipidique du fait de ses propriétés hydrophobes.

La polarisation de la membrane est d'origine ionique. La tension électrique créée, ou potentiel de repos, se situe autour de -70 à -60 mV dans la plupart des neurones. Elle est loin d'être naturelle, et requiert une forte consommation énergétique par un transport actif d'ions via les pompes Na^+/K^+ ATPases et qui est soutenue par des canaux de fuite largement perméables aux ions potassium et chlore. Ces mécanismes permettent d'établir des concentrations différentes d'ions Na^+ et K^+ de part et d'autre de la membrane, en les maintenant dans un compartiment contre leur gradient électrochimique. Ces différences de gradient électrochimique ou de potentiel d'équilibre des ions Na^+ et K^+ ont toutes leur importance dans la génération du PA.

b) *Le potentiel d'équilibre d'un ion*

Les ions sont distribués asymétriquement, de sorte qu'il y a une plus forte concentration de K^+ à l'intérieur de la cellule et une plus forte concentration de Na^+ à l'extérieur de la cellule (cf. [Tableau 1](#)). Ce déséquilibre disparaît pour chaque ion à son potentiel d'équilibre, un potentiel auquel la force chimique (i.e. le gradient de concentration) et la force électrique (i.e. le gradient de charge) se compensent, amenant à l'immobilité de l'ion de part et d'autre de la membrane. Le potentiel d'équilibre correspond donc à la différence de potentiel pour lequel le flux net d'ions au travers de la membrane est nul.

Composant	Concentration intracellulaire (mM)	Concentration extracellulaire (mM)	V _m Potentiel de repos (mV)	E Potentiel d'équilibre à 20°C (mV)	Force électromotrice V _m -E _{ion}
K ⁺	135	2,5	-60	-100	40
Na ⁺	4,3	152		89	-149
Cl ⁻	24	127,5		-42	-12
Ca ²⁺	0	3		+∞	- ∞

Tableau 1. Un déséquilibre ionique entre le milieu intracellulaire et extracellulaire.

Exemple de valeurs des concentrations ioniques de part et d'autre de la membrane utilisées pour la préparation du milieu extracellulaire et intracellulaire dans une expérience. La force électromotrice pour chaque ion est calculée à partir d'un potentiel de repos de -60 mV. Une valeur négative indique une force vers l'intérieur de la cellule et une valeur positive une force vers l'extérieur de la cellule.

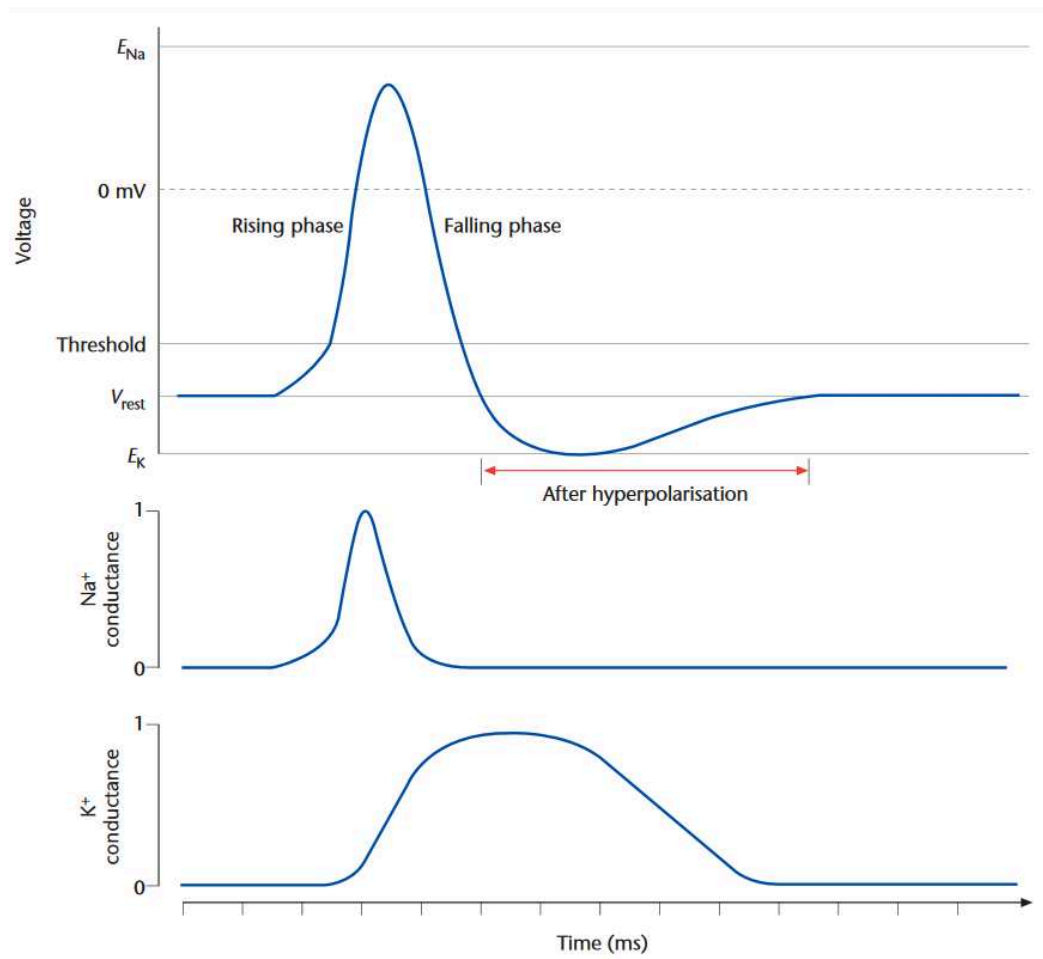


Figure 7. Décours temporel d'un potentiel d'action.

En haut, dépolarisation de la membrane à partir du potentiel de repos ($V_{rest} \sim -70$ mV), jusqu'à un potentiel positif supérieur à 0 mV se rapprochant de $E_{Na} \sim 90$ mV, puis repolarisation jusqu'à un potentiel proche de $E_K \sim -100$ mV. En dessous, les conductances Na^+ et K^+ au cours du temps. D'après [Egri & Ruben, 2012](#).

Ceci provient d'une part de la loi de Fick postulant que le flux de diffusion d'une molécule est proportionnel à son gradient de concentration, d'autre part, de la loi de Nernst postulant que le flux ionique né d'un gradient de concentration est autolimité par le gradient électrique qu'il génère. Il peut être calculé avec la formule suivante :

$$E_{\text{ion}} = \frac{RT}{ZF} \ln \left(\frac{[\text{ion}]_e}{[\text{ion}]_i} \right)$$

Où E_{ion} est le potentiel d'équilibre ou potentiel de réversion de l'ion, R est la constante des gaz parfaits, T la température absolue en Kelvin, Z la valence de l'ion, F la constante de Faraday, $[\text{ion}]_e$ la concentration de l'ion à l'extérieur de la cellule, $[\text{ion}]_i$ la concentration de l'ion à l'intérieur de la cellule, à 20°C, $RT/F = 25$ mV.

Le potentiel d'équilibre pour différents ions est récapitulé dans le [tableau 1](#).

2. Une dépolarisation brève de la membrane

Le potentiel d'action est une dépolarisation (ou un changement de polarité) brève (0.5 à 2.5 ms) et grande (60 à 100 mV) de la membrane plasmique ([Bean, 2007](#); [Sengupta, Stemmler, Laughlin, & Niven, 2010](#)).

Le PA est initié au SIA, lorsqu'une dépolarisation supraliminaire entraîne une ouverture massive des Na_v . Quand ceux-ci s'ouvrent, les ions Na^+ diffusent à travers la membrane selon leur force électromotrice (i.e. vers l'intérieur) qui est la différence entre le potentiel de repos de la cellule et le potentiel d'équilibre de l'ion ([cf. Tableau 1](#)). Après ouverture, les Na_v s'inactivent et dans le même temps, l'ouverture secondaire des canaux K_v permet une repolarisation membranaire grâce à la sortie d'ions K^+ (i.e. vers l'extérieur). Ainsi, les conductances au sodium et potassium varient dans le temps et permettent une dépolarisation brève de la membrane suivi d'un retour au potentiel de repos renforcé par la pompe Na^+/K^+ ATPase ([cf. Figure 7](#)) ([Bean, 2007](#); [Egri & Ruben, 2012](#); [Elmslie, 2010](#); [Hodgkin & Huxley, 1952](#)).

B. Modélisation du neurone, d'après Hodgkin & Huxley

1. Équivalent circuit électrique

Le modèle de Hodgkin et Huxley (**HH**) fut établi en 1952 (Hodgkin & Huxley, 1952) et reste encore à ce jour le modèle de potentiel d'action le plus reconnu. A partir d'un modèle électrique équivalent à celui d'un neurone (cf. Figure 8), il décrit l'évolution du potentiel de membrane au cours du temps, en le modélisant avec une équation différentielle.

Le modèle électrique du neurone est classiquement représenté par un **circuit RC**, un circuit composé d'une résistante (**R**) et d'une capacitance (**C**).

La capacitance vient du fait des propriétés isolantes de la membrane plasmique, semblable à un condensateur de capacitance C_M dont la charge Q est répartie de chaque côté du feuillet lipidique. Cette capacitance est exprimée en $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ et est de l'ordre de 0,7 à 1. Le courant I_C passant à travers une capacitance est défini par :

$$I_C = C_M \frac{dV_M}{dt}$$

Avec, C_M la capacitance de la membrane, V_M le potentiel de la membrane et t le temps.

Pour compléter le circuit équivalent du neurone, à cette capacitance s'ajoute une résistance de membrane. Elle découle du fait que la membrane plasmique n'est pas un condensateur parfait: elle fuit du fait du nombre important de protéines qui lui sont associées ; en particulier les canaux de fuites. Cette résistance de membrane R_M est exprimée en Ω/cm et l'inverse de cette résistance est la densité de conductance g_M , exprimée en S/cm^2 :

$$g_M = \frac{1}{R_M}$$

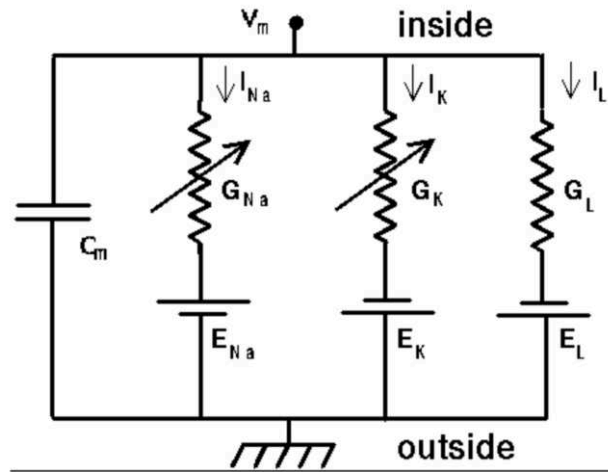


Figure 8. Modèle électrique d'un neurone selon Hodgkin et Huxley.

Avec C_m , la capacitance membranaire entre le milieu intracellulaire et extracellulaire; g_{Na} , g_K , g_L , les conductances sodium, potassium et des canaux de fuite; E_{Na} , E_K et E_L , les générateurs de courants associés à ces conductances; et V la tension à travers le circuit. D'après [Hodgkin & Huxley, 1952](#).

Le circuit original comprenait un courant sodium rapide, un courant potassium (*delayed rectifier*) et un courant de fuite. Nous pouvons de ce fait écrire l'équation ci-dessous, avec I_M , le courant membranaire, vu comme étant la somme du courant capacitif membranaire I_C (dépendant du potentiel de membrane V_M), et des courants résistifs des Na_V (I_{Na}), K_V (I_K) et des canaux de fuite (I_L):

$$I_M = C_M \frac{dV_M}{dt} + I_{NA} + I_K + I_L$$

Les résistances associées aux Na_V , et aux K_V sont des résistances variables; elles varient en fonction de l'état d'ouverture des canaux sensibles au potentiel, leur conductance est donc directement dépendante de V_M à un temps t . Ce n'est pas le cas de la conductance associée aux canaux de fuite, qui est considérée comme étant indépendante de V_M . Le courant passant à travers les différentes résistances est dépendant de la force électromotrice ($V_M - E_{ion}$) associée à chaque ion et est représenté comme un générateur de courant de potentiel E_{ion} .

En appliquant la loi d'Ohm pour les courants I_{Na} , I_K , et I_L , nous pouvons donc écrire :

$$I_M = C_M \frac{dV_M}{dt} + g_{NA} (V_M - E_{NA}) + g_K (V_M - E_K) + g_L (V_M - E_L)$$

Avec g_{ion} , la conductance ionique au temps t , et E_{ion} , le potentiel d'équilibre de l'ion.

2. Le formalisme de Hodgkin & Huxley

Grâce à des expériences sur l'axone géant de calmar en voltage imposé pour différentes valeurs de potentiel, Hodgkin and Huxley ont été capables de déterminer les valeurs d'équilibre des différentes conductances à un potentiel donné (Hodgkin & Huxley, 1952). Ils ont trouvé différentes valeurs de conductance maximale et une évolution temporelle spécifique à chaque conductance. Ils ont ensuite proposé une description mathématique de leurs observations, en introduisant des variables de « *gating* » m , n et h modélisant la probabilité d'ouverture d'un canal à un moment donné.

Le canal potassium fut modélisé avec la variable n ou variable d'activation, avec une exponentielle d'ordre 4 permettant de retracer au mieux les données expérimentales. Le canal sodium fut modélisé avec 2 variables différentes, m ou variable d'activation et h ou variable d'inactivation. En effet, pour un même potentiel, le courant sodium augmente puis diminue, d'où la nécessité d'incorporer 2 variables : m est décrit avec une courbe exponentielle d'ordre 3 et h avec un courbe exponentielle simple.

Les 2 équations établies des conductances sodium et potassium sont les suivantes:

$$g_k = n^4 \bar{g}_K \quad g_{NA} = m^3 h \bar{g}_{NA}$$

Avec, \bar{g}_{ion} la conductance maximale de l'ion, et m , n , et h , les différentes variables d'activation et d'inactivation estimées expérimentalement.

En remplaçant ces conductances dans la formule précédente, nous obtenons l'équation d'Hodgkin et d'Huxley suivante:

$$I_M = C_M \frac{dV_M}{dt} + m^3 h \bar{g}_{NA} (V_M - E_{NA}) + n^4 \bar{g}_K (V_M - E_K) + \bar{g}_L (V_M - E_L)$$

Ce modèle du potentiel d'action d'axone de calmar géant sert encore de référence aujourd'hui en neuroscience théorique pour créer des modèles plus complexes qui sont complétés par d'autres conductances et qui sont adaptés aux morphologies réalistes des différents compartiments du neurone (Brette, Rudolph, & Carnevale, 2007; Catterall, Raman, Robinson, Sejnowski, & Paulsen, 2012). Grâce à ces modèles, il est possible d'étudier la dynamique du potentiel d'action en détail, et d'en extraire différents paramètres.

C. Dynamique

1. Étude de la forme du potentiel d'action

a) *Caractéristiques principales*

Dès les premiers enregistrements du potentiel d'action, la forme du PA et sa dynamique ont été caractérisées (Araki & Otani, 1955; Brock et al., 1953; Coombs et al., 1957; Fatt, 1957).

Lorsque le PA est enregistré au soma, c'est la résultante du PA axonal envahissant le compartiment somatodendritique par une conduction antidromique qui est étudiée. Ce phénomène est visible sur le tracé dV/dt , où l'on repère classiquement les deux composantes distinctes, définies comme la composante IS, axonale, et la composante SD, somatodendritique (cf. Figure 9, B (c)). La composante IS est la résultante de l'initiation première du PA au niveau du SIA, tandis que la composante SD résulte de la dépolarisation du compartiment somatodendritique (Araki & Otani, 1955; Brock et al., 1953; Colbert & Johnston, 1996; Coombs et al., 1957; Fatt, 1957; Naundorf, Wolf, & Volgushev, 2006).

Pour aller plus loin, la forme bien spécifique du potentiel d'action peut être caractérisée par une multitude de paramètres: le seuil, l'amplitude, l'amplitude après 0 mV (*overshoot*), l'amplitude à mi-hauteur, le potentiel de repolarisation du PA (*afterhyperpolarisation*) (cf. figure 9, A)(Bean, 2007).

b) *Rôle sur la transmission*

La forme du potentiel d'action ainsi que sa dynamique ont largement été étudiées, car cela permet de mieux comprendre les mécanismes régissant l'excitabilité du neurone mais également la transmission du PA le long de l'axone.

De manière intéressante, il a récemment été montré que la forme du potentiel d'action peut être modifiée par les canaux sensibles aux potentiels qui le génèrent, et que ces changements subtils de la forme du PA peuvent en réalité encoder des informations transmises le long de l'axone jusqu'aux terminaisons présynaptiques (Bialowas et al., 2015;

de Polavieja, Harsch, Kleppe, Robinson, & Juusola, 2005; Juusola, Robinson, & De Polavieja, 2007; Kress & Mennerick, 2009; Rama et al., 2018).

Par exemple, un élargissement du PA, dû à une inactivation des canaux $Kv1.1$ suite à une dépolarisation somatique soutenue, est capable d'augmenter la libération de calcium dans les terminaisons présynaptiques (Bialowas et al., 2015). Ce mécanisme, identifié comme une facilitation analogue-digitale (la d-ADF, pour *depolarization-induced Analogue Digital Facilitation*), met en évidence un codage d'information analogue, ou gradée, via la forme du PA, qui s'ajoute au codage de l'information digitale, via la fréquence de PAs, et le *timing* du PA (Brette, 2015a; Debanne, Bialowas, & Rama, 2013; Debanne et al., 2011; Rama et al., 2018).

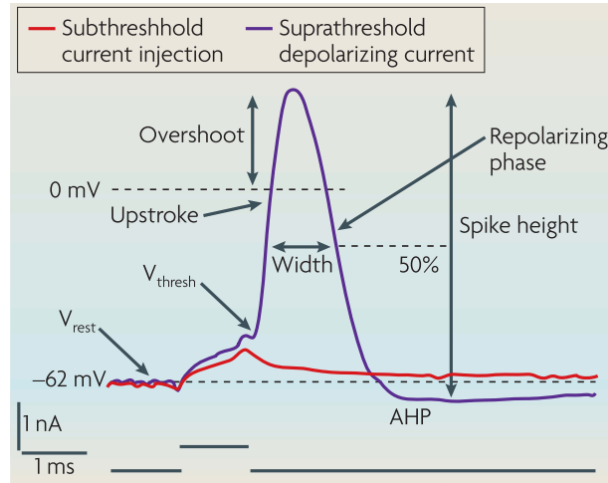
De même, un *overshoot* plus grand dans la cellule présynaptique, dû à une diminution de l'inactivation des canaux Na_v suite à une hyperpolarisation avant le PA, est à l'origine d'une facilitation synaptique calcium-dépendante dans les paires de neurones pyramidaux du champ CA3 et de la couche 5 du néocortex (Rama et al., 2015). Ce second mécanisme de facilitation analogue digitale (la h-ADF, pour *hyperpolarised-induced Analogue Digital Facilitation*) favoriserait les oscillations gamma et la synchronie du réseau de neurones pyramidaux (Rama et al., 2015).

2. Initiation : disparités au soma vs à l'axone

La forme du PA à son initiation est un paramètre clé pour comprendre comment le potentiel d'action est déclenché, et comment un neurone est capable de définir et maintenir un seuil d'excitabilité face aux différents inputs synaptiques reçus.

La forme du PA à l'initiation est rapide dans la plupart des neurones, et peut être vue comme une dépolarisation abrupte à partir du potentiel de la membrane. Notons la vitesse de dépolarisation des neurones corticaux qui passe de 5 à 20 mV/ms environ en moins de 0,2 s ou en moins de 1 mV (cf. Figure 9, B (b-c)) (Fontaine, Peña, & Brette, 2014; Naundorf et al., 2006; Telenczuk, Fontaine, & Brette, 2016; Yu, Shu, & McCormick, 2008). Cette initiation rapide du PA est difficilement reproduite par les modèles théoriques HH à un seul compartiment, en général modélisant le soma (Brette, 2015b; Colwell & Brenner, 2009; Gutkin & Ermentrout, 2006; Naundorf et al., 2006). Dans ces modèles à un compartiment, le modèle le plus réaliste concernant l'initiation du potentiel d'action, est par défaut le modèle *integrate and fire* (IF) qui produit un PA dès qu'un seuil d'excitabilité prédéfini est atteint, sans prendre

A.



B.

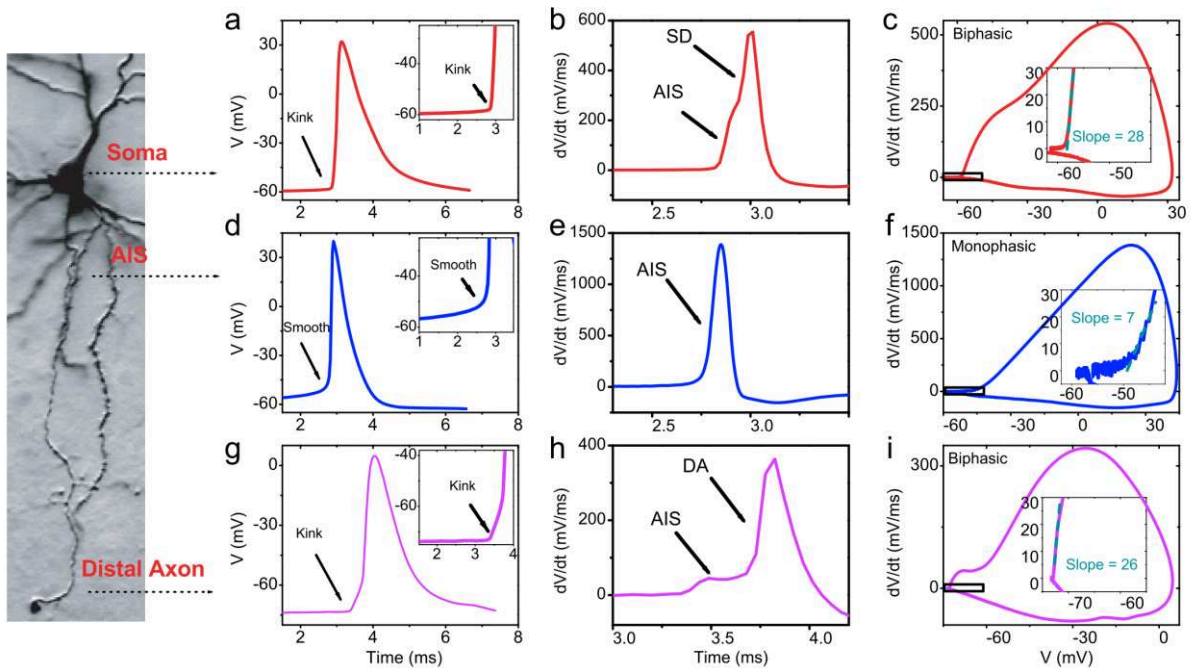


Figure 9. Analyse de la forme d'un potentiel d'action.

A. Différents paramètres permettent d'évaluer la forme du PA. V_{rest} , le potentiel de repos à partir duquel le PA est émis au seuil V_{thres} . L'amplitude du PA est mesurée du seuil du PA à l'amplitude maximale, l'overshoot est l'écart de potentiel mesuré au-dessus de 0 mV, la largeur du PA est mesurée à sa demi-hauteur, et l'AHP mesure le potentiel de repolarisation maximale du PA. D'après [Bean, 2007](#). **B. La forme du potentiel d'action varie le long de l'axe soma-axone.** A gauche, un neurone pyramidal de la couche 5 du cortex. Puis en rouge, le dérouls temporel du PA au soma, sa dérivée première dV/dt en fonction du temps t , puis sa dérivée première dV/dt en fonction du potentiel de membrane V , aussi appelé *phase plot*. Les mêmes représentations sont montrées au SIA (en bleue) et dans l'axone distal (en violet). D'après [Yu et al., 2008](#).

en compte la dynamique des canaux sensibles au potentiel, mais qui est apte à reproduire la pente abrupte observée à l'initiation du PA (Brette, 2015b; Fourcaud-Trocme, Hansel, Vreeswijk, & Brunel, 2003).

Du fait de cette inconsistance surprenante, la forme du PA à l'initiation a été étudiée plus en détail, et il a été proposé que les canaux sodium axonaux ne suivent pas une ouverture lente à l'initiation du PA mais plutôt, ils s'ouvrent d'un coup, sous un mécanisme de coopérativité entre canaux sodium, phénomène qui a été observé dans d'autres modèles et pour différents canaux (Naundorf et al., 2006; Öz, Huang, & Wolf, 2015).

Cependant, aucune donnée expérimentale n'a pu confirmer cette théorie par la suite (Hu et al., 2009), et le modèle unicompartmental utilisé a été jugé insuffisant pour reproduire l'initiation du PA opérant via la correspondance entre le soma et le segment initial de l'axone (McCormick, Shu, & Yu, 2007; Yu et al., 2008).

En revanche, il a été proposé que cette caractéristique émanait directement de la morphologie du neurone et de la propagation active du PA du SIA vers le soma (McCormick et al., 2007; Yu et al., 2008). En effet, il apparaît que la forme du PA initié au SIA et celle du PA rétropropagé dans le compartiment somatique sont différentes. Le PA au SIA apparaît à un seuil hyperpolarisé et a une initiation rapide suivant une dépolarisation progressive (cf. Figure 9, B (d-f)), toutefois bien inférieure à celle du soma ou de l'axone, présentant une dépolarisation abrupte à partir du potentiel de membrane, ou *kink* (cf. Figure 9, (a-c), (g-i)). Ceci a pu être modélisé par un modèle utilisant le formalisme de HH (Yu et al., 2008). L'interprétation proposée à ce modèle, est que la rétropropagation active du PA, via les Nav axonaux, du SIA vers le soma, créerait le *kink* observé du PA somatique.

La description de la forme du PA dans les différents compartiments du neurone est tout à fait pertinente, son interprétation théorique via une rétropropagation active semble cependant insuffisante à expliquer le *kink* somatique. Brette et ses collègues rappellent que la distance site d'initiation-soma est de l'ordre de 30-50 μm , une valeur bien inférieure à celle qu'il faudrait pour que ce mécanisme puisse opérer (environ 2 mm) (Brette, 2013; Telenczuk, Fontaine, & Brette, 2017).

Une dernière hypothèse a par la suite émergée, expliquant le *kink* du PA somatique par le couplage électrique opérant entre le compartiment somatique et axonal à l'initiation (Brette, 2013, 2015b; Telenczuk et al., 2017).

3. La théorie du couplage résistif

La théorie du couplage résistif (anciennement *théorie de la compartimentalisation*) s'applique lorsque **1)** le SIA est contenu dans un axone fin à proximité d'un soma proportionnellement beaucoup plus grand et, **2)** l'initiation du PA apparaît suffisamment loin du soma.

Dans ce cas, le soma peut être considéré comme un puit de courant de par sa large taille, et à l'initiation, un fort couplage électrique opère entre le SIA et le soma qui se comporte comme un dipôle électrique. Le courant sodium axonal généré à l'initiation fuit principalement vers le soma, agissant comme un puit de courant, et envahi le soma en tant que courant capacitif, chargeant la membrane du soma. Il s'ensuit que les canaux sodium somatiques s'ouvrent brutalement et créent le *kink* observé au soma (cf. Figure 10, A) (Brette, 2013; Kole & Brette, 2018; Telenczuk et al., 2017).

Le couplage résistif entre le soma et le SIA serait tel, qu'il a été proposé qu'il forme une boucle de courant englobant le SIA et le soma (Teleńczuk, Brette, Destexhe, & Teleńczuk, 2018; Telenczuk et al., 2016).

Notons que d'après cette théorie, à l'initiation le courant généré au SIA fuirait principalement vers le compartiment somatique de par la faible résistance axiale qu'oppose le soma au courant, en comparaison à l'axone qui est plus fin et oppose une résistance plus élevée. Cependant, à l'initiation, le courant sodium généré est divisé en un courant fuyant vers le soma et un deuxième courant fuyant vers l'axone. Si le courant fuyant vers le soma est grand, de par la faible résistance du soma, le courant fuyant vers l'axone s'il est certes négligeable d'après la théorie, serait tout à fait capable de générer un PA de par le fait de la très faible capacitance axonale.

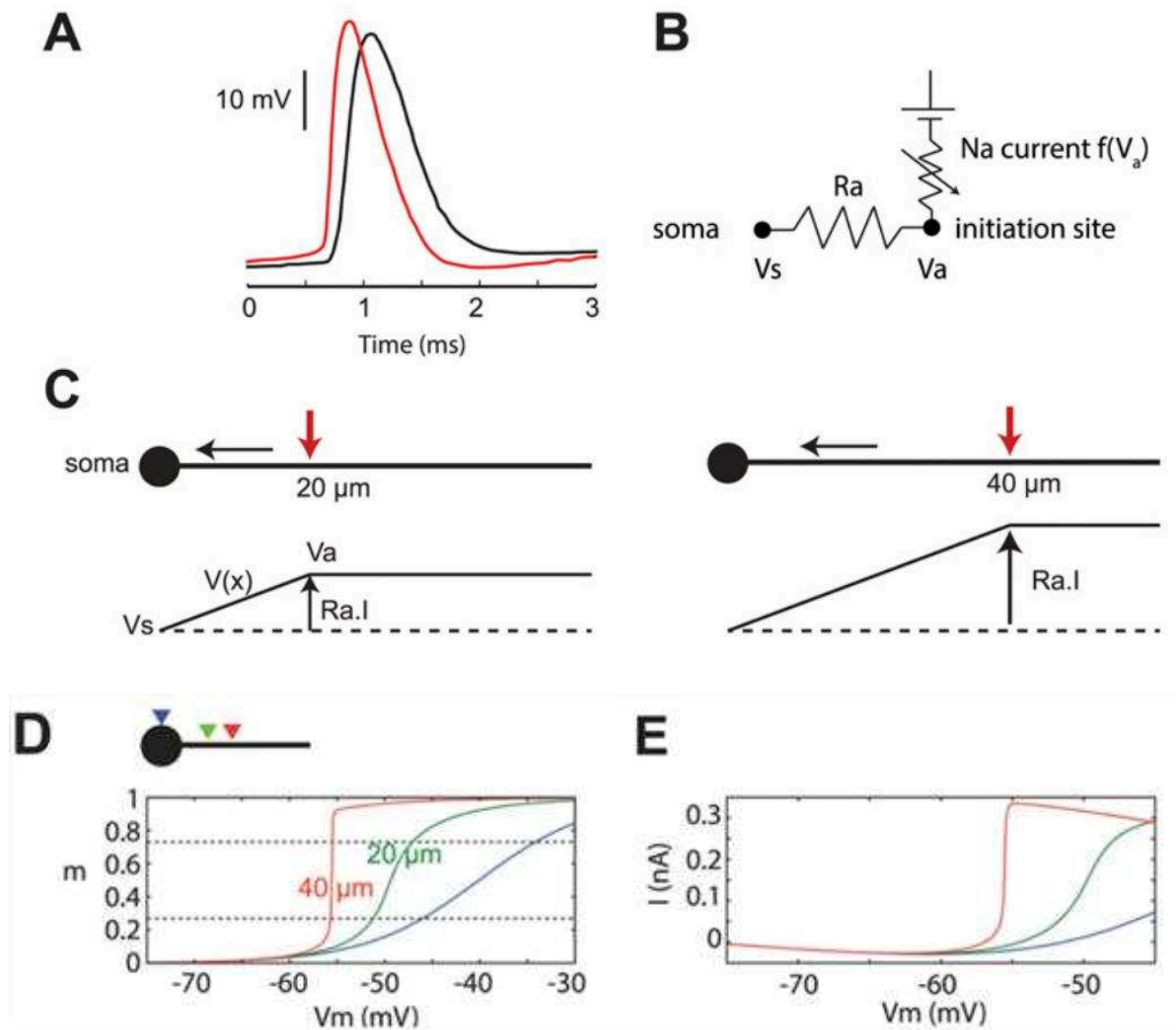


Figure 10. La théorie du couplage résistif entre le soma et le SIA (anciennement, la théorie de la *compartmentalisation*).

A. Le potentiel d'action somatique présente un *kink*. En rouge, un PA enregistré à l'axone, en noir, au soma. **B. Modèle électrique simplifié du compartiment somatique et du site d'initiation.** V_s , le voltage somatique, V_a , le voltage axonal, R_a , la résistance axiale. Pour simplifier, les canaux sodium sont placés en *un point* (semblable au SIA, et que l'on appelle SIA ici) et créent un courant dépendant du voltage à l'axone $f(V_a)$, tandis que le reste du modèle est passif (i.e., sans canaux). Le soma est relié au site d'initiation par une résistance R_a . **C. La loi d'Ohm renforce l'excitabilité d'un SIA distal.** En appliquant la loi d'Ohm, un courant injecté au SIA produit une dépolarisation linéaire jusqu'au soma. Cette dépolarisation est proportionnelle à R_a , et donc à la distance (à gauche, $20\ \mu\text{m}$, à droite, $40\ \mu\text{m}$). La dépolarisation à $40\ \mu\text{m}$ est par conséquent plus grande. **D. Les canaux sodium s'ouvrent plus rapidement lorsque le SIA est placé à $40\ \mu\text{m}$ du soma.** Proportion de Na_V ouvert en fonction du voltage somatique V_s . En bleu, les Na_V sont placés au soma, en vert, à $20\ \mu\text{m}$, en rouge à $40\ \mu\text{m}$ du soma. **E. Le courant somatique est très rapide lorsque le SIA est placé à $40\ \mu\text{m}$ du soma.** Courbe du courant en fonction du voltage mesuré au soma. D'après [Brette, 2015a](#).

Le modèle électrique du neurone à l'initiation utilisé pour illustrer la théorie du couplage résistif est présenté dans la [figure 10, B](#). Le soma est relié au SIA par une résistance axiale (**Ra**). En appliquant la loi d'Ohm, du fait que le milieu intracellulaire du neurone est considéré comme résistif, nous obtenons : $V_a - V_s = R_a * I$ (cf. [Figure 10, C](#)). Comme la **Ra** augmente avec la distance, le gradient de voltage est plus fort lorsque le SIA est déplacé de 20 à 40 μm (cf. [Figure 10, C](#)). A l'initiation, cela entraîne une ouverture plus rapide des canaux sodium somatiques, ainsi qu'un courant résultant abrupt au soma (cf. [Figure 10, D-E](#)).

Dans les systèmes biologiques, la résistance axiale, **Ra** peut être défini par la formule suivante :

$$R_a = \left(\frac{4R_i}{\pi d^2} \right) * x$$

Avec **Ra**, la résistance axiale entre le soma et le site d'initiation (Ohm), **x** la distance entre le soma et le site d'initiation (cm), **d** le diamètre de l'axone (cm), et **Ri** la résistivité intracellulaire (Ohm.cm) qui représente la résistance du cytoplasme à un courant entrant, i.e. l'opposé de la conductivité électrique.

D'après cette formule, nous pouvons voir que la résistance axiale dépend directement de la distance du soma au site d'initiation. Un neurone avec un SIA situé plus distalement devrait être plus excitable, et pourrait avoir un seuil de génération du PA hyperpolarisé et une rhéobase réduite, ou nécessiterait moins de canaux sodium au SIA pour générer le courant initial. Nous explorerons la validité de cette théorie via les observations expérimentales du SIA au sein du neurone dans la [partie III. B. 4](#).

III. LE SEUIL DU POTENTIEL D'ACTION, PARAMETRE DE LECTURE DE L'EXCITABILITE NEURONALE

A. Comment définir le seuil ?

L'excitabilité du neurone a été longuement étudiée et peut être vue comme la capacité du neurone à déclencher un PA. Le moment précis où le PA est déclenché, ou seuil du potentiel d'action est toutefois mal défini. Tout d'abord la question s'est posée de savoir si le seuil du PA est un seuil de courant ou un seuil de voltage (Koch, Bernander, & Douglas, 1995). Le PA ayant été longtemps considéré comme un phénomène tout ou rien, la mesure du seuil de voltage, considérée comme fixe, a été longuement délaissée, au profit de la mesure du seuil de courant, permettant l'analyse de la relation entre le signal d'entrée et le signal de sortie, codé en fréquence de PA. Une des premières mesures de l'excitabilité fut donc naturellement la mesure du courant minimal nécessaire au déclenchement d'un PA, aussi défini comme la rhéobase. D'ailleurs, la courbe mesurant le nombre de PA en fonction du courant injecté est classiquement définie comme la courbe d'excitabilité et est encore largement utilisée aujourd'hui.

Toutefois, la mesure du courant est rarement disponible dans les enregistrements expérimentaux *in vivo* et il est aussi possible de mesurer le seuil du PA comme un seuil de voltage, visible directement sur le déroulement temporel du PA (Koch et al., 1995; Platkiewicz & Brette, 2010). De ce fait, il fut nécessaire de définir plus précisément un seuil de voltage du PA.

Le seuil de voltage est par définition vague, car il représente un seuil empirique issu de l'analyse de la forme du potentiel d'action à son initiation, et le problème fut donc de trouver une mesure mathématique quantitative à même de pouvoir retranscrire ce qui est visible par l'œil de l'expérimentateur.

Le PA étant une dépolarisation soudaine à partir du potentiel de membrane, la manière la plus répandue de définir ce seuil, résulte de l'analyse du **phase plot** représentant la vitesse de dépolarisation au cours du temps ou dV/dt en fonction du voltage de la membrane V . En effet, sur ce graphique, l'augmentation soudaine de la vitesse de dépolarisation à l'initiation du PA est clairement visible (cf. Figure 9. B. (a)). Il est alors possible de définir un seuil dV/dt

arbitraire définissant le seuil de voltage du PA. Cette valeur est généralement égale à 10-50 mV/ms, permettant de s'affranchir du bruit et permet de retranscrire correctement le voltage à partir duquel le PA est évoqué (Sekerli et al., 2004). D'autres méthodes plus complexes existent mais restent équivalentes lorsque le PA étudié apparaît comme une dépolarisation soudaine et rapide à partir du potentiel de la membrane, comme cela est le cas dans les neurones corticaux (Platkiewicz & Brette, 2010; Sekerli et al., 2004).

Il faut toutefois garder à l'esprit que la mesure du seuil du PA, qu'elle soit qualitative ou quantitative, extraite à partir d'un seuil de courant ou d'un seuil de voltage, n'est qu'en fin de compte une manière indirecte de caractériser et d'englober ce qui est expérimentalement impossible à définir sur des enregistrements en courant imposé : la valeur de la conductance sodium axonale à un temps t nécessaire à générer un PA à l'instant $t+1$. N'oublions pas que seule la conductance sodium est capable de générer le PA, et que par conséquent, le seuil théorique légitime du PA pourrait être défini comme la valeur de la conductance sodium à même de le déclencher.

Ce paramètre est influencé par différents facteurs comme le voltage de la membrane, les propriétés biophysiques des canaux sodium, la présence à l'axone de certaines conductances potassium, ainsi que d'autres paramètres, qui influent sur l'intégration des signaux électriques sur l'axe soma-axone. Il en résulte que la conductance sodium nécessaire à générer un PA à un instant t varie dans le temps car elle est influencée par de nombreux paramètres. Nous allons détailler ici ces différents paramètres qui influencent le seuil de voltage du PA, considéré tel quel comme le seuil du PA.

B. Un seuil variable

1. Rôle du potentiel de membrane précédant le PA

Les neurones reçoivent en temps réel de nombreux potentiels synaptiques à même d'influencer les propriétés électrophysiologiques du neurone, et leur capacité à générer des PAs (Shu, Hasenstaub, Badoual, Bal, & McCormick, 2003). *In vivo*, la variabilité du seuil du PA est particulièrement élevée, de 5 à 10 mV selon les études (Azouz & Gray, 2000; Fontaine et al., 2014; Henze & Buzsáki, 2001; Naundorf et al., 2006; Peña & Konishi, 2002; Wilent & Contreras, 2005), et le potentiel de membrane est en constante fluctuation – les signaux entrants n'étant pas contrôlés comme cela est possible en enregistrement *in vitro* en bloquant chimiquement la transmission synaptique. Cette variabilité du seuil du PA est également observée *in vitro*, par exemple lorsque le potentiel de membrane précédant le PA dans les neurones pyramidaux L5 varie, le seuil du PA suit les mêmes variations sur plus de 10 mV (cf. Figure 11, A) (Hu et al., 2009).

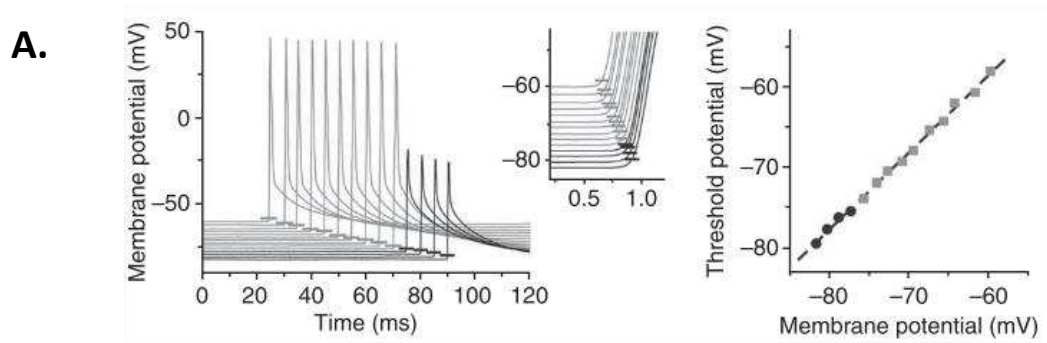
Le seuil du PA est en effet fortement influencé par le potentiel de la membrane précédant le PA. Ceci est observé via différents paramètres : le potentiel à partir duquel le PA est déclenché (Hu et al., 2009), la pente de dépolarisation précédant le PA (de Polavieja et al., 2005; Fontaine et al., 2014; Peña & Konishi, 2002; Wilent & Contreras, 2005), l'historique des stimulations précédant le PA ou les fluctuations du potentiel de membrane avant le PA (Azouz & Gray, 2000; Azouz & Gray, 2003; de Polavieja et al., 2005; Henze & Buzsáki, 2001; Peña & Konishi, 2002), mais également par le bruit (Aljadeff, Segev, Berry, & Sharpee, 2013; Fernandez & White, 2010; Fontaine et al., 2014; Fourcaud-Trocmé & Brunel, 2005; Ganmor, Segev, & Schneidman, 2015; Lecar & Nossal, 1971; Neishabouri & Faisal, 2014) (cf. Figure 11, A-B).

Un des acteurs principaux de ce phénomène sont les canaux sensibles au potentiel, dont la dynamique d'ouverture est directement influencée par le potentiel de membrane.

2. Rôle des canaux sodium

Les canaux Na_v sont les premiers candidats à même d'impacter le seuil du PA. Diminuer le nombre de canaux Na_v disponibles au SIA dépolarise fortement le seuil du PA. En effet, des puffs locaux de TTX (à des concentrations non saturantes) sur le SIA des neurones pyramidaux

L5 augmente considérablement le seuil du PA (cf. Figure 12, A) (Hu et al., 2009; Palmer & Stuart, 2006). La conductance sodium au SIA est donc un paramètre clé régulant le seuil. D'autre part, la conductance sodium peut être modulée par le degré d'inactivation des canaux Na_v . L'inactivation des canaux Na_v est largement connue pour créer une période réfractaire, permettant de générer un seul PA à la fois mais également d'augmenter l'efficacité énergétique, en limitant la superposition des conductances sodium et potassium durant la génération du PA (Sengupta et al., 2010). Dès 1952, l'inactivation des canaux Na_v a été un mécanisme supposé à même d'augmenter le seuil de génération du PA (Hodgkin & Huxley, 1952a), hypothèse qui a par la suite été soutenue par des modèles théoriques (cf. Figure 12, B) (Fontaine et al., 2014; Platkiewicz & Brette, 2011). Au potentiel de repos, les canaux Na_v axonaux sont inactivés à des taux de 80 à 95% selon les études (Engel & Jonas, 2005; Fricker, Verheugen, & Miles, 1999; Hu et al., 2009). L'inactivation des canaux Na_v axonaux augmentant considérablement lors d'une dépolarisation (Fricker et al., 1999; Hu et al., 2009; Rush et al., 2005; Schmidt-Hieber & Bischofberger, 2010), les variations du potentiel de membrane modèleraient directement le niveau d'inactivation de ces canaux, et donc la conductance sodium axonale (Azouz & Gray, 2000; Azouz & Gray, 2003; Fontaine et al., 2014; Fricker et al., 1999; Kuba & Ohmori, 2009; Platkiewicz & Brette, 2011; Wilent & Contreras, 2005). Les études théoriques sont capables d'estimer correctement l'impact de l'inactivation des Na_v comme une réduction de l'excitabilité neuronale, dû à une diminution de la conductance sodium à l'initiation du PA, et entraînant une variabilité du seuil du PA (Fontaine et al., 2014; Platkiewicz & Brette, 2011), ce qui peut intuitivement être accepté car cet effet découle directement des propriétés électrophysiologiques des Na_v . Cependant les preuves expérimentales sont moins simples à obtenir, les variations de potentiel influençant à la fois l'ouverture et l'inactivation des canaux sodium, mais aussi les autres conductances sensibles au potentiel. Il a toutefois été montré que des potentiels d'action aux seuils dépolarisés sont corrélés à une entrée sodium plus faible au SIA, donnant un indice supplémentaire en faveur de l'hypothèse qu'une inactivation plus forte des Na_v génère un courant sodium réduit au SIA et un seuil plus élevé (cf. Figure 12, C) (Scott et al., 2014).



B.

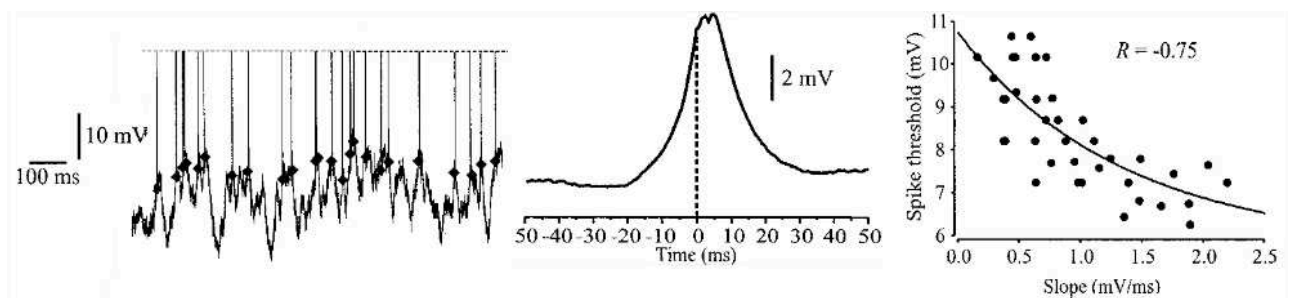


Figure 11. Le potentiel de membrane contrôle le seuil du PA.

A. Le seuil est positivement corrélé au potentiel de membrane. Exemple d'enregistrement *in vitro* d'un neurone pyramidal L5. En gris, les PAs ; en noir, les *spikelets*. Les barres horizontales indiquent le seuil (voir zoom, au centre). À droite, graphique représentant le seuil en fonction du potentiel de la membrane. D'après [Hu et al., 2009](#). **B. Le seuil est négativement corrélé à la pente de dépolarisation.** Enregistrements *in vivo* de neurones chez le chat obtenus avec une stimulation visuelle. A gauche, exemple de traces de PA. Au milieu, La dépolarisation (mV) précèdent le PA (ligne en pointillé, au temps 0). Notons une forte dépolarisation précédant le PA. A droite, le seuil en fonction de la pente de dépolarisation, mesurée 10 ms avant l'émission du PA. Notons la variabilité du seuil pour une faible pente de dépolarisation. D'après [Azouz & Gray, 2000](#).

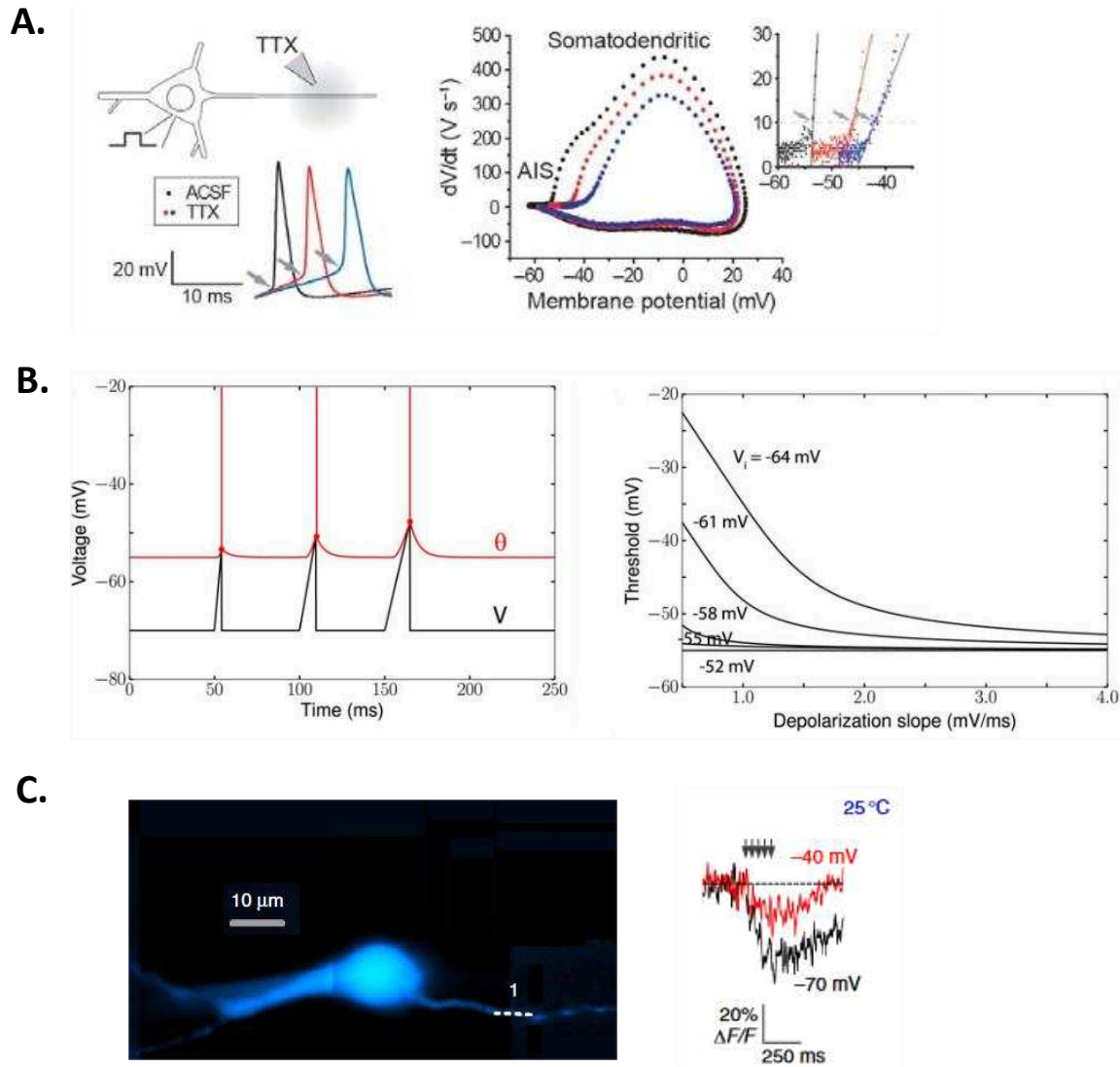


Figure 12. Le rôle des canaux sodium sur le seuil du PA.

A. La conductance sodium axonale contrôle le seuil du PA au soma. Enregistrements de neurones pyramidaux L5, en présence de puff de TTX sur l'axone, à proximité du SIA. Le seuil est dépolarisé en présence des puffs de TTX. Notons la diminution (en rouge) puis la disparition (en bleu) de la composante IS sur le phase plot, lorsque la concentration de TTX augmente. D'après [Hu et al., 2009](#). **B. Dans un model *integrate and fire* avec inactivation, l'inactivation des canaux sodium détermine le seuil.** A gauche, des rampes de potentiels (en noir) sont injectées au modèle jusqu'à atteindre le seuil (en rouge). Plus la pente de dépolarisation est faible, plus le seuil est dépolarisé. Ce phénomène est réduit si l'on décale la demi-inactivation des Na_v (V_i) vers des potentiels dépolarisés (à droite). D'après [Platkiewicz & Brette, 2011](#). **C. Une dépolarisation somatique entraîne une entrée sodium réduite dans l'axone proximal.** A gauche, protocole d'imagerie sodium en position 1 sur un neurone granulaire du cervelet rempli au SBFI. A droite, fluorescence SBFI après 5 PAs à 20Hz lorsque le soma est au potentiel de repos (en noir) ou dépolarisé à -40 mV (en rouge). D'après [Scott et al., 2014](#).

3. Rôle des canaux potassium

Un autre déterminant du seuil sont les canaux potassium. En particulier, les canaux potassium K_v1 créent un courant hyperpolarisant qui diminue l'excitabilité en introduisant un délai dans l'apparition du PA, réduisant la pente de dépolarisation précédant le PA et en rehaussant le seuil (voir en annexe: Rama et al., 2017). En effet, le blocage de ces canaux par une faible concentration de 4-Aminopyridine (4-AP) ou par la Dendrotoxine (DTx) augmente l'excitabilité du neurone, diminue le délai d'apparition du PA et diminue son seuil (Cudmore et al., 2010; Debanne et al., 2011; Rama et al., 2017; Storm, 1988).

Cet effet a pu être observé dans les neurones pyramidaux CA3 (Cudmore et al., 2010; Rama et al., 2017), dans les neurones pyramidaux L5 (Shu, Yu, et al., 2007) et L2-3 (Higgs & Spain, 2011), les interneurones à décharge rapide (Campanac et al., 2013; Goldberg et al., 2008), les cellules granulaires du gyrus dentelé (Kirchheim, Tinnes, Haas, Stegen, & Wolfart, 2013), et dans les neurones sensoriels (Glazebrook et al., 2002).

La position stratégique des K_v1 , largement réparti dans les neurones du SNC au niveau du SIA (Lorincz & Nusser, 2008), permettrait de limiter la dépolarisation induite par les canaux sodium au site d'initiation.

4. Rôle de la résistance axiale

D'après la théorie, la position du SIA est directement proportionnelle à la résistance axiale (Brette, 2013; Gullledge & Bravo, 2016; Telenczuk et al., 2017). Une manière simple d'étudier ce paramètre est donc d'étudier le rôle de la position du SIA sur l'excitabilité du neurone.

La position du SIA au sein de l'axone semble reliée à des schémas d'excitabilité dans certains types neuronaux (voir pour revue Kole & Brette, 2018). Par exemple, dans le noyau *laminaris* du système auditif aviaire, la position et la longueur du SIA sont fortement dépendantes des fréquences de sons traitées par le neurone. Les neurones traitant les hautes fréquences ont un SIA court ($\sim 10 \mu\text{m}$) situé loin du soma ($\sim 45 \mu\text{m}$), tandis que les neurones traitant les basses fréquences ont un SIA plus long ($\sim 25 \mu\text{m}$) et plus proche du soma ($\sim 10 \mu\text{m}$) (Kuba, Ishii, & Ohmori, 2006). Un modèle reproduisant ces géométries montre que le seuil

de courant nécessaire à la génération d'un PA est plus faible lorsque la position du SIA s'éloigne du soma (cf. Figure 13, A); une excitabilité accrue pouvant toutefois être également obtenue avec un SIA proximal dont la longueur est augmentée. Dans ce modèle, le mécanisme en jeu pour expliquer la relation excitabilité – longueur du SIA est la valeur de la conductance sodium au site d'initiation, un SIA plus grand entraînant une conductance sodium plus grande et une rhéobase moindre (Gulledge & Bravo, 2016; Kuba et al., 2006). La position du SIA, serait quant à elle, un levier pour isoler le site d'initiation du compartiment somatique, limitant la fuite de courant du SIA vers le soma (Kuba et al., 2006).

Une conclusion similaire est retrouvée dans la comparaison du seuil du PA des neurones pyramidaux CA3 et des neurones de la couche granulaire : le seuil plus hyperpolarisé des neurones CA3 est corrélé avec la présence plus distale des $Na_v1.6$ et une densité plus forte de ces canaux (Kress, Dowling, Meeks, & Mennerick, 2008; Kress & Mennerick, 2010).

La relation excitabilité – position du SIA n'est pourtant pas si claire dans d'autres populations de neurones. Dans les neurones d'hippocampe dissociés, la localisation distale du SIA est au contraire corrélée avec une excitabilité diminuée (cf. Figure 13, B) (Grubb & Burrone, 2010). Aussi, l'étude des neurones pyramidaux L5 et des neurones pyramidaux CA1 ne montrent pas de forte corrélation entre le seuil du PA et la position du SIA (Hamada et al., 2016; Thome et al., 2014).

Dans l'étude de Hamada et ses collègues, le facteur de la résistance axiale est directement estimé pour pouvoir étudier son effet sur l'excitabilité, la calcul de la R_a se basant sur $R_i = 150 \text{ M}\Omega$ et des valeurs de diamètres obtenues par reconstruction 3D des neurones (Hamada, Popovic, & Kole, 2017). Les analyses montrent que la R_a est corrélée à la distance SIA-soma. Dans cette étude cependant, ni le seuil du PA, ni sa forme ne sont corrélés à la distance du SIA; bien que le seuil des neurones possédant un axone émergeant d'une dendrite soit diminué de 3 mV. La dynamique stable du PA est expliquée par la covariation de la capacitance somatodendritique avec le paramètre R_a ; la morphologie du neurone (i.e. le diamètre de la dendrite apicale) s'adaptant à la position du SIA pour maintenir une forme de PA constante.

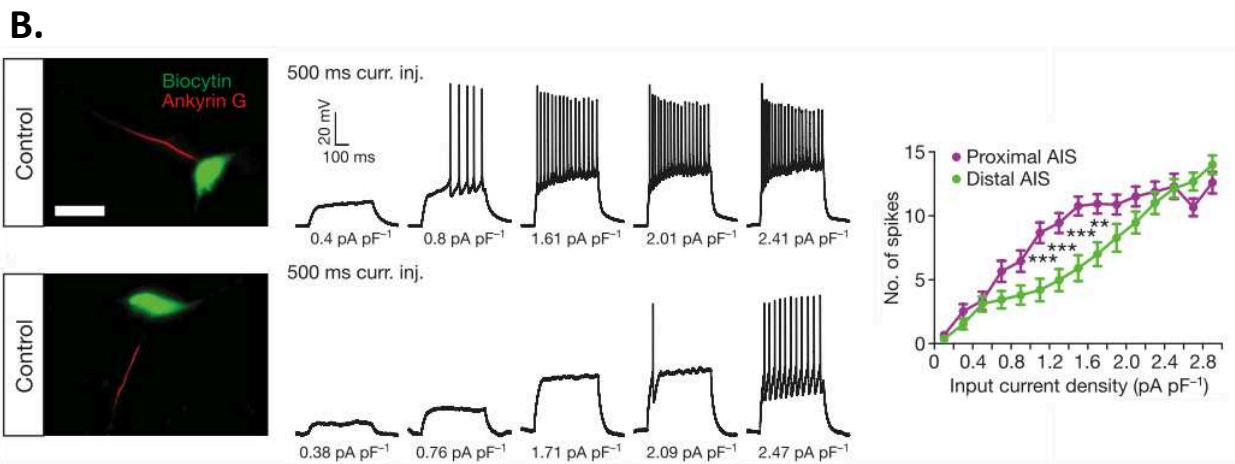
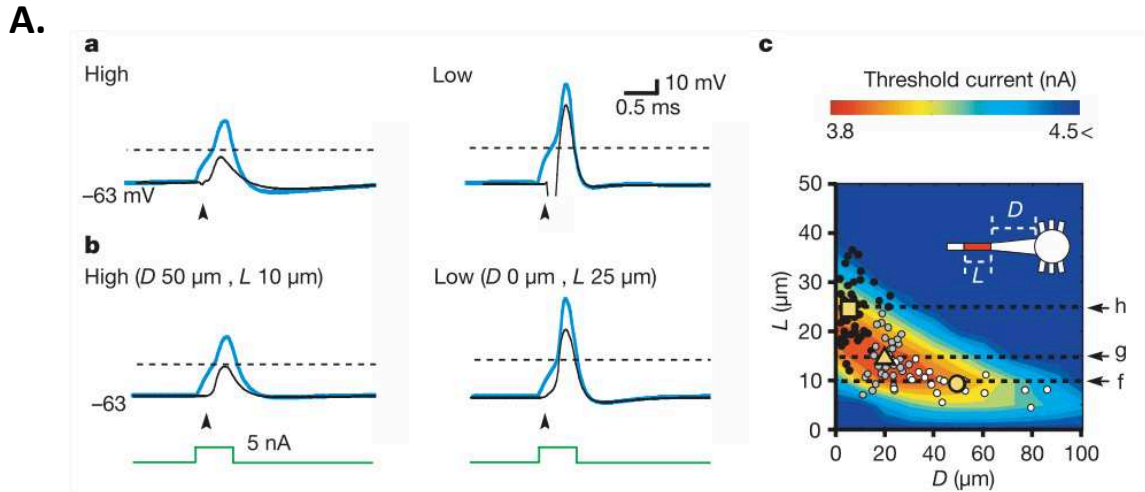


Figure 13. Un impact variable des caractéristiques du segment initial de l'axone sur le seuil du PA.

A. L'excitabilité est accrue lorsque la longueur du SIA ou la distance soma-SIA est augmentée. Les PAs enregistrés (a) ou simulés (b) de manière orthodromique (bleu) ou antidromique (noir) avec le seuil indiqué en pointillé. A gauche, un neurone intégrant des hautes fréquences, à droite un neurone intégrant des basses fréquences. (c) Modèle *Heat map* du seuil de courant du PA, superposé au graphique de la longueur L en fonction de la distance D du SIA obtenu d'après les données expérimentales. Les différents points représentent les données pour les neurones intégrant les fréquences hautes (noir), moyennes (gris) et basses (blanc); les symboles en jaune sont les moyennes. Le seuil de courant augmente avec la distance et la longueur du SIA jusqu'à une valeur maximale, puis diminue. D'après [Kuba et al., 2006](#)

B. Une plus faible excitabilité est associée à une position distale du SIA. A gauche, immunohistochimie sur des neurones contrôles, remplis à la biocytine et marqués à l'ankG : en haut, un neurone avec un SIA proximal et en bas, distal. Au centre, protocole de stimulation, montrant les traces de potentiel obtenues avec des créneaux de courant de 500 ms. A droite, graphe représentant le nombre de PAs obtenus en fonction de la densité de courant. D'après [Grubb & Burrone, 2010](#).

Bien qu'instructif, l'entremêlement du nombre de paramètres en jeux pouvant chacun avoir un effet différent sur l'excitabilité (la distance au soma, la longueur du SIA, la densité des canaux $Na_v1.6$, l'axone émergeant du soma ou d'une dendrite, ou encore les propriétés passives du neurone comme la résistance d'entrée) font de ces études caractérisant la morphologie du neurone une approche maladroite si l'on veut comprendre les paramètres sous-tendant l'excitabilité.

D'autres études ont analysé les effets du déplacement du SIA suite à différents protocoles de stimulation (Evans et al., 2013; Grubb & Burrone, 2010; Hatch, Mendis, Kaila, Reid, & Petrou, 2017; Lezmy et al., 2017; Muir & Kittler, 2014; Wefelmeyer, Cattaert, & Burrone, 2015). De manière intéressante, tous ces protocoles induisent une relocation distale du SIA, corrélée avec une diminution de l'excitabilité intrinsèque du neurone. La relocation du SIA semble avoir un rôle clé sur la régulation de l'excitabilité intrinsèque du neurone.

Toutefois, il faut rester prudent quant à la causalité de ce paramètre sur l'excitabilité. Ici encore, plusieurs autres paramètres pourraient troubler ces interprétations. Par exemple, la régulation des canaux potassium K_v1 et K_v7 , et sodium $Na_v1.6$, la longueur du SIA, la phosphorylation des canaux Na_v , ou la présence de synapses en amont du SIA (Kole & Brette, 2018).

IV. PROBLEMATIQUES DE LA THESE : QUELS SONT LES DETERMINANTS DU SEUIL DU POTENTIEL D'ACTION ?

A. Le rôle de la résistance axiale

Le seuil du potentiel d'action est très variable, mais à ce jour, aucune explication valide n'est capable d'expliquer un tel phénomène. En effet, les modèles théoriques actuels ne permettent d'expliquer qu'une partie (40-60%) de la variance du seuil, et ceci, par le biais des propriétés des canaux sensibles au potentiel (Yu et al., 2008). Une telle inconsistance a poussé la recherche plus loin, pour trouver d'autres paramètres à même d'expliquer cette lacune. De récentes études se sont penchées sur le mécanisme d'initiation du PA, et notamment sa forme à l'initiation, très rapide, exhibant un *kink* à l'initiation, caractéristique souvent absente des modèles théoriques issu du formalisme de Hodgkin & Huxley (Brette, 2013; Naundorf et al., 2006; Yu et al., 2008). Cette observation marquante n'est pas retrouvée dans la forme du PA lors de sa génération dans le SIA. Il semblerait donc que le couplage soma-axone à l'initiation ne soit pas entièrement compris, et bien que plusieurs hypothèses aient été proposées, aucune n'a été confirmée expérimentalement.

Nous nous sommes intéressés à l'une de ces hypothèses, supportée par la *théorie du couplage résistif* entre le compartiment somatodendritique et l'axone, qui accorde un rôle majeur à la résistance axiale entre ces deux compartiments (Brette, 2013; Telenczuk et al., 2017).

Dans les études théoriques, la résistance axiale a une influence considérable sur l'excitabilité du neurone. Ce nouveau paramètre émerge suite à d'anciennes études théoriques, qui caractérisent l'axone d'un point de vue biophysique, comme un compartiment isolé électriquement (Baranauskas & Martina, 2006; Kuba et al., 2006; Mainen et al., 1995; Moore et al., 1983; Platkiewicz & Brette, 2010). En effet, l'axone ne reçoit pas (ou peu) d'entrées synaptiques, et sa dépolarisation est directement reliée à celle du soma qui intègre les entrées synaptiques de tout le compartiment somatodendritique.

En considérant un modèle de neurone simplifié représentant spécifiquement le couplage soma – axone, et issu du formalisme HH, Brette et ses collègues montrent que la résistance axiale est un paramètre qui a été sous-estimé, et qui pourrait influencer l'excitabilité du neurone, mais également permettre d'expliquer le *kink* du PA somatique. En

effet, la simple position du SIA au sein du neurone suffirait à prévoir la pente abrupte du PA au soma (Brette, 2013).

La résistance axiale est étroitement liée à la morphologie du neurone et pourrait avoir un rôle dans la manière dont les neurones intègrent les signaux entrants, au niveau du soma, mais également au niveau dendritique, pour les axones émergeant d'une branche dendritique.

Dans les faits, la résistance axiale est positivement proportionnelle à la distance du SIA, et inversement proportionnelle au diamètre du tronc axonal. Bien qu'il soit possible d'étudier ces paramètres dans les neurones, via de simples observations morphologiques, puis de les comparer au schéma d'excitabilité du neurone, aucune étude expérimentale n'a pu clairement prouver le rôle de la résistance axiale sur l'excitabilité. Plutôt, les nombreuses études ont mis en évidence des effets variables de la position du SIA sur l'excitabilité, et aucun consensus clair n'est apparu. La raison principale tient au fait que les populations de neurones, en tant que système biologique, sont très variables, notamment dans la position du SIA, sa longueur, et la densité de canaux sodium qui y sont présent, et qui, eux, aussi, impactent directement l'excitabilité (Kole & Brette, 2018).

Ainsi, jusqu'à présent, aucune étude expérimentale directe n'a encore été fournie pour montrer que la résistance axiale est capable d'affecter l'excitabilité neuronale.

Le 1^{er} objectif de cette thèse a été de savoir quel est l'impact de la résistance axiale sur le seuil du potentiel d'action dans les neurones pyramidaux L5.

De manière originale, nous avons sélectionnés consciencieusement 2 paramètres qui pourraient la faire varier : le diamètre du tronc axonal et la résistivité intracellulaire.

Dans cette première étude, nous montrons que réduire le diamètre du tronc axonal, en le pinçant à l'aide de 2 pipettes extracellulaires, diminue considérablement le seuil du PA dans 7/14 neurones. De plus, diminuer la résistivité intracellulaire, en remplaçant un ion à mobilité réduite (le gluconate) par un ion à forte mobilité (le chlore), dans la solution intracellulaire élève le seuil du PA. Ces deux effets, prédits par la théorie, permettent de confirmer pour la première fois de manière claire, que la résistance axiale impacte l'excitabilité du neurone.

B. Le rôle des canaux sodium et potassium Kv1

L'étude de la dynamique du potentiel d'action révèle un fort couplage entre le compartiment somatodendritique et l'axone à l'initiation. Sur le tracé du PA somatique, la dérivée du potentiel en fonction du temps fait apparaître en premier lieu une composante IS, issue de l'invasion du courant axonal dans le soma, et à partir de laquelle le seuil du PA est communément défini.

Le seuil de voltage du PA, n'est pas une valeur fixe, mais au contraire, est très variable *in vivo* et *in vitro*, montrant des variations de plus de 10 mV en fonction du potentiel (Azouz & Gray, 2000; Hu et al., 2009). Les facteurs impliqués dans la variance du seuil du PA sont nombreux. Il a été démontré que le seuil dépend du potentiel de membrane précédant le PA, de l'historique des dépolarisations, de la pente de dépolarisation, et du bruit synaptique. De manière intéressante, ces paramètres sont une résultante des conductances en jeu à des potentiels sous-liminaire, car elles dépendent elles-mêmes étroitement du potentiel de la membrane.

La première conductance concernée est la conductance sodium axonale, un facteur clé de l'excitabilité, responsable de la génération du PA au SIA, et qui contrôlerait précisément le seuil du PA au soma. Malgré cette évidence, l'excitabilité du neurone et le rôle du couplage électrique entre le soma et l'axone sur le seuil est encore mal comprise. La théorie montre que le potentiel de membrane contrôle non seulement l'ouverture des canaux sodium, mais également leur taux d'inactivation, qui impacterait directement la valeur de la conductance sodium axonale disponible. En outre, des travaux théoriques ont déjà montré que l'inactivation des canaux sodium avait un rôle central dans le contrôle du seuil du potentiel d'action (Platkiewicz & Brette, 2011). Nombre d'études expérimentales font également appel à cet argument pour expliquer les variations d'excitabilité du neurone, ainsi que son adaptation face aux entrées synaptiques reçues (Fontaine et al., 2014; Kuba & Ohmori, 2009). Face à l'intérêt majeur de l'inactivation des canaux sodium, les études qui montrent un lien clair entre ce paramètre et l'excitabilité du neurone sont pourtant manquantes. Une des raisons à cela, est que l'inactivation des canaux sodium, ainsi que leur ouverture, contrôlent simultanément la conductance sodium. Une étude permettant d'établir leur impact respectif sur l'excitabilité est donc nécessaire.

Une deuxième conductance affectant l'excitabilité neuronale est la conductance potassium portée par les canaux K_v1 , et à l'origine du courant I_D (Higgs & Spain, 2011; Storm, 1988). Ce courant hyperpolarisant est connu pour réduire l'excitabilité du neurone et relever le seuil du PA. Son ouverture aux potentiels sous-liminaire et sa présence au SIA en fait un acteur incontournable dans la régulation de l'excitabilité du neurone. Les observations du courant I_D sur l'excitabilité sont nombreuses, cependant aucune étude n'a permis de caractériser de manière précise son interaction avec les canaux sodium à l'initiation du PA.

Dans la 2^{ème} partie de cette thèse, nous nous sommes intéressés à la relation entre les propriétés des canaux sodium et potassium K_v1 sur le seuil du PA dans les neurones pyramidaux L5.

Pour cela, nous nous sommes lancés dans une étude rigoureuse et exhaustive des paramètres affectant la conductance sodium ainsi que le taux d'inactivation des canaux sodium et avons étudié leurs effets sur le seuil du PA. Puis, pour aller plus loin, nous avons étudié les effets combinés des canaux sodium et potassium K_v1 sur le seuil du PA.

Une réduction de la conductance sodium, via l'application de faibles concentrations de TTX, rehausse considérablement le seuil. De même, diminuer le courant sodium, en réduisant le Na^+ dans la solution extracellulaire, élève le seuil du PA. Nous confirmons ici que la conductance sodium est un facteur clé de l'excitabilité.

Ensuite, grâce à des variations de potentiel, nous avons fait varier le taux d'inactivation des canaux sodium, et montrons que le seuil du PA est directement corrélé au potentiel de membrane précédant le PA. Dans ces conditions expérimentales, réduire la conductance sodium par de faibles concentrations de TTX, ou bloquer la conductance potassium K_v1 par l'application de DTx, relève ou diminue respectivement le seuil du PA, sans toutefois changer son évolution en fonction potentiel. A savoir, l'effet de la TTX ou de la DTx sont indépendants du potentiel dans nos conditions expérimentales. Ainsi, nous montrons que l'inactivation des canaux sodium est un fort prédicteur du seuil du potentiel d'action.

Ceci est confirmé par une étude entre le seuil du PA et sa latence, faisant varier par là-même la pente de dépolarisation et donc l'ouverture et l'inactivation des canaux sodium. Nous montrons qu'une latence longue (50 ms) élève le seuil du PA par rapport à une latence courte (10 ms). Aussi, bloquer la conductance potassium K_v1 diminue le seuil du PA à une

latence longue, mais ne montre pas d'effet à une latence courte. Cet effet réapparaît cependant suite à l'application de faibles concentrations de TTX. Nous montrons que le courant I_D n'a pas d'impact sur le seuil, à une courte latence, car il est masqué par un fort courant sodium. Au contraire, pour une latence longue, il réduit l'excitabilité, du fait d'une conductance sodium réduite. Aussi, pour une latence longue, l'application simultanée de DTx et TTX confirme que leurs effets respectifs sont indépendants du potentiel, et n'entrent pas en compétition.

Matériels & Méthodes

A. Procédures expérimentales

1. Préparation des tranches aiguës du néocortex de rat

Toutes les expériences ont été menées en respectant les recommandations institutionnelles et européennes pour le soin et l'usage des animaux, et ont été autorisées par les autorités locales de santé (D13055-08, Préfecture des Bouches du Rhône).

Les tranches aiguës de néocortex de rat ont été obtenues à partir de rats Wistar âgés de 14 à 23 jours, sans considération pour le sexe. Après décapitation, le cerveau est extrait par une dissection rapide, puis plongé dans une **solution de coupe**, oxygénée avec du carbogène à 95% O₂-5% CO₂, pH 7.4 et refroidie à 0°C contenant (en mM) : 92 *n*-méthyl-D-glutamine (**NMDG**), 30 NaHCO₃, 25 D-glucose, 10 MgCl₂, 2.5 KCl, 0.5 CaCl₂, 1.2 NaH₂PO₄, 20 HEPES, 5 sodium ascorbate, 2 thiourea and 3 sodium pyruvate. Après séparation des 2 hémisphères au scalpel, deux coupes coronales sont effectuées à l'avant et l'arrière du cerveau pour faciliter la fixation des hémisphères sur la platine glacée. Les tissus sont collés dorsalement sur la platine et placés dans la chambre de coupe du trancheur (Leica VT1200S), remplie de solution de coupe, oxygénée et refroidie. La procédure de coupe a été optimisée pour obtenir des tranches aiguës (épaisseur, 350 µm) de bonne qualité : la solution de coupe est oxygénée 20 minutes avant la procédure de tranchage, la lame de rasoir est nettoyée à l'alcool, la position de la lame de rasoir est réglée via un programme spécifique au trancheur pour être positionnée horizontalement à la surface du cerveau, et la vitesse de tranchage est minimale (0.07-0.09 mm/s). Dès que les tranches sont libérées dans la chambre de coupe, elles sont transvasées pour récupération (pendant 25 min) dans une solution de coupe chauffée à 33°C. Les tranches sont ensuite transférées dans un bécher de **solution saline Ringer** à température ambiante (20-25°C) contenant (en mM) : 125 NaCl, 26 NaHCO₃, 3 CaCl₂, 2.5 KCl, 2 MgCl₂, 0.8 NaH₂PO₄ and 10 D-glucose, et équilibrée avec 95% O₂-5% CO₂. Les tranches aiguës obtenues peuvent reposer pendant plusieurs heures (max 5-7h) dans cette solution saline avant d'être placée dans une chambre d'enregistrement (Luigs & Neumann, Ratingen, Germany) immergée, montée sous un microscope (Olympus BX51WI or Zeiss Axio-Examiner Z1), et soumis à un flux continu de solution saline Ringer, oxygénée à 95% O₂-5% CO₂, et chauffée à une température de 33°C.

2. Visualisation et identification des neurones pyramidaux L5

Les neurones pyramidaux de la couche 5 du néocortex (**L5**) ont été visualisés par vidéo-microscopie infrarouge ou par une oculaire optique à un zoom de 40x ou 60x, et identifiés par leur forme pyramidale caractéristique et leur taille supérieure (~ 2) aux neurones pyramidaux des couches adjacentes du néocortex. Enfin, le schéma de dépolarisation du neurone a également été vérifié afin d'écartier les éventuels enregistrements d'interneurones: le potentiel de repos des neurones pyramidaux L5 est d'environ -65 mV (sans compensation du potentiel de jonction liquide), l'amplitude du PA au-delà de 0 mV est de l'ordre de 30-40 mV, l'hyperpolarisation consécutive au PA (AHP) est faible.

3. Caractérisation des axones

Lors des expériences de pincements d'axone, la morphologie du neurone est révélée par une sonde fluorescente, l'Alexa 488. Pour cela, l'Alexa 488 (50 μ M) est ajouté à la solution intracellulaire de patch et diffuse dans le neurone pendant 10-15 min avant d'être visualisée par microscopie confocale (Zeiss, LSM-710, 40x) grâce à une excitation au laser de longueur d'onde 488 nm. L'axone est identifié visuellement comme un prolongement droit, fin, et sans épines, émergeant à partir du soma du côté basal du neurone, et pouvant posséder un *bleb*, une cicatrisation de l'axone visible à la surface de la tranche, occasionné par une coupure lors du processus de tranchage, et caractérisé par un gonflement de la membrane de forme arrondi, et de diamètre supérieur à celui de l'axone (3-6 μ m, pour les cellules pyramidales, [Hu & Shu, 2012](#)). Dès les premiers essais, l'axe de coupe des tranches a été revu pour éliminer la présence de coupures d'axones à une distance inférieure à 70 μ m. De manière étonnante, les neurones avec des axones tronqués (à 30-35 μ m) durant la procédure de coupe n'ont montré aucun signe de dommages, et mieux encore, ont une forme de PA semblable aux neurones avec un axone entier (données non incluses). Par acquis de conscience, nous avons tout de même écarté ces données. Notons qu'en présence d'une solution de coupe contenant du NMDG, la récupération des neurones est telle que le *bleb* est parfois absent.

Mentionnons également que les neurones où l'axone émerge d'une dendrite ont été scrupuleusement ignorés, par simplicité, car l'identification visuelle de l'axone dans ces conditions est plus incertaine et confuse, du fait de la présence de ramifications dendritiques épineuses à la base du tronc axonal.

B. Enregistrements électrophysiologiques

Les enregistrements en configuration cellule entière ont été réalisés sur les neurones pyramidaux L5. Sauf indiqué, les enregistrements sont effectués en présence d'une solution extracellulaire Ringer (composition détaillée précédemment) et grâce à des pipettes de patch en verre borosilicatées (4-8 M Ω) (Harvard Apparatus 30-0057 : 1.5 OD * 0.86 ID * 100 L (mm)) remplie d'une solution intracellulaire contenant (en mM) : 115 K-Gluconate, 20 KCl, 10 HEPES, 0.5 EGTA, 2 MgCl₂, 2 Na₂ATP and 0.3 NaGTP (pH=7.4). La transmission synaptique est bloquée par la présence de kynurénate (200-400 μ M) et de picrotoxine (100 μ M) dans le bain extracellulaire, pour limiter les variations de potentiel de membrane. Pour bloquer partiellement les canaux sodium, l'application de tétrodotoxine (**TTX**) dans le milieu extracellulaire a été réalisée par dilution dans la solution Ringer. Pour bloquer les canaux potassium K_v1, les dendrotoxines K (**DTx-K**, spécifique des K_v1.1) et I (**DTx-I**, spécifique des K_v1.1, 1.2 et 1.6) ont été appliquées (100 μ M) de manière aiguë dans la chambre d'enregistrement, après arrêt des pompes; une fois fixées (~ 5 min max.), ces toxines ne se rincent pas et les pompes sont rallumées.

Les neurones ont été enregistrés en courant imposé avec un amplificateur Multiclamp (700B, *Axon Instruments, Molecular Devices*) et ont été maintenus à leur potentiel de repos (-65 mV, sans la correction du potentiel de jonction) pendant toute la durée des expériences. Les signaux ont été filtrés à 10 kHz, au lieu des 3 kHz habituels, pour éviter le filtrage des signaux sodium rapides; et l'acquisition a été effectuée à 50 kHz (pClamp10, *Axon Instruments*) pour permettre une bonne résolution du signal à l'initiation du PA. En outre, les premiers essais d'acquisition à 10 kHz se sont montrés insuffisants pour retracer correctement une courbe lisse et continue sur le *phase plot*, au voisinage du seuil du PA. La résistance d'accès a été mesurée par l'injection d'un petit courant hyperpolarisant, et les neurones présentant une forte résistance d'accès (> 25-30 M Ω) ont été délaissés.

C. Protocoles expérimentaux

1. Protocoles et contrôle du *timing* du PA

Dans la plupart des expériences, un simple protocole d'injection de courant sur 10 ms ou 50 ms a été utilisé pour éliciter un PA (*sweep* de 1 s max.) et a été répété toutes les 5 ou 10 s; les PAs étant émis avec des latences de 4 à 10 ms ou 35 à 50 ms, respectivement. Pour l'expérience où nous avons voulu inactiver les Na_v en fonction du potentiel, un long créneau de courant (200 à 400 ms) a été injecté pour stabiliser le potentiel avant d'induire un PA par un court créneau de courant (1.5 à 2.5 ms).

Dans toutes nos expériences, nous avons choisi de contrôler la latence (ou *timing*) du PA pour étudier l'excitabilité du neurone. En effet, entre chaque condition, nous avons comparé l'excitabilité du neurone à un *timing* identique (à max. ~ 1.5 ms d'écart). Ce paramètre peut paraître anodin lorsque l'on étudie l'excitabilité via la fréquence de PAs émis, mais devient impératif si l'on veut étudier l'excitabilité via le seuil du PA. Notamment, le potentiel, ainsi que les conductances Na_v et K_v1 , impactent fortement le seuil du PA, et peuvent grandement varier en l'espace de quelques millisecondes. Il nous a donc paru juste de comparer les seuils des PAs qui ont été évoqués en un même laps de temps. Pour cela, le créneau de courant pour générer un PA à un temps t a été ajusté au cours de l'expérience.

2. Enregistrement à deux pipettes

Dès que cela s'est révélé possible, nous avons privilégié les enregistrements électrophysiologiques à 2 pipettes. Cette méthode permet d'utiliser une pipette pour injecter le courant et d'employer l'autre pour enregistrer passivement le potentiel; réduisant ainsi fortement la variabilité des signaux due aux corrections de *bridge*. Le *bridge* est un artefact d'enregistrement dû à l'injection du courant via l'électrode de patch, qui possède une résistance propre et crée une différence de potentiel qui s'ajoute au potentiel du neurone enregistré. Ceci est essentiel car, dans les enregistrements à 1 pipette, la correction du *bridge* influence la valeur de seuil du PA, et surtout, peut évoluer au cours de l'expérience et fausser les variations de seuil obtenues entre plusieurs conditions expérimentales. Avec une attention

	<i>Potentiel d'inversion du sodium (E_{Na^+})</i>				
	93	80	70	60	48
<i>[Na⁺] totale (mM)</i>	152	92.2	62.86	48.85	27.1
<i>[NaCl] (mM)</i>	125	65.2	35.86	21.85	0
<i>[Choline Cl]</i>	0	59.8	89.14	109.15	125
<i>Potentiel de jonction (mV)</i>	-12.2	-13.6	-14.3	-14.2	-15.2

Tableau 2. Substitution du sodium par de la choline dans la solution extracellulaire.

La concentration de Na⁺ totale ([Na⁺] totale) est calculée à partir de l'addition du Na⁺ contenu dans l'ensemble des composés de la solution extracellulaire (Na₂H₂PO₄, NaHCO₃, et NaCl). La diminution du Na⁺ dans le milieu extracellulaire est effectuée par des réductions de la concentration du NaCl, qui est substitué par de la Choline-Cl. Ce changement de composition induit des changements du potentiel de jonction (calculé sur la base d'une solution intracellulaire de patch classique, cf. [Matériels & Méthodes](#)), qui sont répertoriés ci-dessus, et qui ont été compensés au cours de l'expérience.

<i>Solution intracellulaire</i>	<i>contrôle</i>	<i>Concentré Na⁺ (1)</i>	<i>Concentré Na⁺ (2)</i>	<i>Concentré Cl⁻</i>
<i>[Na⁺] totale (mM)</i>	4.3	20	40	4.3
<i>[NaCl] (mM)</i>	0	15.7	35.7	0
<i>[KCl] (mM)</i>	20	0	0	135
<i>[K-Gluconate] (mM)</i>	115	115	95	0
<i>Potentiel d'inversion du sodium (E_{Na^+})</i>	93	53	26	93
<i>Potentiel de jonction (mV)</i>	-12.2	-13.1	-11.8	-2.7

Tableau 3. Calcul du potentiel de jonction pour les différentes solutions de patch utilisées.

Les différentes solutions intracellulaires utilisées diffèrent de la solution intracellulaire de patch contrôle par leur composition en NaCl, KCl, et K-Gluconate, dont les concentrations sont détaillées ci-dessus. La concentration totale ([Na⁺] totale) a été calculée par l'addition du Na⁺ contenu dans le Na₂GTP et le NaGTP. Les potentiels de jonction associés sont calculés sur la base d'une solution extracellulaire Ringer classique (cf. [Matériels & Méthodes](#)).

particulière au contrôle du *bridge*, il est tout de même possible d'acquérir des enregistrements électrophysiologiques de qualité. Nous avons cependant été confrontés aux fortes erreurs de correction du *bridge*, dans les expériences où l'application de la TTX et la baisse d'excitabilité induite, a nécessité l'injection de forts créneaux de courant (>900 pA) pour pouvoir déclencher un PA. Dans ce cas précis, le *bridge* et la capacitance membranaire sont difficilement discernables, et un enregistrement à l'aide de 2 pipettes se révèle pertinent.

Pour y parvenir, deux pipettes remplies d'une même solution intracellulaire et affichant une faible pression positive ont été placées dans la tranche, à proximité du soma d'un neurone. Après une configuration cellule attachée double réalisée successivement avec les deux pipettes, la configuration cellule entière double est effectuée.

3. Modification de la solution intracellulaire et technique de réenregistrement

Dans les expériences où la concentration intracellulaire de chlore est augmentée, les 115 mM de K-Gluconate présent dans la solution de patch sont remplacés par 115 mM de KCl (cf. [Tableau 2](#)), et l'osmolarité est minutieusement contrôlée pour être identique à celle de la solution intracellulaire contrôle. En effet, des variations conséquentes d'osmolarité, par exemple une augmentation, serait susceptible de diminuer la résistivité intracellulaire et d'impacter le facteur de résistance axiale testé dans cette expérience.

Dans les expériences où la concentration intracellulaire de sodium est augmentée, la concentration de Na^+ totale (4.3 mM) est élevée à 20 mM ou 40 mM, par l'ajout de 15.7 mM ou 35.7 mM de NaCl, respectivement (cf. [Tableau 2](#)). Dans ces solutions l'osmolarité est compensée en supprimant le KCl (0 mM), et pour la solution de patch à 40 mM de Na^+ , en diminuant la concentration de K-Gluconate à 95 mM.

Concernant le procédé de l'expérience, un neurone est enregistré avec une solution de patch classique, puis après enregistrement, la pipette est retirée, et le neurone est réenregistré avec une deuxième pipette contenant une solution intracellulaire modifiée. Avant tout enregistrement, 10 min d'attente sont respectées pour permettre l'équilibrage du milieu intracellulaire avec celui de la solution de patch. Pour enlever la pipette du neurone enregistré, celle-ci est éloignée progressivement du neurone à l'aide du micromanipulateur,

à une vitesse minimale à proximité du soma, puis plus rapidement lorsque l'on s'en éloigne. Accélérer le retrait de la pipette permet dans de nombreux cas de distendre un petit bout de membrane, qui s'étire sous forme d'un filament, finissant par se sceller, et de manière spéculative, permettrait de protéger le neurone lors du retrait total de la pipette.

En outre, il a été remarqué que le fait de souffler doucement dans la pipette n'aide pas au succès de la procédure d'enlèvement de la pipette, mais plutôt risque de faire exploser le neurone.

4. Modification de la solution extracellulaire

Pour les expériences où la concentration extracellulaire de Na^+ est diminuée, le NaCl est substitué à du chlorure de choline (**Choline-Cl** ; voir les détails des concentrations utilisées dans le [Tableau 3](#)), la choline étant une molécule inerte n'affectant pas les courants sodium et potassium K_v1 étudiés. Les solutions sont passées successivement dans le bain extracellulaire, et 10-15 minutes d'attente sont respectées à chaque fois pour laisser la tranche aiguë s'équilibrer avec le nouveau milieu. En réalité, lorsque le neurone enregistré est à la surface de la tranche, moins de temps est nécessaire (~10 min) pour que le nouvel équilibre ait lieu.

5. Protocole de pincement et coupure d'axone

Après identification de l'axone, 2 pipettes extracellulaires sont placées, avec précaution, à proximité du tronc axonal. Puis, après avoir acquis les données contrôles, les pipettes sont rapprochées l'une de l'autre jusqu'à ce que leurs pointes se touchent. La manipulation est effectuée sous microscopie confocale en temps réel, permettant de visualiser la position de l'axone, grâce à la fluorescence de l'Alexa 488. Une acquisition d'image est alors effectuée pour afficher la fluorescence précise de l'axone (cf. [Résultats, Papier 1](#)). Des déplacements de pipettes ultérieurs ont pu avoir lieu, si l'axone semblait *passer entre les pipettes* plutôt que d'être pincé.

Notons qu'il semblerait que les pipettes dispersent l'illumination laser, ou deviennent elles-mêmes fluorescentes en se remplissant de solution extracellulaire contenant un peu d'Alexa à proximité du neurone. La diminution de la fluorescence axonale reste donc un indicateur assez médiocre pour estimer le succès du pincement axonal. En outre, certains

neurones ont montré une diminution de fluorescence mais pas de variation d'excitabilité et inversement, ce qui tend à montrer l'incertitude de l'analyse de ce paramètre.

C'est pourquoi, dans notre analyse, nous avons choisi d'étudier les variations de seuil à titre indicatifs sur 10 traces avant et après pincement, sur un test statistique de Mann-Whitney ($p < 0.0002$). Ceci nous a permis d'établir deux groupes de neurones, le premier étant insensible aux pincements effectués, le deuxième affichant en moyenne une diminution d'excitabilité notable.

Les coupures accidentelles d'axones ont eu lieu suite à des pincements trop fermes. Dans ce cas, les neurones sont fortement dépolarisés, et ils ont été laissés en voltage imposé pendant 10-30 minutes pour récupération. L'opportunité s'est parfois présentée d'enregistrer un neurone tout à fait stable (cf. [Résultats, Papier 1](#)).

Notons qu'il n'a pas été possible de retirer les pipettes pour obtenir un enregistrement après le pincement axonal, et vérifier si l'effet obtenu est réversible. La raison principale est que les pipettes bougent légèrement au cours de l'expérience, et l'enregistrement est la plupart du temps arrêté par une perte du patch à ce moment-là.

D. Analyse des données

1. Informations générales

Les données ont été analysées avec Clampfit (10.7, *Axon Instrument*) et avec un logiciel Labview (10, *National Instrument*) que nous avons élaborés sur mesure pour pouvoir extraire différentes caractéristiques sur la dynamique du PA et concevoir notre propre calcul du seuil du PA (cf. [Figure 14](#)). Les données moyennes sont présentées avec les écarts types moyen (**SEM**) et les tests statistiques utilisés sont le test de Mann-Whitney U-test ou le test des rangs signés de Wilcoxon pour échantillons appariés.

Comme mentionné plus haut, les traces analysées ont été comparées à potentiel identique ($\sim 0.5 - 1$ mV d'écart maximum) et un *timing* du PA identique ($\sim 1 - 1.5$ ms d'écart maximum), et ont pour cela été triées et sélectionnées avant toute analyse.

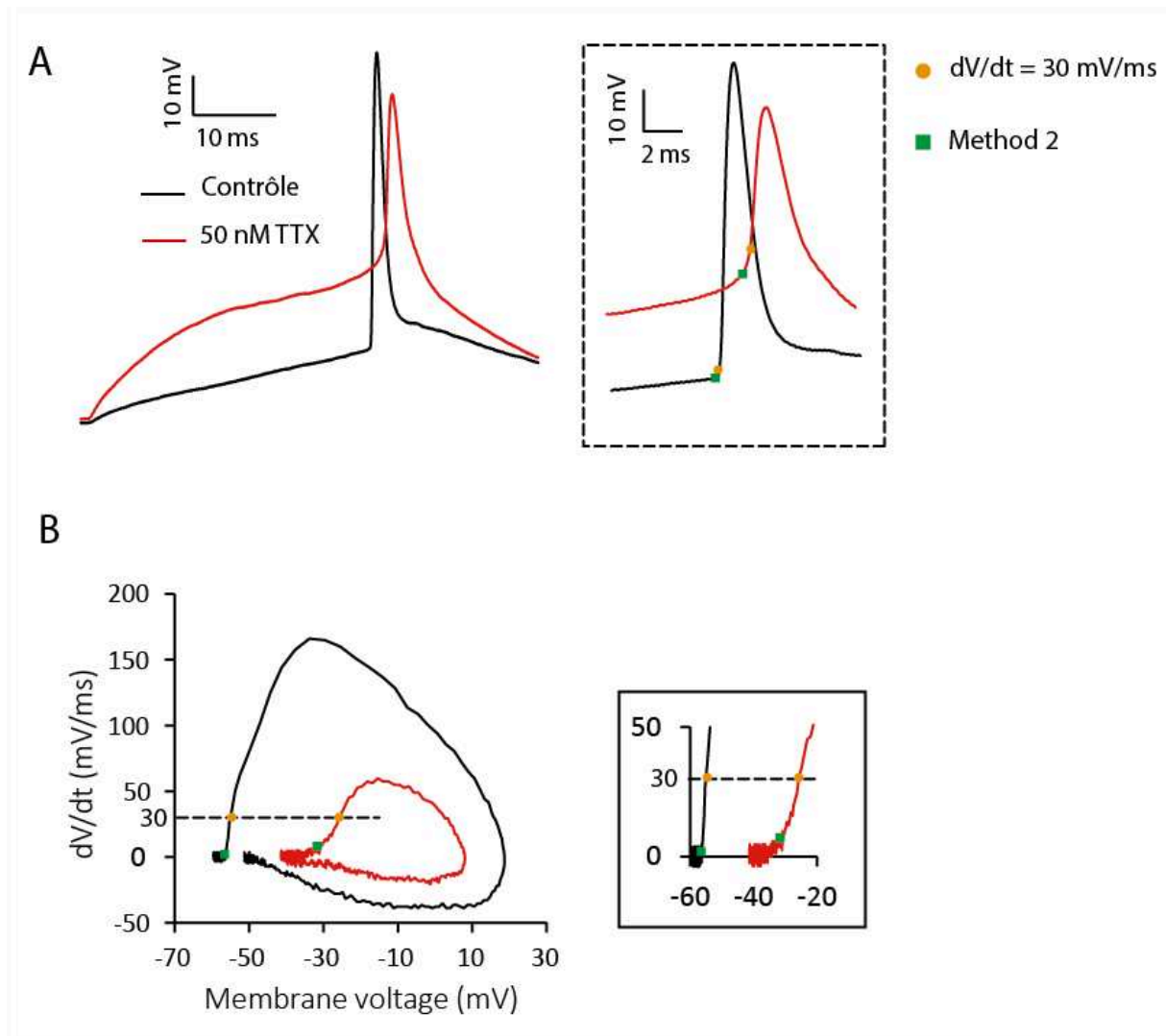


Figure 14. Comparaison de deux méthodes de calcul du seuil du PA.

A. A gauche, deux traces de potentiel obtenues à partir d'un créneau de courant de 50 ms, en condition contrôle et TTX (50 nM). A droite, représentation des seuils déterminés par la méthode classique ($dV/dt = 30 \text{ mV/ms}$, rond orange) et la méthode de seuil que nous avons élaboré (carré vert) **B.** Illustration des seuils obtenus par les deux méthodes sur le *phase plot*. Notons que, pour la condition 50 nM de TTX, la méthode classique n'est pas appropriée pour déterminer le seuil à la pente maximale initiale du *phase plot*, car cette pente est faible.

2. Analyse du seuil du PA

Le seuil du PA peut être facilement mesuré grâce à un critère $dV/dt = 10-50$ mV/ms dans les neurones pyramidaux, car la dynamique du PA (i.e. la vitesse de dépolarisation) à l'initiation est rapide. Cependant, cette méthode s'est révélée infructueuse sur certaines de nos données où l'application de TTX ralentit la dépolarisation initiale. Pour remédier à cela, nous avons élaboré un calcul du seuil du PA via un logiciel programmé en Labview (10, *National Instrument*) permettant de mieux estimer la position du seuil du PA à partir du *phase plot* (cf. Figure 14). Le bruit a été réduit grâce à une courbe polynomiale d'ordre 4 sur le *phase plot*, puis le premier maximum précédent le maximum de dV/dt est déterminé. Ce point représente le moment où dV/dt accélère brusquement et permet de définir correctement le seuil du PA dans toutes nos conditions expérimentales (cf. Figure 14).

3. Compensation du potentiel de jonction liquide

Les différentes modifications des solutions intracellulaires et extracellulaires créent des potentiels de jonction spécifiques à chaque combinaison de solution intracellulaire et extracellulaire (cf. Tableaux 2 et 3). Les valeurs de potentiel de jonction ont été estimées grâce à l'outil de calcul du potentiel de jonction proposé par le logiciel Clampex. Les paramètres utilisés sont : une électrode en argent, une température de 30°C et les molécules renseignées sont : K^+ , Cl^- , Gluconate, EGTA, Mg^{2+} , Na^+ , ATP, Ca^{2+} , $H_2PO_4^{2-}$, HCO_3^- , HEPES. Ces valeurs ont été compensées *a posteriori* pour les expériences où le potentiel de jonction liquide est le même pour toute la durée de l'expérience, ou bien directement via le logiciel pClamp lorsque le potentiel de jonction variait d'une condition à l'autre.

Résultats

- A. Article 1 (en cours) : Action potential threshold is determined by axial resistance in the pre-AIS region**

Action potential threshold is determined by axial resistance in the pre-AIS region

Aurélie Fékété¹, Norbert Ankri¹, Romain Brette² and Dominique Debanne^{1*}

¹ UNIS, UMR 1072 INSERM Aix-Marseille Université, Marseille, France

² Institut de la vision, INSERM, CNRS, Universités Sorbonne, Paris

*corresponding author: dominique.debanne@inserm.fr

Key words: neuronal excitability, sodium current, axon initial segment

18 pages, 5 figures, 3 supplementary figures, 1 supplementary table

Abstract

The position of the axon initial segment (AIS) is thought to play a critical role in neuronal excitability. For instance, the distal shift in AIS position is supposed to attenuate intrinsic excitability by raising the action potential (AP) threshold. Yet, the relocation of the AIS may affect axial resistance (R_a) between the source of sodium current at the AIS and the soma. Theoretical studies indeed suggest that the AP threshold is lowered when R_a increases but no experimental support has been provided so far to this theory. We therefore examined how changes in R_a impact the voltage threshold (V_{th}) of the somatic AP in L5 pyramidal neurons. Increasing R_a by mechanically pinching the axon between the soma and the AIS was found to lower the spike threshold. Conversely, decreasing R_a by replacing a weakly mobile ion (gluconate) by a highly mobile ion (chloride) elevated the spike threshold. All R_a -dependent changes in spike threshold could be reproduced in a Hodgkin-Huxley compartmental model. We conclude that excitability increases with axial resistance in L5 pyramidal neurons indicating that, in contrast to what was thought, a distal shift in the AIS elevates intrinsic excitability.

Introduction

The action potential (AP) measured in the soma displays a sharper onset and a lower voltage threshold than at the initiation site in the axon (Kole and Stuart, 2008; Yu et al., 2008). The sharpness of the spike in the soma was thought to be due to cooperativity among Nav channels (Naundorf et al., 2006) or to backpropagation of the spike to the soma (Yu et al., 2008). But recent theoretical work indicates that rather, the sharpness and the lower spike threshold in the soma both result from the resistive coupling between the axon initial segment (AIS) and the soma (Baranauskas et al., 2013; Brette, 2013; Telenczuk et al., 2017). In fact, at AP initiation, the soma acts as a current sink for axonal sodium current due to its large size and the proximity of the two compartments. The strong axonal sodium current opposes the axial resistance and flows directly into the soma where sodium channels open all at once when the somatic membrane potential exceeds a critical value.

In previous studies, the position of the AIS has been suggested to play a critical role in neuronal excitability. For instance, the shift in AIS position away from the cell body is thought to be associated with a reduced excitability caused by a higher threshold for action potential (AP) generation and a lower rheobase (Grubb and Burrone, 2010). Such relocation of the AIS position may produce important consequences on the electrical properties of the neuron. Among them, AIS shift may elevate the axial resistance (R_a) between the source of current (i.e. the initiation zone near the AIS) and the cell body. Yet, theoretical studies suggest that AP threshold measured in the soma is negatively related to R_a in the pre-AIS region (Brette, 2013). According to the threshold equation, the raise in R_a (i.e. corresponding to a distal move of the AIS) results in a lower spike threshold and thus an elevated excitability (Brette,

2013). However, no experimental support for this theoretical prediction has been provided so far.

We therefore examined how changes in R_a impact the voltage threshold (V_{th}) of the somatic AP in L5 pyramidal neurons. We show here that increasing R_a by mechanically pinching the axon between the soma and the axon initial segment lowered the spike threshold by ~4 mV. Conversely, reducing R_a by replacing a weakly mobile ion (gluconate) by a highly mobile ion (chloride) elevated the spike threshold by ~2 mV. All R_a -dependent changes in spike threshold could be reproduced in a Hodgkin-Huxley compartmental model. These data indicate that R_a in the pre-AIS region negatively determines spike threshold in L5 pyramidal neurons. Thus, our results suggest that in contrast to what was thought, a distal shift in the AIS position along the axon would result in elevated excitation.

Results

Elevating R_a by axon pinching lowers spike threshold

L5 pyramidal neurons were recorded in whole-cell configuration of the patch-clamp technique with a pipette filled with Alexa-488 to visualize the axon. All neurons used in this study had an axon emerging from the cell body (Hamada et al., 2016; Thome et al., 2014). To test the effects of elevated axial resistance, the pre-AIS region of the axon was pinched with the help of two glass micro-electrodes positioned on each side of the axon. In most of the cases, pinching left the axon intact but a clear reduction of the inner axon diameter was observed as a drop of Alexa-488 fluorescence where the pinching occurred (**Suppl. Fig. 1**). Only cells with an axonal length greater than 100 μm and displaying variations in the holding current after pinching that did not exceed ± 70 pA were kept for final analysis.

In half of the cases, axon pinching led to a significant hyperpolarization of the spike threshold by a few millivolts (7/14 cases, comparison of spike threshold over 10 consecutive trials before versus after pinching, Mann-Whitney U-test $p < 0.0002$; **Fig. 1A-B**) and in the other half, no change in the voltage threshold for action potential (7/14 cases; Mann-Whitney U-test, $p > 0.0002$; **Fig. 1C & Suppl. Fig. 2**). The pinching-induced hyperpolarisation of the spike threshold was found to be close to -4 mV (mean: -4.6 ± 1.5 mV, $n = 7$) and could reach ~ -8 mV in 3 cells (**Fig. 1C**). This hyperpolarization of the spike threshold was associated with a reduction in the magnitude of the injected current pulse (from 655 ± 75 to 474 ± 99 pA, $n = 7$, Wilcoxon test, $p < 0.05$; mean: -181 ± 61 pA; **Fig. 1C**), denoting an increase in neuronal excitability. In fact, changes in spike threshold were correlated with the magnitude of the injected current ($R^2 = 0.93$; **Fig. 1D**). These effects were not related to the pinching location nor the axonal length (**Figure Suppl. 3**). Except input resistance, no significant variation in holding current

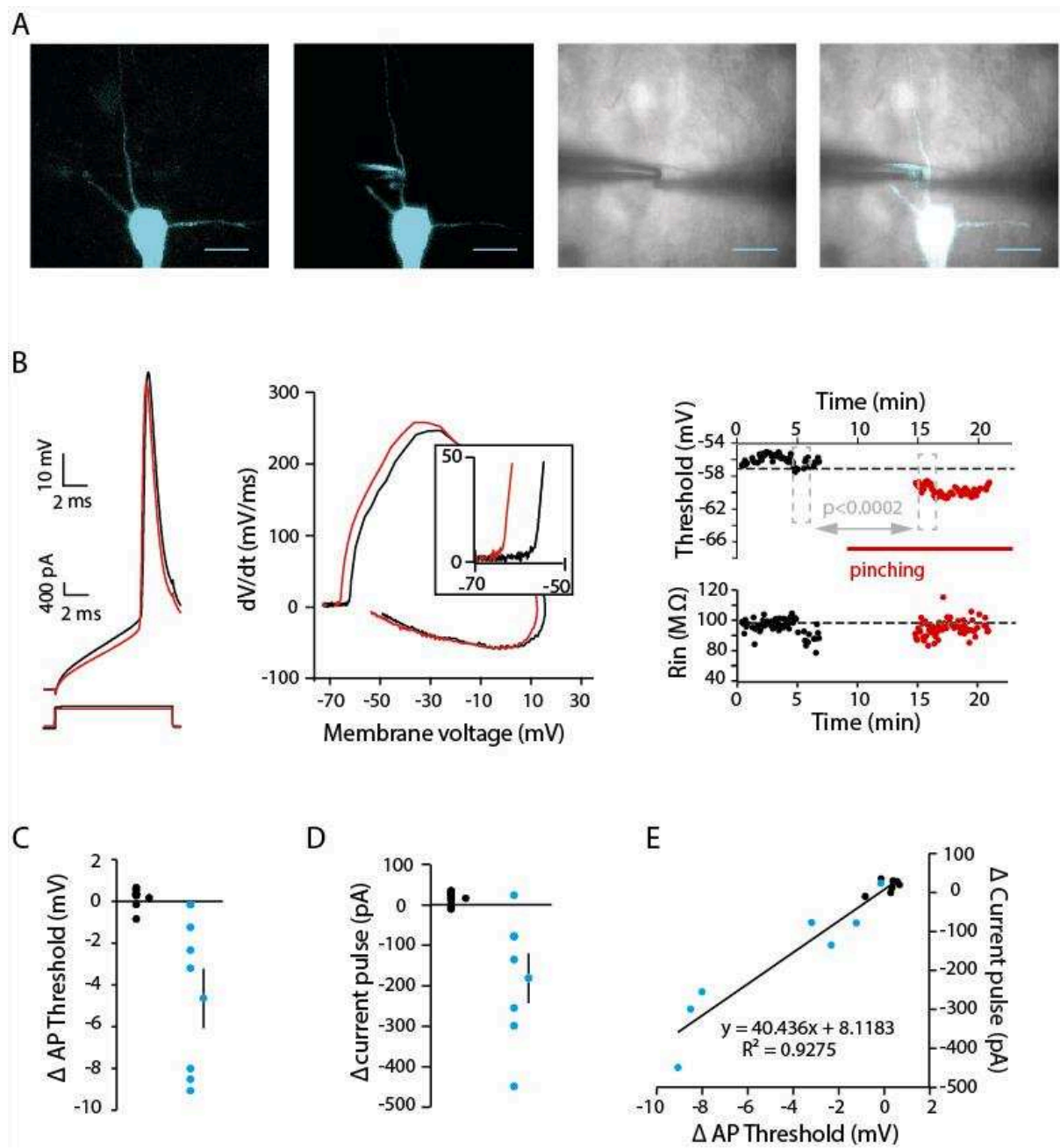


Figure 1. Axon pinching lowers spike threshold.

A. Confocal and IR images of the neuron filled with Alexa 488 and imaged before and during axon pinching. Calibration bar: 20 μm . **B.** Hyperpolarization of the spike threshold during pinching. Left, voltage traces (black, before and red, during pinching). Middle, phase plots. Right, time course of the spike threshold and input resistance (R_{in}). The effect on the spike threshold was tested over 10 traces before and during pinching (here, $p < 0.002$). **C.** Variation in AP threshold. Neurons showing non-significant effect are in black whereas those showing a significant effect are in blue. **D.** Variation in the current pulse used to elicit an AP at constant latency. **E.** Variation in AP threshold were positively correlated with variation in current pulse ($y = 40.44x + 8.12$; $R^2 = 0.93$).

or resting membrane potential induced by pinching was observed between the group exhibiting a significant hyperpolarization of the spike threshold and that exhibiting no change in spike threshold (**Figure Suppl. 3**). Taken together, these results suggest that increasing R_a hyperpolarizes the AP threshold measured in the cell body.

Dissociation of IS and SD components

Theoretical works suggest that the retro-propagated current corresponding to the IS component varies as $1/R_a$ (Hamada et al., 2016). Thus during pinching the current may not be sufficient to trigger a full spike (Michalikova et al., 2017). We examined this question experimentally.

In one cell exhibiting a significant hyperpolarization of the spike threshold, the amplitude of the action potential evoked during pinching was found to be considerably reduced in amplitude (**Fig. 2**). The presence of this spikelet was not due to any damage caused to the neuron. In fact, the holding current was barely unchanged (before pinching: -105 pA after pinching: -45 pA) and a full spike could be recovered when the magnitude of the current step was increased (**Fig. 2C**). This action potential was found to exhibit two different phases clearly visible on the phase plot and identified as the initial segment (IS) component and somatodendritic (SD) component (**Fig. 2C**). Interestingly, the slope of the SD component of the AP near the threshold was found to be much slower (6 ms^{-1}) compared to the slope of the IS component (21 ms^{-1}), suggesting that increasing R_a reveals the dissociation of the IS component (fast event) from the SD component (slower event) of the AP.

In 3 other cases, pinching of the axon accidentally led to ablation of the axon upstream the AIS. This cut was identified by the abrupt interruption of the intra-axonal fluorescence, disappearance of the IS component on the phase plot of the AP, and the

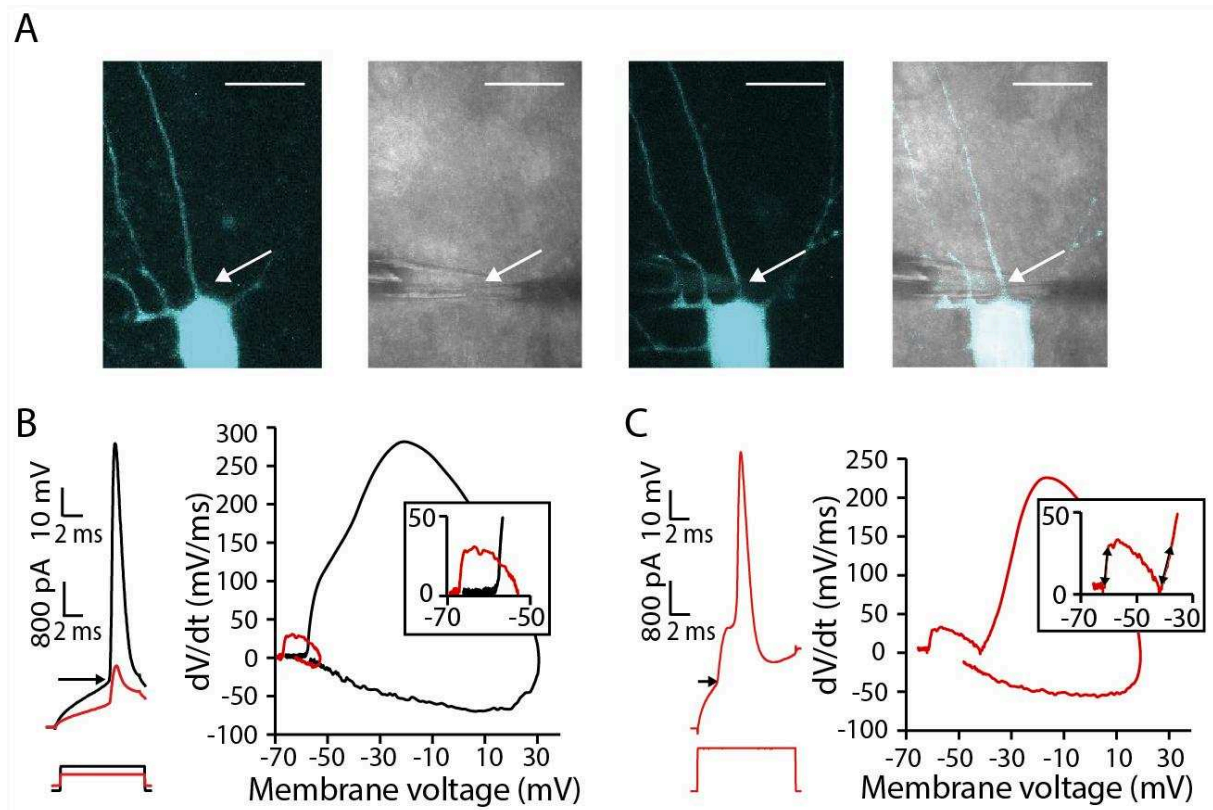


Figure 2. Dissociation of IS from SD component during axon pinching.

A. Confocal and IR images of the neuron before and during axon pinching. Calibration bar: 20 μm **B.** During pinching the spike is hyperpolarized and its amplitude is considerably reduced. The phase plots shows that the spikelet corresponds to isolated IS component. **C.** Increasing current amplitude allows recovery of full spike amplitude that corresponds to the SD component (see phase-plot on the right). Note the difference in slope for the IS component and the SD component in the inset.

depolarization of the spike threshold by ~8 mV (from -59.1 ± 0.6 vs. -51.2 ± 2.3 mV; **Fig. 3**). Interestingly, the acceleration of the spike near the threshold was slower after removal of the AIS (from 37 ± 3 to 14 ± 8 ms⁻¹ **Fig. 3C**), indicating that the kink of the spike near the threshold (i.e. fast rate of depolarization) measured in the soma is due to the electrical coupling between the AIS and the soma.

Lowering R_a by intracellular ion substitution elevates spike threshold

To further demonstrate that R_a critically determines the spike threshold, we decreased the cytoplasm resistance by replacing a poorly mobile ion (gluconate) by a highly mobile ion (chloride). For this purpose, L5 pyramidal neurons were recorded sequentially with two intracellular solutions of different composition: a gluconate-based solution (KGlu = 115 mM & KCl = 20 mM) and a chloride-based solution (KGlu = 0 mM & KCl = 135 mM). Because gluconate ions are about 3 times less mobile compared to chloride ions (relative mobility of Cl⁻: 1.0388, gluconate ion: 0.33 and K⁺: 1), the total mobility for solution 1, (m_1) is 193.7 mM and the total mobility for solution 2 (m_2) is 275.2 mM.

The predicted change in spike threshold is given by: $\Delta\theta = k_a \log \frac{Ra_1}{Ra_2}$. As, R_a is supposed to be inversely proportional to the mobility, one predicts then: $\Delta\theta = k_a \log \frac{m_2}{m_1}$. With $k_a = 6$ mV, $\Delta\theta = 2.1$ mV (the lower threshold is for the condition with the lower mobility, i.e. condition 1).

We next verified experimentally the prediction made by the theory (**Fig. 4A**). When L5 pyramidal cells were patched with a gluconate-based solution and then re-patched with a KCl-based solution, the spike threshold was found to be depolarized by ~2 mV (1.9 ± 0.6 mV; i.e. from -62.3 ± 1.6 to -60.4 ± 2.0 mV, $n = 6$, Wilcoxon test, $p < 0.05$; **Fig. 4B**). No difference in the magnitude of the current pulse was however

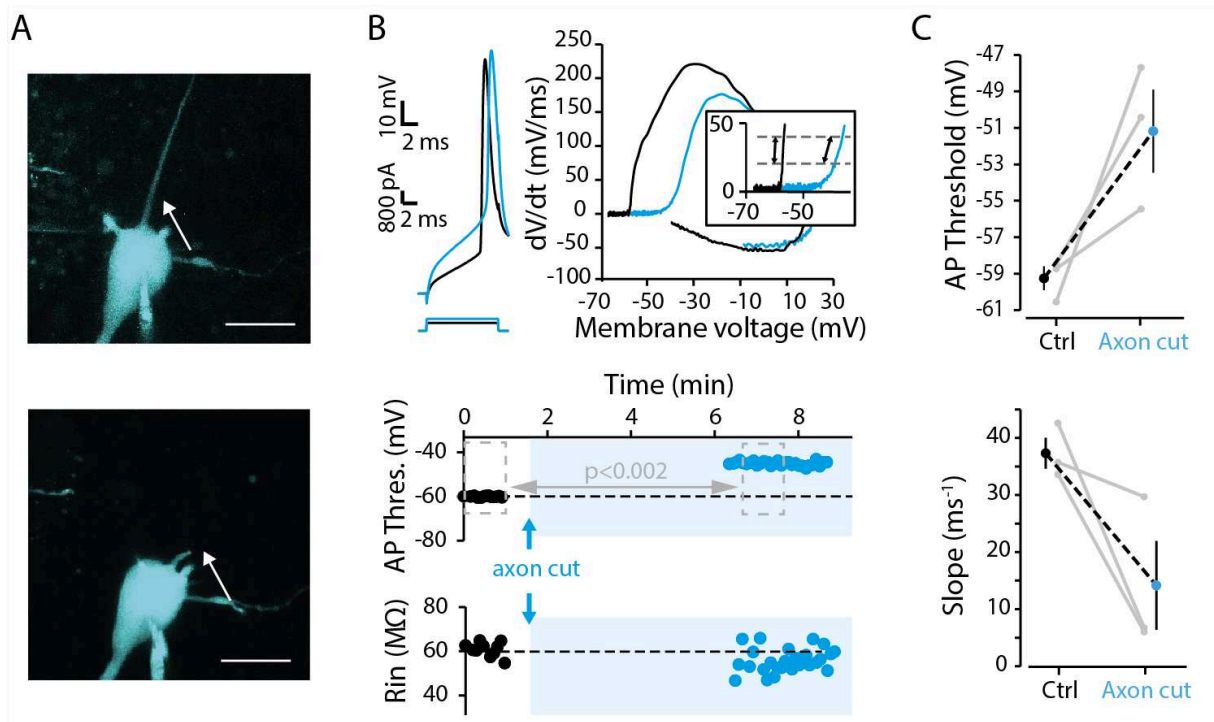


Figure 3. Axon cut upstream the AIS elevates AP threshold.

A. Confocal images of the neuron before and after axon cut upstream the AIS. Note the cut axon (lower image). Calibration bar: 20 μ m. **B.** Depolarization of the AP threshold. Top left, voltage traces (black before, blue after axon cut). Top right, phase plots. Note the difference in the slope in each case. Bottom, time course of AP threshold and input resistance (R_{in}). **C.** Group data of changes in AP threshold and slope before and after axon cut.

noted after re-patching with KCl-based solution (from 524 ± 74 in K-gluconate to 492 ± 71 pA, $n = 6$). We conclude that lowering R_a by intracellular ion substitution elevates spike threshold in L5 pyramidal neurons.

Computer modelling of R_a change

A Hodgkin-Huxley model of neuron was developed under LabView. The model included a cell body, a dendrite and an axon (**Fig. 5A**). When R_a changed from 11 to 40 M Ω by raising R_i from 150 to 3000 Ω .cm in the pre-AIS region, the AP threshold was found to be hyperpolarized by ~ 4 mV (**Fig. 5B**). Next, we tested the effects of an additional elevation in R_a . As observed experimentally, a large elevation in R_a (here 86 M Ω) isolated the IS component of the spike (**Fig. 5C**). Interestingly, the spike threshold was further hyperpolarized by ~ 1.5 mV (**Fig. 5D**) and the current pulse was reduced (**Fig. 5E**). Thus, the model qualitatively reproduces all the features observed experimentally.

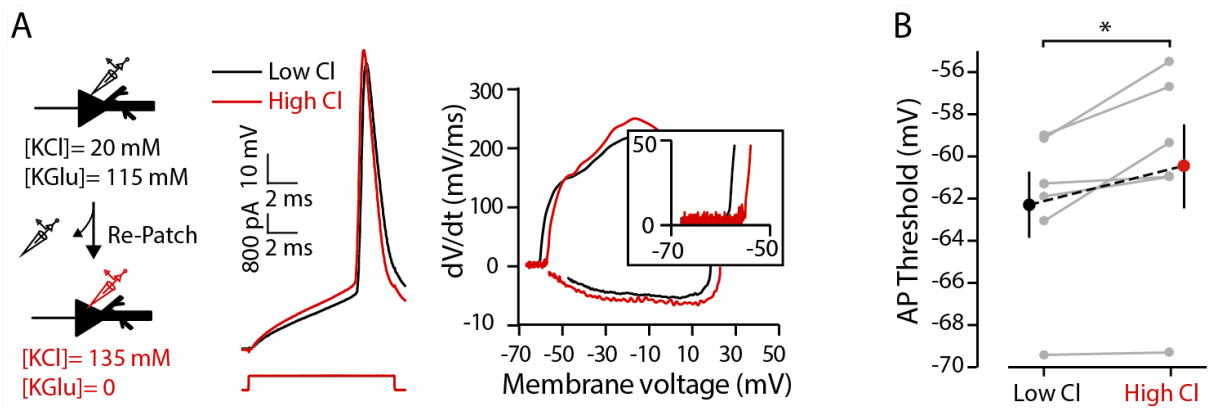


Figure 4. Lowering R_a by intracellular ion substitution elevates spike threshold. **A.** Example of recording a neuron in KClu and KCl. Note the higher spike threshold on the phase-plot. **B.** Group data of AP threshold change (*, Wilcoxon, $p < 0.05$).

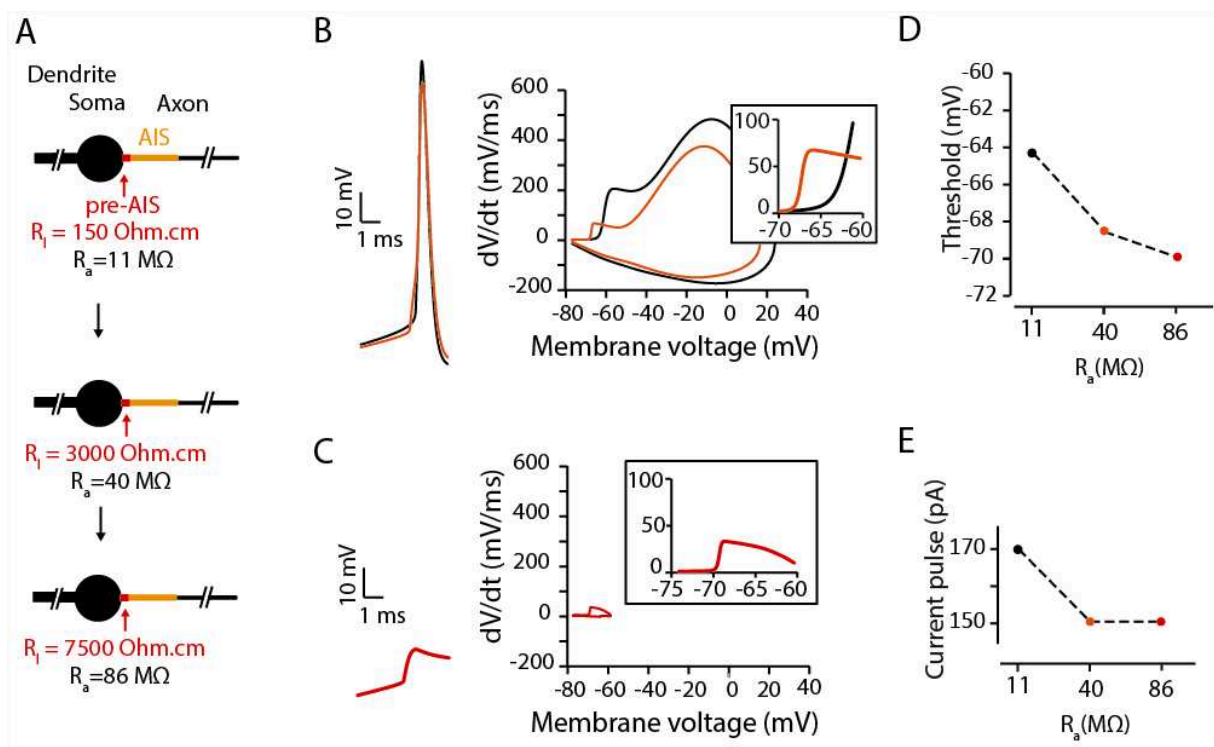


Figure 5. Computer simulation of R_a change. **A.** Structure of the model and different R_a configurations. **B.** When R_a was raised from 11 to 40 $\text{M}\Omega$, the spike threshold was found to be hyperpolarized by $\sim 4 \text{ mV}$ (see phase-plots). **C.** Raising R_a further to 86 $\text{M}\Omega$ isolated the IS component (spikelet) and hyperpolarized further the AP threshold (by 1.5 mV). **D.** Plot of AP threshold as a function of R_a . **E.** Plot of current pulse as a function of R_a .

Discussion

We show here that changes in axial resistance in the pre-AIS part of the axon by axon pinching or by ion substitution impacts the action potential threshold in L5 pyramidal neurons. First, pinching the pre-AIS region was found to hyperpolarize the spike threshold by ~ 4 mV in half of neurons. Because the efficiency of pinching was only visually controlled, the effect was variable from cell to cell. In the remaining cases, either no effect was seen (half of cases) or an elevation of the spike threshold was observed due to axon cut (3 cells). Second, replacing a weakly mobile ion (gluconate) by a highly mobile ion (chloride) depolarized the spike threshold by ~ 2 mV. Finally, a realistic Hodgkin-Huxley compartmental model qualitatively reproduced all the effects observed experimentally. These data suggest that, in contrast to what was believed, the AIS proximity is negatively related to excitability change.

Axon pinching

When the axon was intact after axon pinching, we found that AP threshold was hyperpolarized by ~ 4 mV in a large fraction of the cells. The amplitude of the current that allowed to trigger 1 AP at constant latency was found to be reduced. In fact, the hyperpolarization of the spike threshold was found to be correlated with the reduction of the current pulse, further confirming the increase in excitability when R_a was increased by axon pinching.

In one case of pinching, no full spike was recorded in the cell body but instead a spikelet was triggered by the current pulse. The neuron was not damaged since the holding current was unchanged and a full spike could be still evoked upon increase of current step amplitude. Notably, the slope of the phase plot at the spike threshold was found to be much lower for the full spike than for the spikelet, indicating the dissociation

of IS and SD components of the AP. These spikelets are supposed to result from APs that fail to activate sodium channels in the soma (Michalikova et al., 2017). This behaviour was also observed in the neuron model (Fig. 5). Thus, the scenario of spikelet generation can be reconstituted as follows: axon pinching hyperpolarizes the threshold of the IS spike until a critical value for which the amplitude of the IS spike is too small to activate sodium channels responsible of the SD component and a spikelet is thus induced.

Axon cut

In a few cases (3 cells), axon pinching led to axon cut, leaving the cell body isolated from the AIS. Under these conditions, the spike threshold was found to be elevated by ~8 mV and the spike displayed a smooth onset with no kink. Similar depolarizing shift in the spike threshold has been reported upon blockade of Nav channels with local application of TTX on the AIS (Hu et al., 2009; Palmer and Stuart, 2006). In this case, only somatic Nav channels are functional. The smooth onset of the spike after axon cut is similar to the spike onset recorded near the AIS (Kole and Stuart, 2008; Yu et al., 2008), indicating that after axon cut, the spike is generated in the cell body.

Ion substitution

Substitution of gluconate ions by chloride ions was found to elevate the AP threshold by ~2 mV, a value predicted by the theory based on the mobility of each ion. Thus taken together with the pinching-dependent shift in AP threshold, this confirms the theory that excitability is inversely related to AIS proximity (Brette, 2013).

Revisiting the electrophysiological impact of AIS shift

Our findings contradict the usual idea according to which a distal shift of the AIS away from the soma is associated with a decrease in excitability (Grubb and Burrone, 2010). Two studies report, however, changes in excitability in agreement with our findings (Baranauskas et al., 2013; Lezmy et al., 2017). Baranauskas and co-workers found that moving the AIS away from the soma lowered the spike threshold in a modelled neuron. In the study of Lezmy and co-workers, the AP threshold was found to be hyperpolarized by ~10-15 mV following AIS relocation away from the soma. Thus, in contrast to what is usually thought, distal relocation of the AIS away from the soma is associated with an elevation in intrinsic excitability. The decrease in excitability observed by Grubb & Burrone (2010) may result from the phosphorylation of Nav channels (Evans et al., 2015) or the parallel homeostatic regulation of Kv1 or Kv7 channels (Cudmore et al., 2010; Kirchheim et al., 2013; Kuba et al., 2015). Thus, homeostatic plasticity in the axon will require a complete analysis of many factors in parallel (Kole and Brette, 2018).

Materials and methods

Acute slices of rat neocortex

Neocortical slices (350-400 μm) were obtained from 14- to 20-day-old Wistar rats of both sexes, according to the European and Institutional guidelines (Council Directive 86/609/EEC and French National Research Council and approved by the local health authority (Préfecture des Bouches-du-Rhône, Marseille)). Rats were deeply anesthetized with chloral hydrate (intraperitoneal, 200 mg/kg) and killed by decapitation. Slices were cut in an ice-cold solution containing (mM): 92 *n*-methyl-D-glutamine (NMDG), 30 NaHCO_3 , 25 D-glucose, 10 MgCl_2 , 2.5 KCl, 0.5 CaCl_2 , 1.2 NaH_2PO_4 , 20 HEPES, 5 sodium ascorbate, 2 thiourea and 3 sodium pyruvate, and were bubbled with 95% O_2 -5% CO_2 , pH 7.4. Slices recovered (1 h) in a solution containing: 125 NaCl, 26 NaHCO_3 , 3 CaCl_2 , 2.5 KCl, 2 MgCl_2 , 0.8 NaH_2PO_4 and 10 D-glucose, and were equilibrated with 95% O_2 -5% CO_2 . Each slice was transferred to a submerged chamber mounted on an upright microscope (Olympus BX51WI or Zeiss Axio-Examiner Z1) and neurons were visualized using differential interference contrast infrared videomicroscopy.

Electrophysiological recordings and analysis

Whole-cell recordings from L5 pyramidal neurons were obtained as previously described (Boudkkazi et al., 2007). The external saline contained (in mM): 125 NaCl, 26 NaHCO_3 , 3 CaCl_2 , 2.5 KCl, 2 MgCl_2 , 0.8 NaH_2PO_4 and 10 D-glucose, and was equilibrated with 95% O_2 -5% CO_2 . Patch pipettes (5-10 $\text{M}\Omega$) were pulled from borosilicate glass and filled with an intracellular solution containing (in mM): 115 K gluconate, 20 KCl, 10 HEPES, 0.5 EGTA, 2 MgCl_2 , 2 Na_2ATP and 0.3 NaGTP (pH=7.4). In experiments where the same neuron was re-patched with a KCl-

containing solution, KCl replaced K gluconate ([K gluconate] = 0 mM and [KCl] = 135 mM). Recordings were performed with a MultiClamp-700B (Molecular Devices) at 30°C in a temperature-controlled recording chamber (Luigs & Neumann, Ratingen, Germany). The membrane potential was corrected for the liquid junction potential (-12.2 mV for gluconate-based solution and -2.7 mV for KCl-based solution). Neurons were held at their resting membrane potential (approximately -77 mV). Voltage signals were low-pass filtered (10 kHz), and sequences (200-500 ms) were acquired at 50 kHz with pClamp 10 (Axon Instruments, Molecular Devices). Electrophysiological signals were analyzed with ClampFit (Axon Instruments). Pooled data are represented as mean \pm se in all figures, and we used the Mann-Whitney U-test or Wilcoxon rank-signed test for statistical comparison. Spikes were evoked by a short (10 ms) current pulse (500-800 pA). The latency of the spike was maintained approximately constant before and after axon pinching or axon cut. For this purpose, the amplitude of the current step was adjusted.

The AP threshold was determined on the spike phase-plot with a custom-made software programmed in LabView. Recording noise was reduced by smoothing the phase-plot with a polynomial of order 4. Then, the first maximum of dV/dt was determined starting from the maximal dV/dt value and going backward. This point defined the beginning of the upstroke of the phase-plot.

Axon pinching and cutting under confocal imaging

To visualize the morphology of L5 pyramidal neurons, Alexa-488 (50 μ M) was added to pipette solution and was let to diffuse for at least 10-15 minutes before imaging the axon with a confocal microscope Zeiss (LSM-710) (Rama et al., 2017). Alexa 488 was excited by a laser source at 488 nm. The axon was identified as a thin, aspiny process

emerging from the soma or a proximal dendrite at the basal pole of the neuron. Two electrodes were positioned on each side of the axon. To pinch the axon, the two electrodes were gently moved towards each other (Bekkers and Hausser, 2007). The efficacy of pinching was evaluated by visualizing the decrease in fluorescence at the pinched axon. In a few cases, fluorescence was measured with the use of ImageJ (NIH, USA). In a few cases, pinching the axon led to axon cut. In this case, the cut axon was identified by the abrupt disappearance of Alexa fluorescence.

Hodgkin-Huxley modeling

Computer simulations were performed with LabView 10. The simplified morphology of a L5 pyramidal neuron included dendrite, soma, pre-AIS, AIS and axon. The diameter, length and number of sub-compartment in each neuronal element are provided in **Supplementary Table 1**. The membrane capacitance (C_m) was set to $0.7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ uniformly throughout all compartments. Axial resistance was set to $100 \Omega\cdot\text{cm}$ in the dendrite, and $150 \Omega\cdot\text{cm}$ in the other compartments.

The voltage dependence of activation and inactivation of a Hodgkin-Huxley based conductance model (g_{Na} , g_{Kdr} , g_{Kv1}) are given as follows:

$$g_{\text{Na}} = G_{\text{Na}} * m^3 * h$$

$$g_{\text{Kdr}} = G_{\text{Kdr}} * n$$

$$g_{\text{Kv1}} = G_{\text{Kv1}} * p^3 * q$$

Where m , n and p , are dynamic activation variables for Nav, Kdr and Kv1 channels respectively, and h and q are dynamic inactivation variables for Nav current and Kv1 channels, respectively. They evolve according to the following differential equations:

For $x = \{m, h, n\}$

$$dx/dt = \alpha_x(1-x) - \beta_x x$$

with $\alpha_x = x_\infty/\tau_x$ and $\beta_x = (1-x_\infty)/\tau_x$

$x_\infty = \alpha_x/(\alpha_x+\beta_x)$ and $\tau_x = 1/(\alpha_x+\beta_x)$

$$\alpha_m=(v+45.03)/(1-\exp(-(v+45.03)/9))$$

$$\beta_m=(v+45.03)/(\exp((v+45.03)/9)-1)$$

$$\alpha_h=(-v+60.03)/(1-\exp(-(-v-60.03)/7))$$

$$\beta_h=(-v-60.03)/(\exp((-v-60.03)/7)-1)$$

$$\alpha_n=(v+55.04)/(1-\exp(-(v+55.04)/10))$$

$$\beta_n=(v+55.04)/(\exp((v+55.04)/10)-1)$$

The Kv1 channel model is taken from (Golomb et al., 2007).

$$dp/dt = (p_\infty - p)/\tau_p$$

$$dq/dt = (q_\infty - q)/\tau_q$$

$$p_\infty = 1/(1 + \exp(-(v - \theta_p)/\sigma_p))$$

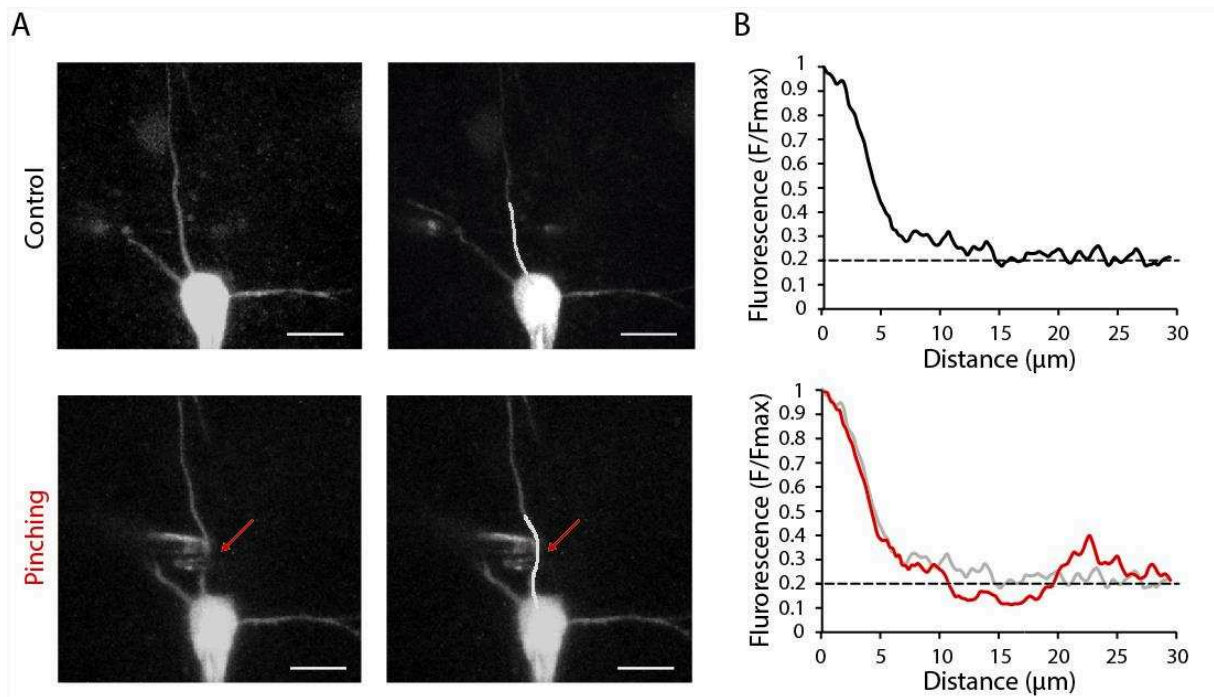
$$q_\infty = 1/(1 + \exp(-(v - \theta_q)/\sigma_q))$$

With $\theta_p = -50$ mV, $\sigma_p = 20$ mV, $\tau_p = 2$ ms, $\theta_q = -70$ mV, $\sigma_q = -6$ mV and $\tau_q = 150$ ms

The unitary channel conductance was 1 pS.

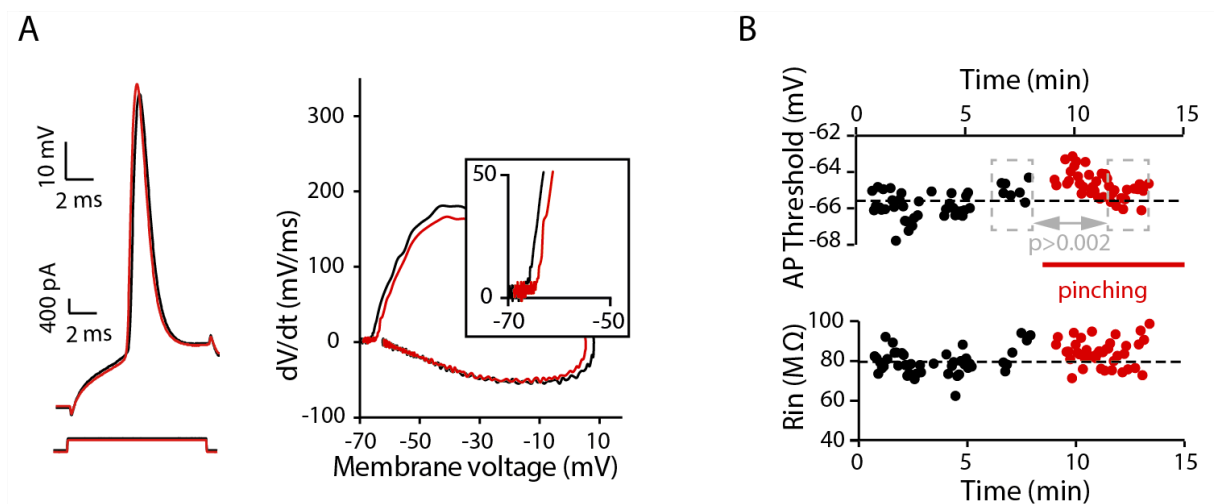
Acknowledgments: This work was supported by INSERM, CNRS and ANR (Axode ANR-14-CE13-003).

Author contributions: AF collected and analyzed the data, NA made computer simulations, RB and DD conceived the project and designed the experiments, and AF, NA, RB & DD wrote the manuscript.



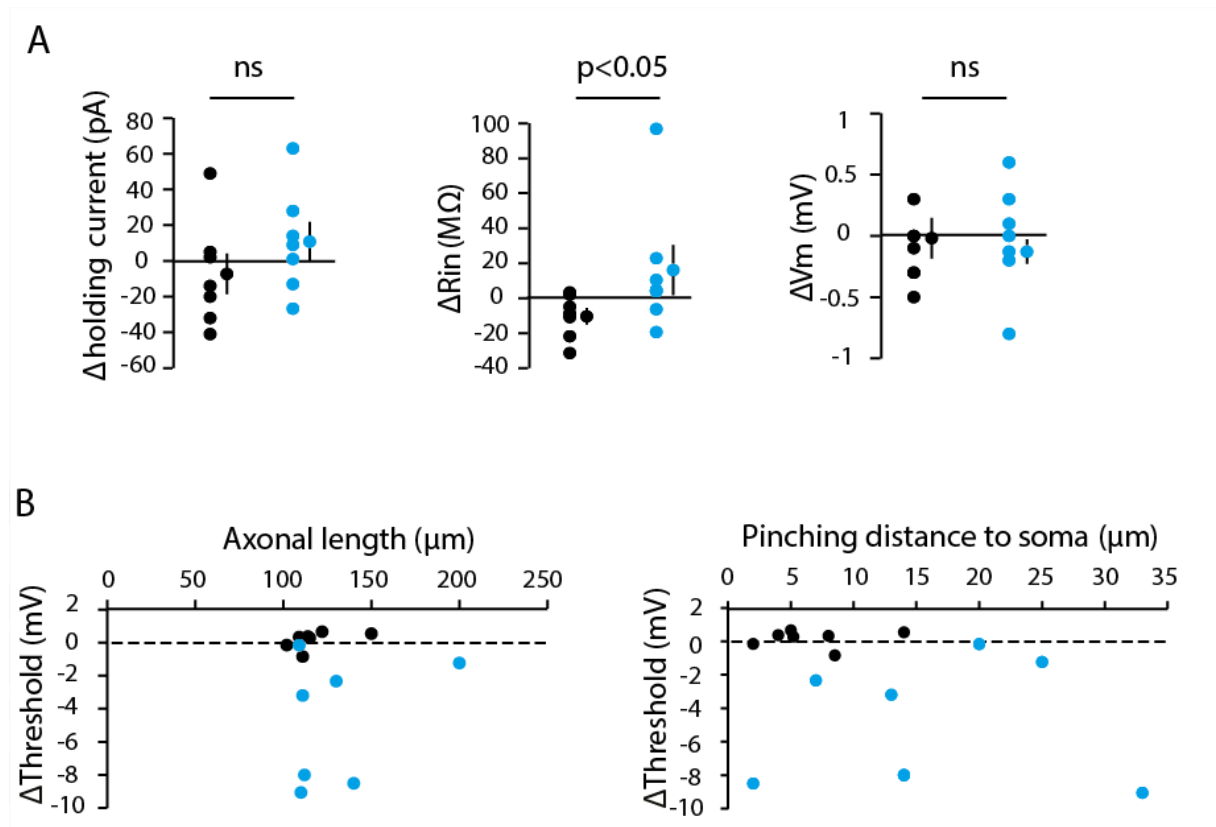
Supplementary Figure 1. Decrease in intracellular fluorescence caused by the pinching.

A. Confocal images of the neuron before and during axon pinching. Calibration bar: 20 μm . Right, image of the neuron with a line materializing the locus of the fluorescence measurement. **B.** Fluorescence profile of the proximal part of the axon before and during pinching. Note the reduction of fluorescence during pinching (red curve). Horizontal bar indicates the pinching zone.



Supplementary Figure 2. Example of non-significant change in AP threshold induced by axon pinching.

A. Voltage traces & phase-plots. **B.** Time course of AP threshold and R_{in} . Note the lack of effect on the threshold ($p > 0.0002$).



Supplementary Figure 3. Stability of parameters during pinching.

A. Variation in holding current, R_{in} and resting membrane potential during pinching. Neurons showing non-significant effect are in black whereas those showing a significant effect are in blue. **B.** Variation in AP threshold as a function of axonal length and pinching distance.

Supplementary Table 1.

	Dendrite	Soma	pre-AIS	AIS	Axon
Length (μm)	500	50	5	40	500
Diameter (μm)	4	40	2.5	2	1
Nav density ($\text{Ch}/\mu\text{m}^2$)	0	200	0	10000	2000
Kdr density ($\text{Ch}/\mu\text{m}^2$)	0	250	0	3000	1700
Kv1 density ($\text{Ch}/\mu\text{m}^2$)	0	0	0	20	219
R_m ($\Omega\cdot\text{cm}^2$)	50000	50000	10000	10000	20000
R_i ($\Omega\cdot\text{cm}$)	100	150	150	150	150
C_m ($\mu\text{F}/\text{cm}^2$)	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7

References

- Baranauskas, G., David, Y., and Fleidervish, I.A. (2013). Spatial mismatch between the Na⁺ flux and spike initiation in axon initial segment. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, 4051-4056.
- Bekkers, J.M., and Hausser, M. (2007). Targeted dendrotomy reveals active and passive contributions of the dendritic tree to synaptic integration and neuronal output. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 11447-11452.
- Boudkkazi, S., Carlier, E., Ankri, N., Caillard, O., Giraud, P., Fronzaroli-Molinieres, L., and Debanne, D. (2007). Release-dependent variations in synaptic latency: a putative code for short- and long-term synaptic dynamics. *Neuron* *56*, 1048-1060.
- Brette, R. (2013). Sharpness of spike initiation in neurons explained by compartmentalization. *PLoS Comput Biol* *9*, e1003338.
- Cudmore, R.H., Fronzaroli-Molinieres, L., Giraud, P., and Debanne, D. (2010). Spike-time precision and network synchrony are controlled by the homeostatic regulation of the D-type potassium current. *J Neurosci* *30*, 12885-12895.
- Evans, M.D., Dumitrescu, A.S., Kruijssen, D.L.H., Taylor, S.E., and Grubb, M.S. (2015). Rapid Modulation of Axon Initial Segment Length Influences Repetitive Spike Firing. *Cell Rep* *13*, 1233-1245.
- Golomb, D., Donner, K., Shacham, L., Shlosberg, D., Amitai, Y., and Hansel, D. (2007). Mechanisms of firing patterns in fast-spiking cortical interneurons. *PLoS Comput Biol* *3*, e156.
- Grubb, M.S., and Burrone, J. (2010). Activity-dependent relocation of the axon initial segment fine-tunes neuronal excitability. *Nature* *465*, 1070-1074.

Hamada, M.S., Goethals, S., de Vries, S.I., Brette, R., and Kole, M.H. (2016). Covariation of axon initial segment location and dendritic tree normalizes the somatic action potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* *113*, 14841-14846.

Hu, W., Tian, C., Li, T., Yang, M., Hou, H., and Shu, Y. (2009). Distinct contributions of Na(v)1.6 and Na(v)1.2 in action potential initiation and backpropagation. *Nat Neurosci* *12*, 996-1002.

Kirchheim, F., Tinnes, S., Haas, C.A., Stegen, M., and Wolfart, J. (2013). Regulation of action potential delays via voltage-gated potassium Kv1.1 channels in dentate granule cells during hippocampal epilepsy. *Front Cell Neurosci* *7*, 248.

Kole, M.H., and Brette, R. (2018). The electrical significance of axon location diversity. *Curr Opin Neurobiol* *51*, 52-59.

Kole, M.H., and Stuart, G.J. (2008). Is action potential threshold lowest in the axon? *Nat Neurosci* *11*, 1253-1255.

Kuba, H., Yamada, R., Ishiguro, G., and Adachi, R. (2015). Redistribution of Kv1 and Kv7 enhances neuronal excitability during structural axon initial segment plasticity. *Nat Commun* *6*, 8815.

Lezmy, J., Lipinsky, M., Khrapunsky, Y., Patrich, E., Shalom, L., Peretz, A., Fleidervish, I.A., and Attali, B. (2017). M-current inhibition rapidly induces a unique CK2-dependent plasticity of the axon initial segment. *Proc Natl Acad Sci U S A* *114*, E10234-E10243.

Michalikova, M., Remme, M.W., and Kempster, R. (2017). Spikelets in Pyramidal Neurons: Action Potentials Initiated in the Axon Initial Segment That Do Not Activate the Soma. *PLoS Comput Biol* *13*, e1005237.

Naundorf, B., Wolf, F., and Volgushev, M. (2006). Unique features of action potential initiation in cortical neurons. *Nature* *440*, 1060-1063.

Palmer, L.M., and Stuart, G.J. (2006). Site of action potential initiation in layer 5 pyramidal neurons. *J Neurosci* 26, 1854-1863.

Rama, S., Zbili, M., Fekete, A., Tapia, M., Benitez, M.J., Boumedine, N., Garrido, J.J., and Debanne, D. (2017). The role of axonal Kv1 channels in CA3 pyramidal cell excitability. *Sci Rep* 7, 315.

Telenczuk, M., Fontaine, B., and Brette, R. (2017). The basis of sharp spike onset in standard biophysical models. *PLoS One* 12, e0175362.

Thome, C., Kelly, T., Yanez, A., Schultz, C., Engelhardt, M., Cambridge, S.B., Both, M., Draguhn, A., Beck, H., and Egorov, A.V. (2014). Axon-carrying dendrites convey privileged synaptic input in hippocampal neurons. *Neuron* 83, 1418-1430.

Yu, Y., Shu, Y., and McCormick, D.A. (2008). Cortical action potential backpropagation explains spike threshold variability and rapid-onset kinetics. *J Neurosci* 28, 7260-7272.

B. Résultats non publiés :

1. Les canaux sodium contrôlent le seuil du PA

a. Une diminution de la conductance sodium (g_{Na}) dépolarise le seuil

La conductance sodium est un paramètre clé de l'excitabilité neuronale, mais peu d'informations sont disponibles sur l'impact des canaux sodium sur le seuil.

Pour étudier cela, des neurones pyramidaux de la couche L5 du cortex ont été enregistrés en double patch ($n=7$), en configuration cellule entière et courant imposé, et le seuil du PA a été mesuré en présence de différentes concentrations de TTX dans le bain extracellulaire, un bloqueur spécifique des canaux sodium (cf. [Figure 1, A](#)). Ainsi, nous avons voulu diminuer la conductance sodium en diminuant le nombre de canaux sodium disponibles. Le PA a été déclenché par des pulses de courant de 10 ms, et le *timing* du PA a été contrôlé à chaque enregistrement pour pouvoir s'affranchir d'un éventuel changement du niveau d'inactivation des canaux sodium (cf. [Matériels et Méthodes](#)). Les concentrations de TTX ont été fixées à des concentrations non saturantes, permettant la génération d'un potentiel d'action en 10 ms. Les données acquises avec 100 nM de TTX furent écartées, le courant sodium résultant étant insuffisant à la génération d'un PA.

Lors des applications successives de TTX, le seuil du potentiel d'action augmente de manière soutenue : il augmente de plus de 15 mV en moyenne entre la condition contrôle (sans TTX) et la condition avec une concentration maximale de TTX de 50 nM, passant de -61.11 ± 0.7 mV à -45.23 ± 3.4 mV; dénotant d'une diminution de l'excitabilité du neurone (cf. [Figure 1, B](#)). Notons qu'il est possible d'estimer la conductance sodium à partir des différentes concentrations de TTX utilisées ([Madeja, 2000](#); mais voir aussi: [Seutin & Engel, 2010](#)), nous pouvons voir que le seuil évolue selon le logarithme de la conductance sodium (cf. [Figure supp. 1](#)). L'amplitude, l'*overshoot* et la pente maximale de la montée du PA (maximum de dV/dt) diminuent drastiquement entre ces deux conditions, passant en moyenne de 78.93 ± 1.6 mV à 42.46 ± 2.2 mV pour l'amplitude, de 18.20 ± 1.4 mV à -0.76 ± 1.24 mV pour l'*overshoot*, et de 201.3 ± 20 mV/ms à 85.86 ± 6.3 mV/ms pour la pente maximale (cf. [Figure 1, C-E](#)). Remarquons qu'à une concentration de TTX de 50 nM, la dépolarisation créée par le PA

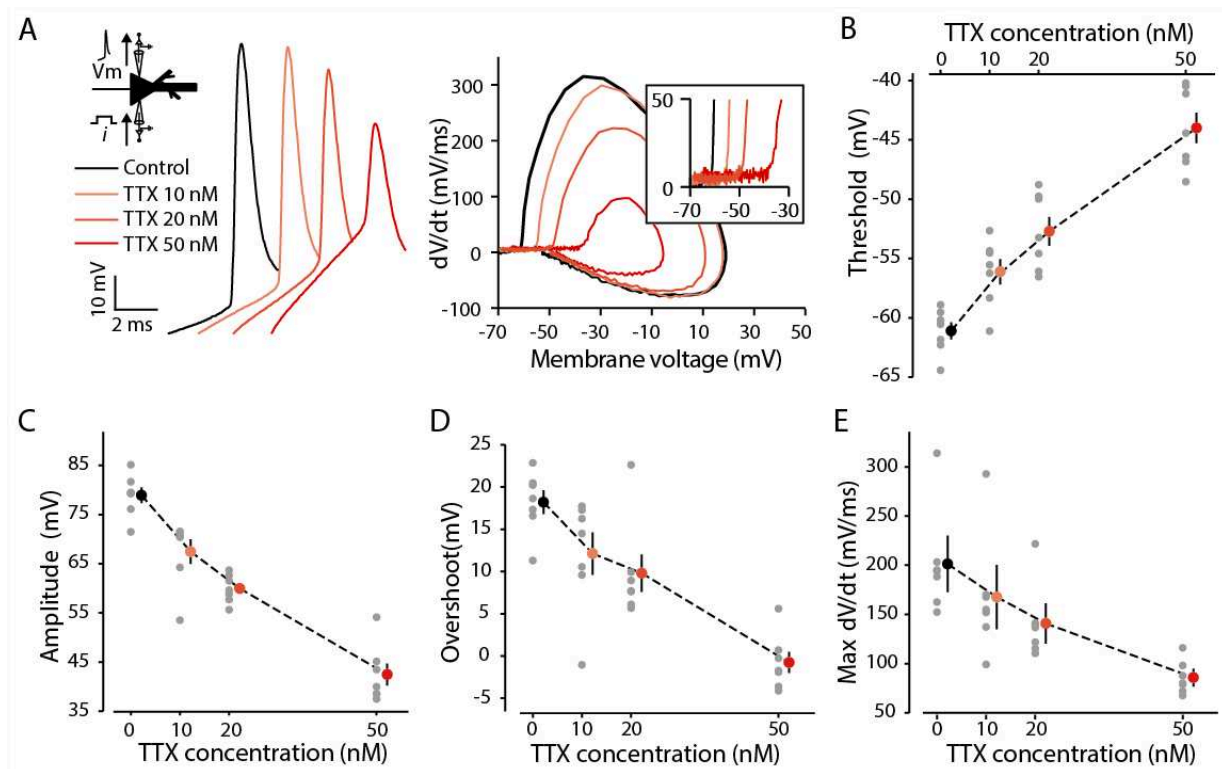


Figure 1. L'application de TTX réduit l'excitabilité.

A. Exemple d'application successive de faibles concentrations de TTX (10, 20 et 50 nM) sur des neurones pyramidaux L5 enregistrés avec 2 pipettes ($n=7$). A gauche, les traces de potentiels d'action obtenues sur un neurone, à droite, le *phase plot* associé. **(B, C, D E).** Graphiques représentant le seuil (B), l'amplitude (C), l'overshoot (D) et le maximum de dV/dt (E) en fonction des différentes concentrations de TTX. Notons qu'à une forte concentration de TTX (50 nM), le seuil du potentiel d'action est largement dépolarisé, le *kink* est absent, et la dépolarisation est lente (visible sur le maximum de dV/dt qui se trouve réduit). Les variations de seuil sont significatives entre chaque condition, test de Wilcoxon, $p < 0.05$, $n = 7$.

n'atteint en moyenne pas les valeurs positives, et elle est plus lente, ce qui est visible par une pente initiale sur le diagramme exprimant la dérivée du voltage en fonction du voltage (*phase plot*) qui se trouve réduite (cf. Figure 1, A, exemple : tracé rouge).

Pour conclure, le blocage des canaux sodium par la TTX induit une baisse de l'excitabilité du neurone, caractérisée par un seuil de génération du PA dépolarisé, une vitesse de dépolarisation maximale réduite, ainsi qu'une baisse de l'amplitude et de l'overshoot. Ces résultats indiquent qu'une réduction de la conductance sodium rehausse le seuil du PA.

b. Une diminution du courant sodium (I_{Na}) dépolarise le seuil

i. Les variations de E_{Na^+} en diminuant la concentration de Na^+ extracellulaire dépolarisent le seuil

Le courant sodium est un paramètre clé de l'excitabilité neuronale, et nous avons voulu examiner son rôle sur le seuil du PA. Un moyen peu exploré d'affecter le courant sodium est de faire varier le potentiel d'inversion des ions sodium (E_{Na^+}). D'après la théorie, une diminution de E_{Na^+} diminue la *driving force* du sodium à l'ouverture des canaux sodium, et donc réduit le courant sodium. Ici, nous avons voulu mesurer l'impact d'une diminution de E_{Na^+} sur le seuil de génération du PA. Pour étudier cela, des neurones pyramidaux L5 ont été enregistrés ($n=12$), en configuration cellule entière et courant imposé, et le seuil du PA a été mesuré en présence de différentes concentrations de sodium dans le bain extracellulaire, diminuant successivement la valeur de E_{Na^+} (cf. Figure 2, A). Dans nos conditions expérimentales, les solutions intracellulaires et extracellulaires utilisées donnent une estimation de E_{Na^+} via la formule de *Nernst* équivalente à 93 mV. En réduisant progressivement la concentration de Na^+ dans la solution extracellulaire, nous obtenons différents E_{Na^+} de valeurs décroissantes égales à 80, 70 et 48 mV (cf. Matériels et Méthodes). Selon le protocole utilisé précédemment, nous avons mesuré le seuil du PA sur un même neurone soumis successivement aux différentes solutions extracellulaires préparées, engendrant des E_{Na^+} décroissants. Plus E_{Na^+} est faible, plus le seuil du potentiel d'action est élevé : il augmente de

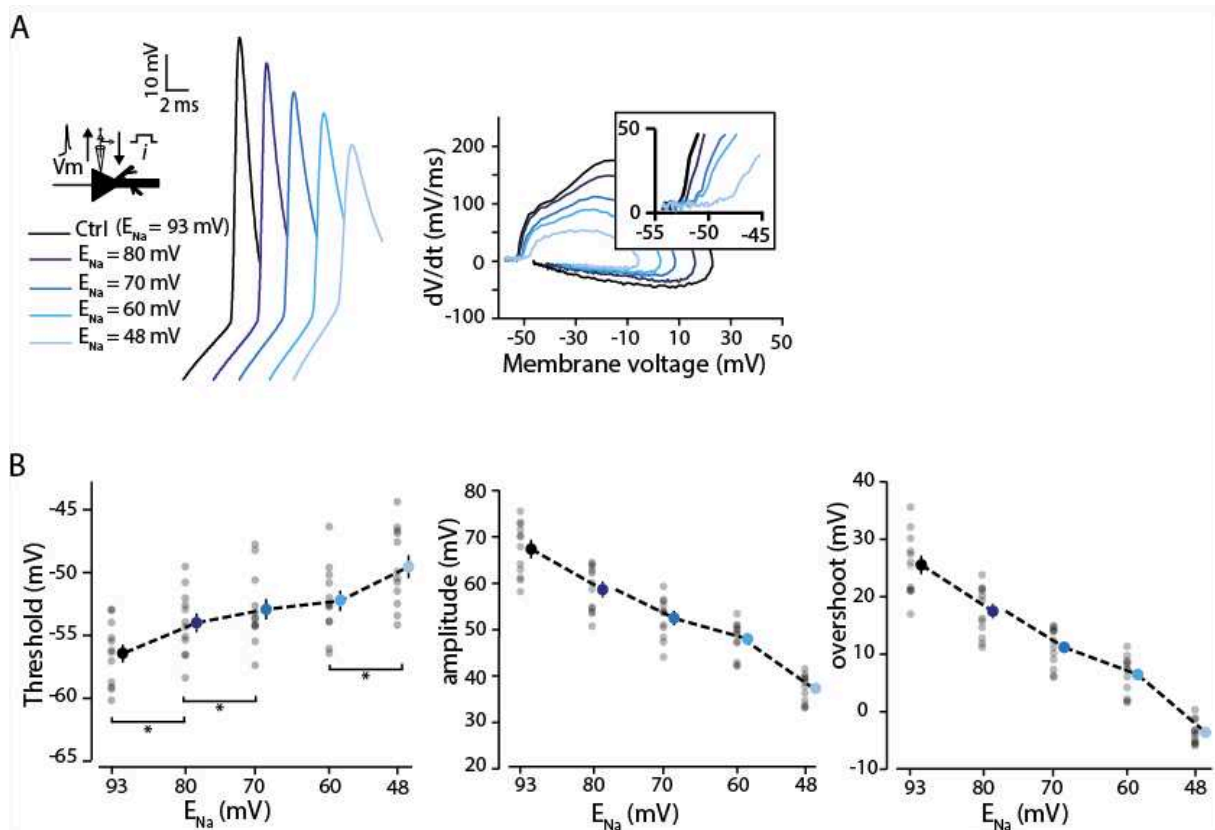


Figure 2. Une baisse de E_{Na^+} réduit l'excitabilité.

A. Exemple d'enregistrements de potentiels d'action obtenus suite à des diminutions successives de E_{Na^+} (80, 70, 60, et 48 mV) sur des neurones pyramidaux L5 (à gauche), et le *phase plot* associé (à droite). **B.** Graphiques représentant le seuil, l'amplitude, et l'overshoot du potentiel d'action en fonction de E_{Na^+} . Plus E_{Na^+} diminue, plus l'excitabilité est réduite : le seuil est dépolarisé, tandis que l'amplitude et l'overshoot diminuent. (*) Test de Wilcoxon, $p < 0.05$, $n = 12$.

près de 7 mV en moyenne entre la condition contrôle ($E_{Na^+} = 93$ mV) et la condition avec un E_{Na^+} minimal (48 mV), passant de -56.51 ± 0.7 mV à -49.62 ± 0.9 mV; dénotant de l'excitabilité du neurone (cf. Figure 2, B). L'amplitude et l'overshoot diminuent également entre ces deux conditions, passant en moyenne de 69.84 ± 1.98 mV à 33.8 ± 1.03 mV, et de 25.53 ± 1.61 mV à -3.6 ± 0.68 mV respectivement (cf. Figure 2, B). Ces résultats montrent que les variations de E_{Na^+} via une réduction de la concentration Na^+ extracellulaire, réduisent l'excitabilité du neurone, traduite par un rehaussement du seuil de génération du PA. Les variations de E_{Na^+} reproduisent dans une moindre mesure les effets obtenus avec une application diffuse de TTX dans le bain extracellulaire, à savoir un seuil dépolarisé, une amplitude et un overshoot réduit. Notons qu'à $E_{Na^+} = 48$ mV, l'overshoot reste négatif, ce qui est corrélé ici avec une variation du seuil de 7 mV, inférieure à la hausse du seuil observé avec 50 nM de TTX dans le bain (~ 15 mV) et qui induit également un overshoot du PA négatif. Il est toutefois difficile d'effectuer une comparaison claire de ces résultats, les conditions expérimentales d'enregistrement en simple *patch* (vs double *patch*) pouvant particulièrement affecter l'amplitude du PA, suite à une compensation du *bridge* approximative. Pour conclure, nous confirmons la théorie en montrant qu'une diminution du E_{Na^+} extracellulaire réduit l'excitabilité du neurone, et rehausse le seuil du PA.

ii. Une étude limitée des variations de E_{Na^+} en diminuant la concentration de Na^+ intracellulaire

Nous avons également fait varier la concentration de Na^+ dans la solution de patch intracellulaire, pour affecter E_{Na^+} . Pour cela, le protocole d'induction de PA a été effectué sur des neurones pyramidaux L5 ($n=12$), qui ont été enregistrés en patch-clamp avec une pipette contenant une solution intracellulaire contrôle, contenant 4.3 mM de Na^+ , puis les mêmes neurones ont été ré-enregistrés avec une seconde solution intracellulaire, contenant 20 ou 40 mM de Na^+ (cf. Figure 3, A). Ces solutions ont un E_{Na^+} estimé de 93 mV (contrôle) et 53 ou 26 mV respectivement.

Étonnamment, le seuil du PA mesuré en contrôle et en condition d'élévation de la concentration de Na^+ intracellulaire à 20 mM ne diffère pas ($n=6$) (test de Wilcoxon, $p>0.05$). De plus, augmenter cette concentration à 40 mM ne change rien ($n=6$). Les données pour ces

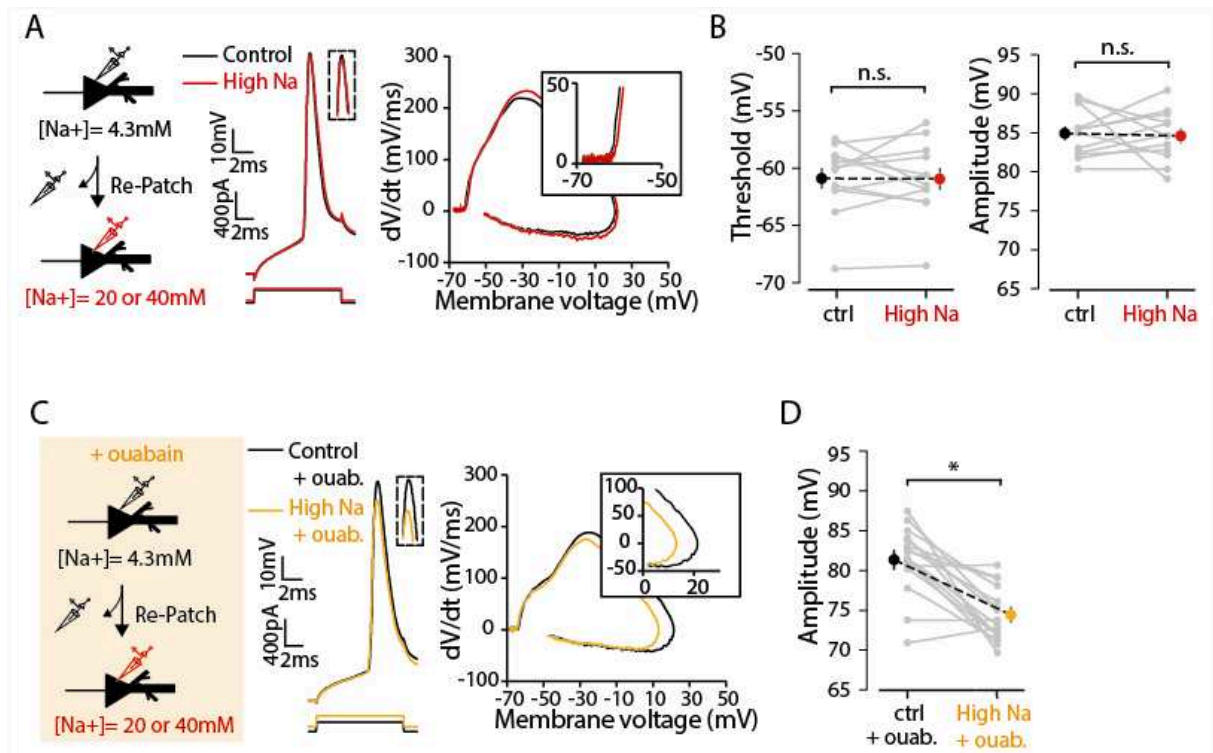


Figure 3. La concentration intracellulaire de Na^+ est régulée par les pompes Na^+/K^+ ATPases.

A. Exemple de traces de potentiels d'action d'un neurone enregistré avec une solution intracellulaire classique contenant 4.3 mM de sodium (en noir), puis ré-enregistré avec une solution intracellulaire contenant 20 ou 40 mM de sodium (en rouge). **B.** Graphiques représentant le seuil et l'amplitude du potentiel d'action. Aucun changement n'est significatif (n.s), test de Wilcoxon, $p > 0.05$, $n = 12$. **C.** Même dispositif expérimental que en (A), en présence de ouabaine (20 ou 100 μM), un bloqueur partiel des pompes Na^+/K^+ ATPases, dans le bain extracellulaire. **D.** Graphique représentant l'amplitude du potentiel d'action en condition contrôle, ou en présence d'une forte concentration de sodium (20 ou 40 mM), le tout en présence de ouabaine. (*) Test de Wilcoxon, $p < 0.05$, $n = 17$.

2 concentrations sont semblables (test de Mann-Whitney, $p > 0.05$) et ont donc été rassemblées ($n=12$)(cf. Figure 3, B). Les mesures de seuil du PA restent stables en moyenne, malgré le changement de solution intracellulaire, et passent de -60.9 ± 0.9 mV à -60.93 ± 0.95 mV. D'autre part, les valeurs de l'amplitude du PA sont également stables en moyenne et passent de 84.93 ± 0.9 mV à 84.61 ± 0.94 mV. Les variations de Na^+ intracellulaire n'affectent pas l'excitabilité du neurone, et ne semblent pas non plus affecter le courant sodium entrant aux vues de l'amplitude invariante du *spike*. Il est possible que ces résultats soient dus à un fort contrôle de la concentration de Na^+ intracellulaire via l'activité des pompes Na^+/K^+ ATPases, et il est donc difficile d'interpréter ces résultats avec certitude.

Pour aller plus loin, nous avons répété cette expérience en présence d'ouabaine (20 ou 100 μM) dans le bain extracellulaire, un bloqueur partiel des pompes Na^+/K^+ ATPases (cf. Figure 3, C), et avec un E_{Na^+} de 26 mV, correspondant à 40 mM de Na^+ dans la solution intracellulaire de patch. Le blocage des pompes Na^+/K^+ ATPases induit une réduction de l'amplitude du PA significative de près de 7 mV en moyenne ($n=17$, test de Mann Whitney, $p < 0.05$). Nous pouvons conclure que les pompes Na^+/K^+ ATPases participent au contrôle de la concentration de sodium intracellulaire. En outre, il est impossible d'estimer correctement E_{Na^+} d'après la concentration de Na^+ intracellulaire. D'un point de vue expérimental, il n'est pas non plus possible d'estimer correctement les variations de potentiel de jonction entre nos différentes conditions, ce qui pose problème, les traces électrophysiologiques comparées devant être effectuées à potentiel constant. Dans ce contexte, nous ne pouvons donc pas étudier les variations de seuil du PA d'après les variations de Na^+ intracellulaire, même en présence d'ouabaine.

Les variations de Na^+ extracellulaire impactent l'excitabilité du neurone ; il n'est pas possible de contrôler les variations de Na^+ intracellulaires dans nos expériences. E_{Na^+} est un levier contrôlant l'excitabilité, en impactant l'entrée du courant sodium à l'initiation : une diminution de E_{Na^+} rehausse le seuil du PA.

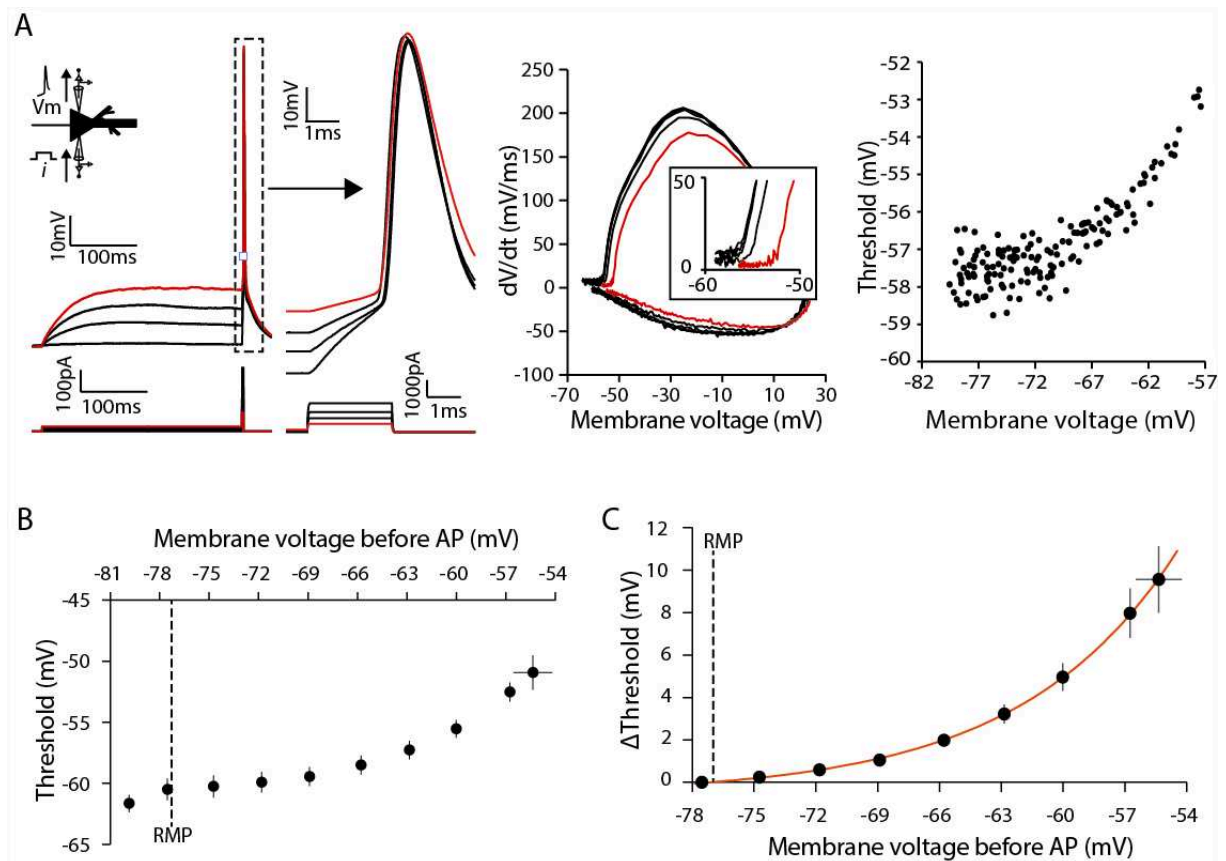


Figure 4. Évolution du seuil du potentiel d'action selon le potentiel.

A. Exemple de potentiels d'action déclenchés avec des créneaux de courant de 2 ms, à partir de différents potentiels, sur un neurone pyramidal L5 enregistré avec 2 pipettes (à gauche); le *phase plot* associé (au centre). A droite, représentation du seuil des potentiels d'action en fonction du potentiel pour ce neurone. **B.** Graphique représentant le seuil moyen en fonction du potentiel ($n = 4-15$). Les données pour chaque neurone ont été rassemblées et moyennées sur 3 mV sur l'axe x. **C.** Graphique représentant les écarts de seuil à -78 mV. Les données suivent une évolution exponentielle de la forme $f(x) = y_0 + a * \exp(bx)$ (avec $y_0 = -0.57$, $a = 15195$ et $b = 0.132$) (tracé orange).

2. L'inactivation des canaux sodium par des variations de potentiel détermine le seuil

a. Évolution du seuil en fonction du potentiel

L'inactivation des Na_v a un rôle prédominant sur les variations de seuil du PA dans les études théoriques, et montrent qu'un seuil plus dépolarisé est corrélé à une inactivation plus prononcée des Na_v . Cependant, peu d'études expérimentales montrent clairement l'effet de ce facteur sur l'excitabilité du neurone. Pour approfondir cela, des neurones pyramidaux L5 ont été enregistrés en double-patch en configuration cellule entière, et le seuil du PA a été mesuré suite à des dépolarisations induites par des créneaux de courant incrémentiels de 200 ou 300 ms (cf. Figure 4, A). Suite à cette pré-dépolarisation, un PA a été évoqué le plus rapidement possible (1-3 ms) grâce à des forts créneaux de courant (400 pA - 1 nA), dont l'intensité a été diminuée lors des dépolarisations croissantes. Ceci a permis de maintenir le *timing* du PA constant, et de s'affranchir d'un changement éventuel de l'inactivation des Na_v . Les traces de potentiel où des PAs sont apparus pendant la dépolarisation prolongée ont été écartées.

Sur la figure 4-A, un exemple du protocole utilisé est illustré pour un neurone, et les valeurs des seuils de PAs obtenues ont été représentées en fonction du potentiel de membrane stabilisé avant le PA, moyenné sur les 50 dernières millisecondes de dépolarisation. Le seuil du PA apparaît stable, une certaine variabilité étant toutefois apparente jusqu'à -72 mV, puis il augmente progressivement. Les données pour chaque potentiel ont été regroupées sur 3 mV et sont représentées sur la figure 4-B. L'ensemble des neurones enregistrés ($n= 4-15$, selon les points) montrent une évolution du seuil semblable. Pour mieux illustrer les variations de seuil, nous avons représenté les écarts de seuil par rapport au potentiel de repos (RMP, pour *resting membrane potential*, ~ -78 mV) (cf. Figure 4, C). A partir de -78 mV, l'évolution du seuil est représentée par une exponentielle de la forme $f(x) = y_0 + a * \exp(bx)$ (avec $y_0 = -0.57$, $a = 15195$ et $b = 0.132$) (cf. Figure 4, C, tracé orange). Le seuil du PA varie peu (< 2 mV) jusqu'à -66mV, puis augmente de manière plus rapide en fonction du potentiel. Notons l'ordre de grandeur des variations observées, de l'ordre de 10 mV, sur des potentiels compris entre -78 et -54 mV.

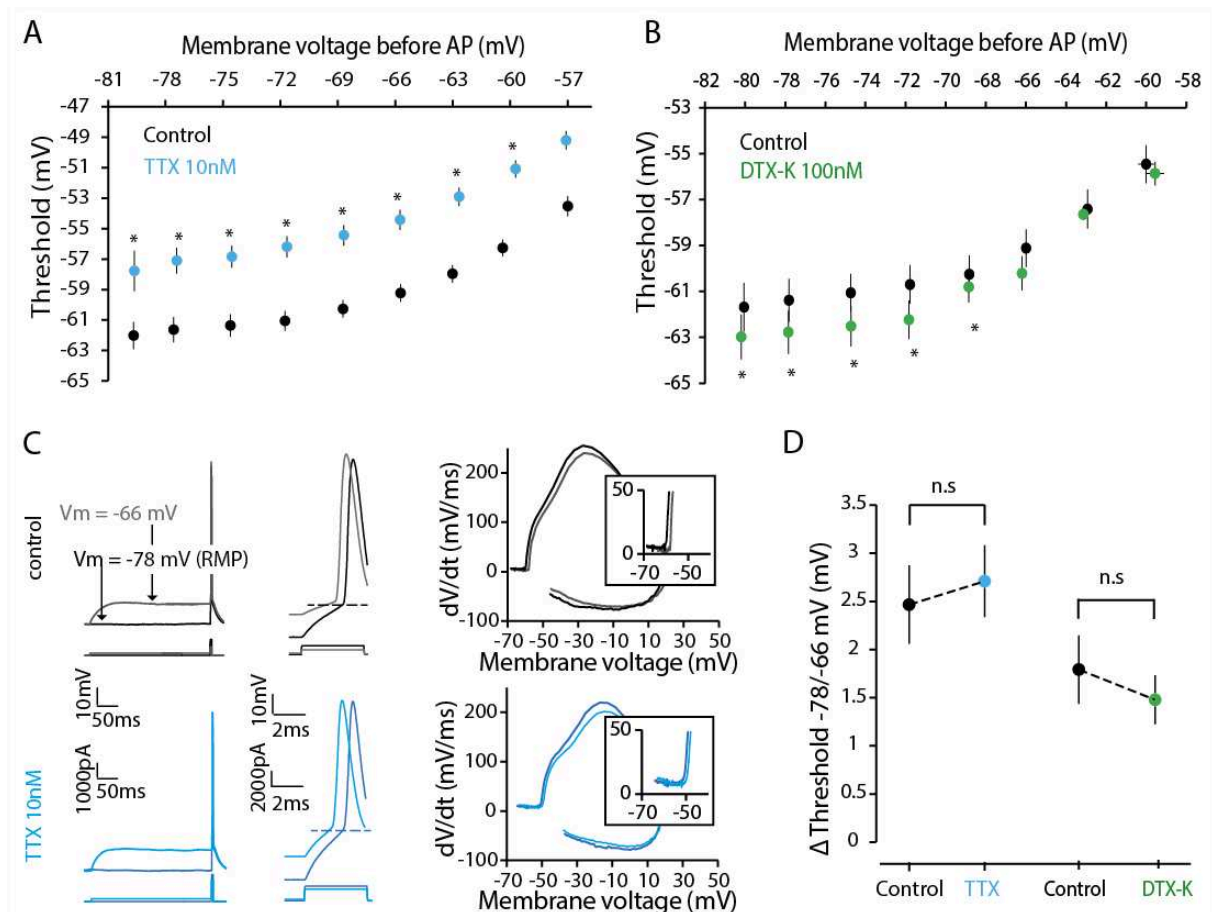


Figure 5. Effet de la TTX et de la DTx-K selon le potentiel.

Même protocole électrophysiologique que dans la figure 4, A. **A.** Graphique représentant les seuils moyens en fonction du potentiel, en condition contrôle (en noir), et en présence d'une faible concentration de TTX (10 nM, en bleu), $n = 6-10$. **B.** Graphique représentant les seuils moyens en fonction du potentiel, en condition contrôle (en noir), et en présence de DTx-K (100 nM, en vert), $n = 2-8$. **C.** A gauche, exemple de traces de potentiel illustrant les écarts de seuil entre -78 mV et -66 mV en condition contrôle (noir) et TTX 10 nM (bleu) ; au centre, élargissement du potentiel d'action avec en pointillé, le seuil représenté à -78 mV ; à droite, les *phases plot* associés. **D.** Les écarts de seuil moyen entre -78 mV et -66 mV, pour les différentes conditions. En TTX, $n = 9$; en DTx-K $n = 6$.

(*) Test de Wilcoxon, $p < 0.05$; (n.s) Non significatif, $p > 0.05$.

L'inactivation des Na_v produite par des dépolarisations croissantes de potentiel diminue l'excitabilité du neurone, et dépolarise le seuil, comme le prévoit la théorie.

b. Une diminution de la conductance sodium rehausse le seuil

Nous avons ensuite voulu voir si l'inactivation des canaux sodium avait le même effet sur l'excitabilité lorsque la conductance sodium est diminuée. Pour cela, l'expérience précédente a été répétée sur les mêmes neurones ($n = 6-10$, selon les points), en présence d'une faible concentration de TTX (10 nM) pour bloquer une partie du courant sodium (cf. [Figure 5, A](#)). Le seuil du PA est nettement rehaussé à tous les potentiels (test de Wilcoxon, $p < 0.05$, à l'exception du dernier point en raison d'un n insuffisant (4)). Par exemple à -66 mV, le seuil augmente de ~ 4.8 mV et passe de -59.23 ± 0.57 mV à -54.44 ± 0.66 mV. De manière étonnante, l'effet de la TTX semble constant : les écarts de potentiel entre les seuils mesurés en condition contrôle et en présence de 10 nM de TTX semblent stables. Pour vérifier cela, nous avons mesuré les écarts de seuil au RMP, et ils sont indiscernables d'une condition à l'autre pour tous les potentiels jusqu'à -60 mV (test de wilcoxon, $p < 0.05$, non illustré). Par exemple, l'écart de seuil de -66 mV au RMP reste identique et passe de 2.13 ± 0.34 mV à 2.41 ± 0.34 mV en présence de 10 nM de TTX (cf. [Figure 5, C-D](#)). L'effet de 10 nM de TTX sur le seuil du PA est donc constant.

Ainsi, la conductance sodium a un impact sur la valeur du seuil du PA, mais c'est l'inactivation des Na_v qui semble définir son évolution en fonction du potentiel. En outre l'effet de la TTX est constant et la conductance sodium ne fait *que* décaler la courbe des seuils vers des valeurs dépolarisées. L'inactivation des Na_v est donc un paramètre clé régulant l'excitabilité du neurone.

c. Le courant I_D rehausse le seuil

Par la suite, nous avons voulu étudier l'effet combiné des canaux $K_V1.1$ et de l'inactivation des canaux Na_V sur le seuil du PA. Pour cela, nous avons répété le protocole précédent en présence de DTx-K, un bloqueur spécifique des canaux $K_V1.1$ ($n = 2-8$).

L'analyse de l'application de DTx-K est cependant limitée à des potentiels proches du RMP, les neurones étant plus excitables suite au blocage du courant I_D et déclenchant des PAs lors du premier créneau de dépolarisation, un nombre de traces conséquent a dû être écarté.

En présence de DTx-K, le seuil du PA est faiblement hyperpolarisé (cf. Figure 5, B). La réduction du seuil semble stable et l'hyperpolarisation induite par la DTx-K se rapproche de -1.5 mV pour tous les points (non illustré). Comme précédemment nous avons estimé les différences de seuil pour les deux conditions entre -78 et -66 mV; ces écarts s'élèvent à 1.79 ± 0.37 mV et 1.48 ± 0.26 mV, en contrôle et en présence de DTx-K respectivement (cf. Figure 5, D). Ils sont non significatifs (test de Wilcoxon, $p < 0.05$), et ceci est également vrai pour tous les écarts (à -78 mV) pour tous les points (non illustré). Ici, l'effet de la DTx-K est donc constant.

Ainsi le courant I_D réduit l'excitabilité et diminue le seuil du PA. Pour des potentiels inférieurs à -65 mV, cet effet est constant et ne dépend pas du potentiel.

3. Les courants I_{Na} et I_D régulent le seuil du PA en fonction de la latence

a. Une forte latence dépolarise le seuil du PA

La pente de dépolarisation précédant le PA est un paramètre fortement corrélé au seuil du PA (Azouz & Gray, 2000 ; Fontaine et al., 2014). Une hypothèse rationnelle attribue ces variations de seuil aux différentes conductances affectées lors de ces dépolarisations. Une manière simple d'affecter la pente de dépolarisation est de faire varier la latence du PA.

Ici, nous avons voulu savoir comment les conductances sodium et potassium contribuent au seuil du PA à différentes latences. Des neurones pyramidaux L5 ont été enregistrés en double patch ($n=19$), et nous avons mesuré le seuil des PAs déclenchés avec un

créneau de courant de 10 ms ou avec un créneau de courant de 50 ms (cf. Figure 6, A). Nous ferons référence à ces deux conditions comme suit : *latence de 10 ms* ou *courte latence*, et *latence de 50 ms* ou *longue latence* pour plus de commodité. A une latence de 50 ms, nos résultats montrent un seuil du PA dépolarisé de près de 4 mV par rapport à une latence de 10 ms (cf. figure 6, B). En effet le seuil passe de -60.90 ± 0.44 mV à -56.8 ± 0.47 mV (n=19), soit un écart de 4.1 mV. La latence impacte l'excitabilité du neurone, le seuil du PA est dépolarisé à une latence de 50 ms. Cet effet peut être expliqué par un taux d'inactivation des Na_v plus fort aux latences longues, qui rehausserait le seuil du PA, et/ou par une ouverture des canaux $\text{K}_v1.1$ connus pour diminuer l'excitabilité et affecter le seuil (Higgs & Spain, 2011).

b. Le courant I_D dépolarise le seuil du PA uniquement à une longue latence

Nous avons ensuite étudié l'impact de la conductance potassium bas seuil, portée par les canaux $\text{K}_v1.1$ et porteur du courant I_D . Ce courant s'inactivant lentement, est présent dans les neurones pyramidaux L5 aux potentiels sous-liminaire et constitue un deuxième facteur à même d'impacter le seuil du PA à différentes latences. Pour cela, nous avons répété l'expérience (n=12), en présence de DTx-K (n=6) ou DTx-I (n=6) à faible concentration, 2 bloqueurs des canaux K_v1 (cf. Figure 6, C-D). Les données en DTx-K et DTx-I étant similaires (test de Mann-Whitney, $p > 0.45$), nous avons rassemblé les deux conditions. Bloquer le courant I_D réduit fortement l'écart de seuil du PA entre une latence de 10 ms et une latence de 50 ms : le seuil du PA augmente en moyenne de ~ 1.5 mV entre les deux conditions (données non représentées), au lieu des ~ 4.1 mV précédemment (cf. Figure supp. 2). De manière surprenante, si l'on regarde de plus près, la DTx n'a pas d'effet sur le seuil pour une latence courte (60.77 ± 0.59 mV à -60.80 ± 0.48 mV) (cf. Figure 6, C), mais le seuil est réduit considérablement à une latence longue (cf. Figure 6, D). En effet, à une latence de 50 ms la DTx réduit le seuil du PA de 3.8 mV, et passe de -55.47 ± 0.6 mV à -59.25 ± 0.63 mV.

Nous concluons que dans les neurones pyramidaux L5, le courant I_D réduit l'excitabilité en diminuant le seuil du PA pour des latences longues mais n'a pas d'impact sur les courtes latences. I_D étant un courant à activation rapide et ouvert aux potentiels sous-liminaire, nous nous sommes demandé si l'absence d'effet observé aux courtes latences n'était pas due à un fort courant Na^+ , qui le masquerait.

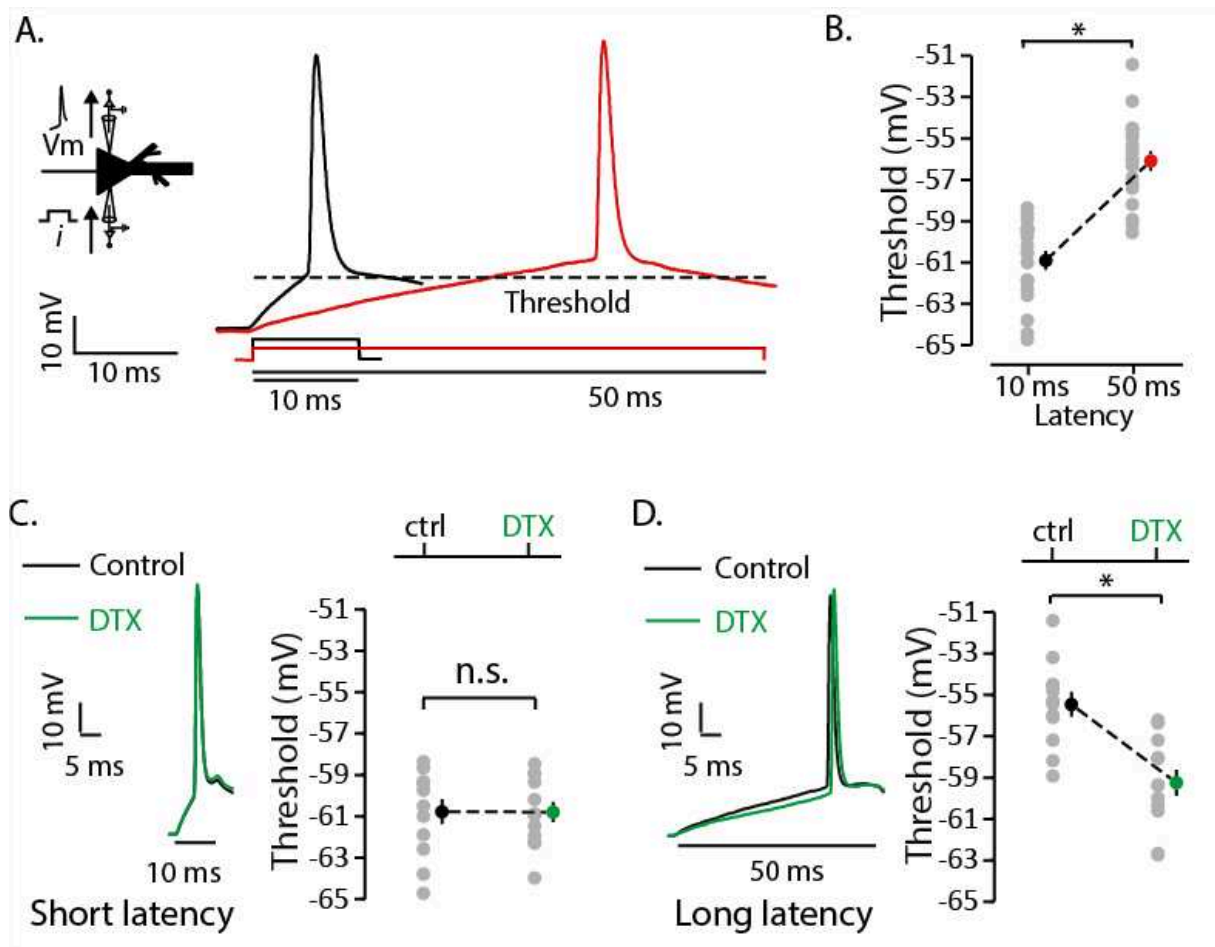


Figure 6. Effet de la latence et de la DTx sur le seuil du potentiel d'action.

A. Exemple de traces de potentiels d'action déclenchés avec un pulse de courant de 10 ms (en noir) ou 50 ms (en rouge), sur un neurone pyramidal L5 enregistré avec 2 pipettes. **B.** Graphique représentant le seuil en fonction de la latence. (*) Test de Wilcoxon, $p < 0.05$, $n = 19$. **C.** La DTx n'a pas d'effet sur le seuil du potentiel d'action à courte latence. A Gauche, trace de potentiel en contrôle (noir) et en présence de DTx (DTx-I ou DTx-K, 100 nM, en vert). A droite, graphique représentant le seuil. Les variations de seuil sont non significatives (n.s), test de Wilcoxon, $p > 0.05$, $n = 12$. **D.** La DTx réduit l'excitabilité sur le seuil du potentiel d'action à longue latence. A Gauche, trace de potentiel en contrôle (en noir) et en présence de DTx (en vert). A droite, graphique représentant le seuil. (*) Test de Wilcoxon, $p < 0.05$, $n = 12$.

c. Étude combinée du courant I_D et I_{Na} à différentes latences

Pour répondre à cette hypothèse, nous avons voulu étudier la compétition entre les courants I_D et I_{Na} sur l'excitabilité du neurone aux deux latences précédentes : 10 et 50 ms. Pour cela nous avons mesuré le seuil du PA à ces latences sur des neurones soumis à des concentrations de TTX croissante dans le bain extracellulaire, avec DTx (n=12) ou sans (condition contrôle, n=7) (cf. Figure 7, A). A une latence de 10 ms, le seuil du PA augmente progressivement en fonction de la concentration de TTX (cf. Figure 7, C). Étonnamment, l'effet de la DTx est toujours invisible à des concentrations de TTX de 0-20 nM (cf. Figure 7, B-C) (test de Mann-Whitney, $p > 0.05$), mais apparaît à l'application d'une concentration de 50 nM (test de Mann-Whitney, $p < 0.025$) avec une diminution notable du seuil d'environ 3.5 mV (cf. Figure 7, C). En effet le seuil du PA est en moyenne de -43.99 ± 1.29 mV vs -47.56 ± 0.45 mV. Une forte concentration de TTX permet donc de démasquer l'effet du courant I_D sur le seuil, c'est donc une conductance sodium très forte qui masque son effet à une courte latence.

A une latence de 50 ms, le seuil du PA augmente progressivement lors de l'application des concentrations de TTX croissante, et la DTx apporte une diminution du seuil du PA sur toutes les concentrations de TTX (cf. Figure 7, E-F). Notamment, à 50 nM de TTX, le seuil en contrôle est de -36 ± 0.91 mV vs -40.27 ± 0.9 mV en présence de DTx. De manière surprenante, la diminution d'excitabilité apportée par le courant I_D semble constante, et ne semble pas augmenter en fonction de la concentration de TTX appliquée comme nous nous y attendions.

Pour quantifier plus précisément cet effet, nous avons calculé l'écart de seuil à la condition zéro TTX pour chaque concentration de TTX (cf. Figure 7, G). Par exemple, les écarts de seuil entre la condition 0 et 20 nM de TTX, en présence ou non de DTx, sont non significatifs (15.15 ± 0.75 mV vs 14.26 ± 1.07 mV, test de Mann-Whitney, $p > 0.8$). De même, aucun des écarts n'est significatif, montrant que les variations de seuil à 10, 20 ou 50 nM sont TTX-dépendantes et DTx-indépendantes.

Le même graphique peut également être réalisé pour les données obtenues aux latences de 10 ms (cf. Figure 7, D). Cette fois-ci, l'écart à la condition zéro TTX n'est logiquement visible qu'à l'apparition de l'effet du courant I_D à 50 nM de TTX (cf. Figure 7, C-D).

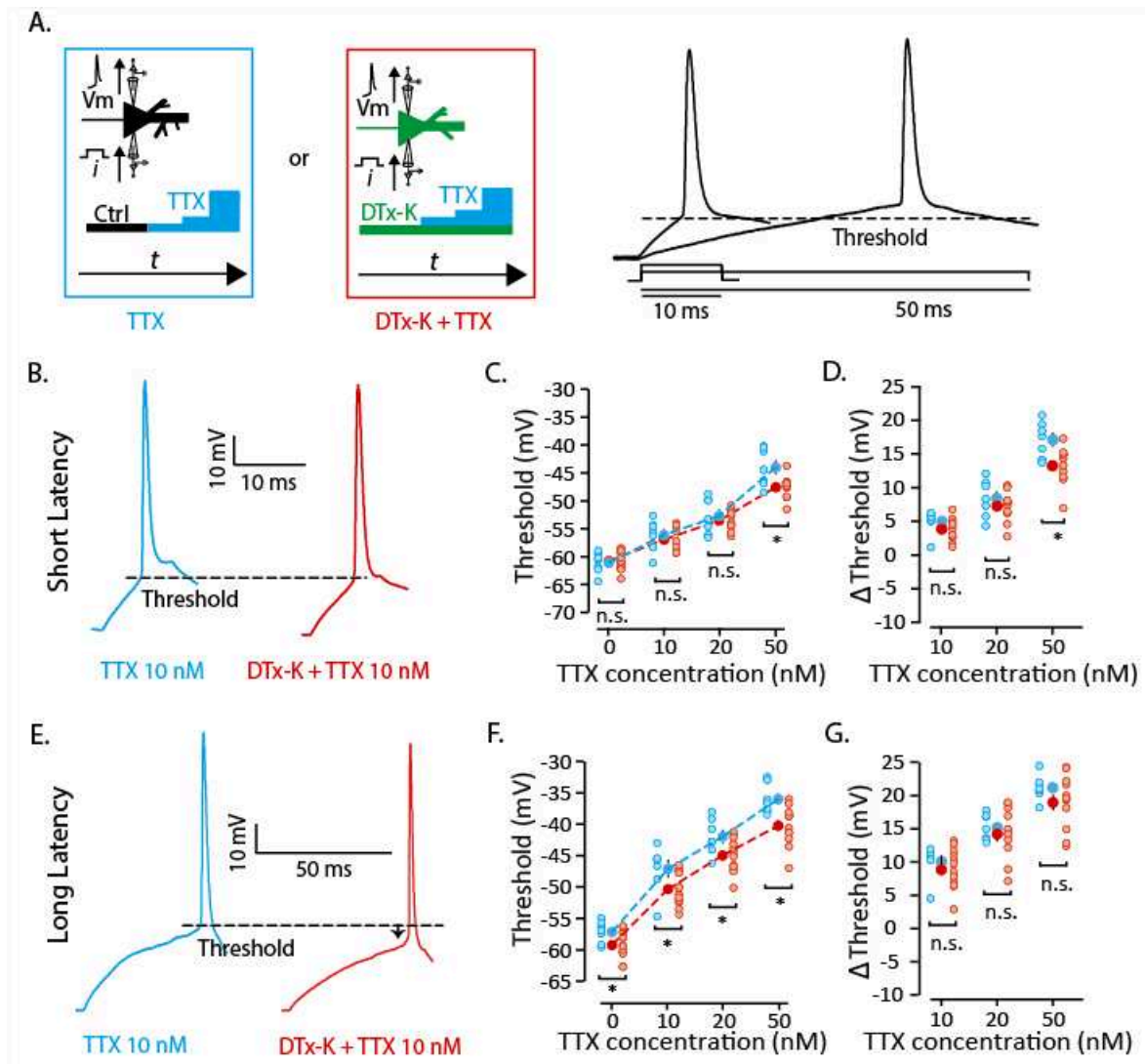


Figure 7. Effet de la latence, de la TTX et de la DTx-K sur le seuil du PA.

A. A gauche, le protocole expérimental. Des neurones pyramidaux L5 sont enregistrés avec 2 pipettes, en présence de concentrations de TTX croissante (10, 20 et 50 nM) (encadré bleu). La même expérience est répétée en présence du bloqueur des canaux $K_{v1.1}$, la DTx-K (encadré rouge). A droite, le protocole électrophysiologique, identique à celui de la figure 6. **B.** Exemple de deux traces de potentiel d'action, de latence courte (10 ms), obtenues sur 2 neurones différents, en présence de 10 nM de TTX (en bleu) ou de DTx-K + 10 nM de TTX (en rouge). **C.** Graphique représentant le seuil du PA en fonction de la concentration de TTX pour les latences courtes. Les codes couleurs sont les mêmes qu'en (A). **D.** Graphique représentant les effets de la TTX pour les latences courtes: les écarts de seuil à la condition TTX = 0 nM sont représentés. **E.** Exemple de deux traces de potentiel d'action, de latence longue (50 ms), obtenues sur 2 neurones différents, en présence de 10 nM de TTX (bleu) ou de DTx-K + 10 nM de TTX (rouge). **F.** Graphique représentant le seuil du PA en fonction de la concentration de TTX pour les latences longues. Les codes couleurs sont les mêmes qu'en (A). **G.** Graphique représentant les effets de la TTX pour les latences longues : les écarts de seuil à la condition TTX = 0 nM sont représentés.

Pour résumer, à une courte latence, l'effet du courant I_D est absent car il est masqué par un fort courant I_{Na} . A de plus longues latences, le courant I_D diminue l'excitabilité mais n'entre pas en compétition avec le courant I_{Na} , leur impact sur le seuil est indépendant et l'hyperpolarisation créée par le courant I_D est incompressible.

4. Figures supplémentaires

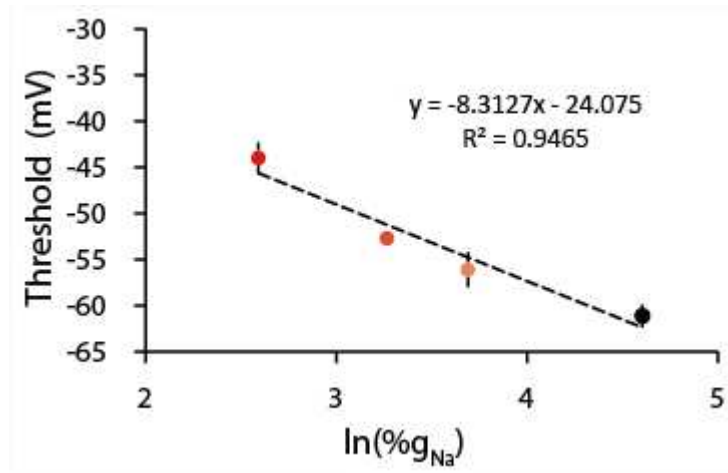


Figure supplémentaire 1. Le seuil du PA est logarithmiquement corrélé à la conductance sodium.

Graphique représentant le seuil du PA en fonction du logarithme de la conductance sodium. La conductance sodium a été déterminée grâce à une courbe estimant g_{Na} en fonction de la concentration de TTX (Madeja, 2000; mais voir aussi : Seutin & Engel, 2010). Le seuil est linéairement corrélé au logarithme de g_{Na} . Les données sont extraites de la Figure 1.

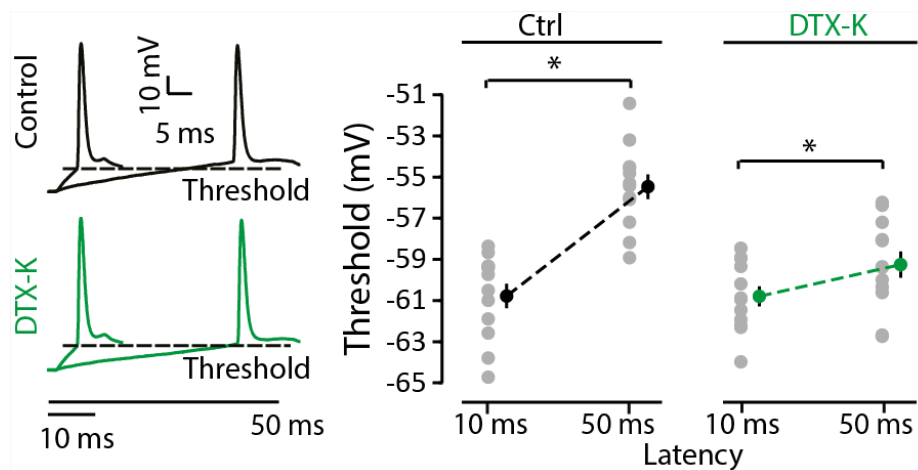


Figure supplémentaire 2. La conductance potassium K_{v1} et la latence déterminent le seuil du potentiel d'action.

À gauche, exemple de PA à une latence de 10 et 50 ms, en condition contrôle (en noir) et en présence de DTx-K (en vert) sur un même neurone enregistré avec deux pipettes. À droite, graphique représentant le seuil du PA dans les différentes conditions. Notons qu'en présence de DTx-K, l'écart de seuil entre les latences est réduit. (*) Test de Wilcoxon $p < 0.05$.

Discussion

A. Article 1 : Le rôle de la résistance axiale sur le seuil du PA

La rôle de la résistance axiale sur l'excitabilité a été fortement soutenu par les études théoriques (Baranauskas et al., 2010; Brette, 2013; Kuba et al., 2006). Cependant les preuves expérimentales restent incertaines du fait des nombreux paramètres impactant l'excitabilité du neurone en parallèle (Kole & Brette, 2018). Ici, nous avons voulu étudier précisément la résistance axiale en limitant les facteurs confondants.

Nous avons montré qu'une augmentation de la résistance axiale (R_a) par un pincement du tronc axonal, ou une diminution de la R_a par une modification de la composition ionique du milieu intracellulaire, sont capables de modifier directement l'excitabilité neuronale. En effet, le pincement axonal a entraîné un abaissement (dans 7 cellules sur 14) du seuil du potentiel d'action alors que le remplacement du gluconate par des ions chlorure a conduit à une élévation du seuil du potentiel d'action. De plus, les effets créés par les pincements d'axones ont pu être qualitativement reproduits par un modèle neuronal simple, suivant le formalisme de Hodgkin & Huxley. (cf. [Partie Résultats, Papier 1](#))

Les pincements d'axones

En premier lieu, nous avons choisi de faire varier le diamètre de l'axone pour impacter la R_a . En effet, la R_a est inversement proportionnelle à $\frac{1}{d^2}$ (cf. [Introduction, II. 3.](#)). Par exemple, une diminution de diamètre du tronc axonal d'un facteur 3 prédit une augmentation de la R_a d'un facteur 9. D'autre part, notons qu'un pincement axonal important serait également susceptible d'augmenter considérablement la résistivité intracellulaire locale (R_i), qui est directement proportionnelle à la R_a . En théorie, ces deux facteurs affectent la R_a dans le même sens lorsque le diamètre du tronc axonal est réduit.

Nous avons pu réaliser le pincement axonal grâce à l'utilisation de 2 pipettes extracellulaires, placées de part et d'autre de l'axone (cf. [Matériels et Méthodes](#)).

Les pincements d'axones induisent une hyperpolarisation moyenne du seuil du PA d'environ 4 mV, visible dans 7/14 cellules. Dans 3 cellules, l'hyperpolarisation a même atteint des valeurs importantes (- 8 mV). De plus, cette augmentation d'excitabilité se traduit par une réduction du créneau de courant nécessaire à la génération d'un PA à la latence contrôle

(-181 ± 60 pA). L'effet est clair, et il semble confirmer l'importance de la Ra sur l'excitabilité du neurone.

Toutefois, il est difficile d'interpréter l'absence d'effet dans la moitié des neurones considérés. Aux vues de la manipulation délicate des pipettes, de leurs formes arrondies et de la finesse de l'axone, il est possible qu'elles aient été mal positionnées, conduisant à des axones imparfaitement pincés. Une autre hypothèse pourrait être que l'augmentation de la Ra n'induit des effets visibles qu'à partir d'un certain palier. La vérification du pincement effectif des axones étant visuelle et qualitative, cela ne nous permet cependant pas d'exclure l'une ou l'autre des hypothèses.

Aussi, nous avons porté une attention particulière à la qualité des neurones enregistrés. Les neurones présentant un fort *bridge* ($>20-25$ M Ω) ont été écartées, les variations de courant de maintien sont inférieures à 70 pA, les traces analysées sont à potentiel identique et la latence du PA a été maintenue constante pour comparer l'excitabilité. Aucun changement significatif notable n'a été remarqué entre les deux populations de neurones identifiées, à part une résistance d'entrée en moyenne supérieure. Malgré la variabilité de nos résultats, les hyperpolarisations significatives obtenues ne ressemblent nullement à des artéfacts.

Génération d'un spikelet

Dans un cas, le pincement axonal a conduit à la génération d'un PA réduit, ou *spikelet*, dénotant d'une excitabilité maximale dans le compartiment axonal, sans augmenter celle du compartiment somatique, menant à l'échec de génération d'un PA entier au soma.

De plus, le *spikelet* présente un *kink*, son seuil est hyperpolarisé d'environ 8.5 mV, et la pente initiale de son *phase plot* est similaire à celle de la composante IS du PA contrôle. Tous ces éléments suggèrent que le *spikelet* est en effet initié dans l'axone.

De manière intéressante, la possibilité d'expliquer la génération d'un *spikelet* axonal à partir du compartiment somatodendritique est soutenue par des modèles théoriques (Michalikova, Remme, & Kempter, 2017). Michalikova et ses collègues montrent que l'émission de *spikelets* est facilitée par une forte résistivité du segment initial de l'axone, grâce à la séparation électrotonique entre le soma et l'axone créée (Michalikova et al., 2017). Nos résultats confirment donc un résultat théorique. Aussi, ces conclusions suggèrent que

l'augmentation de la Ra par le pincement axonal entraînerait l'isolation électrique du SIA par rapport au soma, et permettrait une forte atténuation électrotonique entre les deux compartiments, un fait également prédit par d'autres études théoriques (Brette, 2013).

Ces résultats pourraient permettre de mieux comprendre les mécanismes de génération des *spikelets*. En effet, peu d'informations sont disponibles sur la génération des *spikelets in vitro*. Bien que les entrées synaptiques arrivent via le compartiment somatodendritique de manière orthodromique vers le compartiment axonal, les *spikelets* générés dans l'axone par une stimulation somatique sont des événements peu répertoriés. Plutôt, il est supposé que ce phénomène provienne de PAs de neurones adjacents envahissant l'axone par les jonctions gaps, ou qu'ils puissent être générés dans les dendrites ou encore suite à une inactivation forte des Nav somatiques lors de la génération de PAs complexes (Michalikova et al., 2017). D'ailleurs, dans les études *in vitro*, l'étude des *spikelets* est effectuée par des stimulations de l'axone lointain (i.e. après SIA) (Hu et al., 2009).

Coupure d'axone

Des coupures d'axones ont été accidentellement réalisées suite à des pincements trop fermes (cf. Matériels & Méthodes). Les potentiels d'action enregistrés sont donc initiés au soma, et présentent un seuil dépolarisé d'environ 8 mV, ainsi qu'une initiation lente dépourvue d'un *kink*. De manière intéressante ces PAs sont similaires à ceux induits par une application de TTX localisée au niveau du SIA (Hu et al., 2009; Palmer & Stuart, 2006). Cela concorde également avec l'initiation opérant dans les modèles unicompartmentaux suivant le formalisme de Hodgkin & Huxley, mettant en évidence que le couplage soma-axone joue un rôle clé dans l'apparition du *kink* somatique.

Remarquons aussi le seuil dépolarisé du PA somatique, qui serait d'une part dû aux propriétés des Nav somatiques, les Nav1.2, présentant une courbe d'activation décalée vers des valeurs positives (Hu et al., 2009, $V_{1/2}$ à l'axone de 43.9 vs 29.7 au soma), et d'autre part à la large capacitance somatodendritique nécessitant un grand courant pour être chargé.

Modification de la solution intracellulaire

En remplaçant le K-Gluconate par du K-Cl dans la solution intracellulaire, nous avons remplacé une molécule encombrante et peu mobile (le gluconate) par un ion de taille réduite et hautement mobile (le chlore). En théorie, cette manipulation diminue la résistivité intracellulaire (R_i) et facilite le passage du courant. La R_a étant directement proportionnelle à la R_i , en diminuant la R_i , nous diminuons la R_a , et la théorie prédit une diminution faible de l'excitabilité (cf. [Résultats, Papier 1](#)).

Les enregistrements d'un même neurone avec la solution intracellulaire contrôle puis avec la solution intracellulaire contenant une forte concentration de chlore montrent dans ce sens une élévation du seuil du PA proche de 2 mV. Ceci est donc une seconde approche originale permettant de corrélérer l'excitabilité avec les variations de la résistance axiale.

Notre approche expérimentale démontre le rôle de la résistance axiale comme un facteur clé de l'excitabilité. Ceci permet de mieux comprendre comment les neurones intègrent les signaux entrants via leur morphologie. En effet, la position du SIA, le diamètre de l'axone ou la présence d'une dendrite en amont du SIA sont autant de paramètres morphologiques à même d'impacter la R_a et l'excitabilité. Par exemple, un neurone possédant un SIA proche du compartiment somatique posséderait intrinsèquement une R_a faible, et une excitabilité réduite, qui pourrait toutefois être compensée par une forte conductance sodium axonale ou une faible capacitance somatodendritique ([Hamada et al., 2016](#); [Kuba et al., 2006](#)).

B. Le rôle des canaux sodium et potassium sur le seuil du PA

Le seuil du potentiel d'action est un paramètre très variable (Azouz & Gray, 2000; Hu et al., 2009), mais les raisons à cela sont encore mal comprises. Les conductances sensibles au potentiel ont un rôle central dans la génération du potentiel d'action et nous avons voulu comprendre ici comment elles affectent le seuil du PA. En particulier nous avons étudié deux conductances clés : la conductance sodium et la conductance potassium K_{v1} .

Effet de la TTX

Dans un premier temps, nous avons montré que de faibles applications de TTX diminuent considérablement l'excitabilité, en élevant le seuil de génération du potentiel d'action. De plus des concentrations croissantes de TTX diminuent d'autant plus l'excitabilité. Plus précisément, l'évolution du seuil du PA en fonction de la conductance sodique suit une courbe logarithmique. Ceci montre qu'une plus grande conductance sodium augmente l'excitabilité. Le niveau d'expression des canaux sodium dans les neurones est donc un levier effectif pour réguler l'excitabilité.

D'autre part, ces données, bien que simples, pourraient se révéler utiles pour améliorer des modèles préexistants estimant le seuil du PA en fonction de la conductance sodium. De manière intéressante, il a été montré que le seuil du PA au site d'initiation serait corrélé de manière logarithmique à la conductance sodium (Brette, 2010).

Effet des variations de E_{Na^+}

Dans les modèles théoriques issus du formalisme de Hodgkin & Huxley, le paramètre E_{Na^+} occupe une place centrale dans la définition du courant sodium entrant. Nous avons voulu vérifier le rôle de ce facteur sur l'excitabilité.

Nous montrons que diminuer E_{Na^+} , diminue le seuil du PA, manifestement via une réduction de l'entrée de courant sodium. Aussi, l'évolution du seuil du PA en fonction des différentes valeurs de E_{Na^+} pourrait se révéler utile pour affiner les modèles actuels (Brette, 2010).

De façon surprenante, les variations de E_{Na^+} obtenues en faisant varier les concentrations de sodium intracellulaires n'ont pas montré d'effet sur l'excitabilité du neurone. En effet, le seuil du PA, mais également son amplitude, restent inchangés.

Il semblerait que la concentration de sodium intracellulaire soit contrôlée de manière effective par les pompes Na^+/K^+ ATPases, car le blocage de ces pompes par la ouabaine diminue l'amplitude du PA. Cette expérience suggère qu'une activité soutenue, provoquant une large entrée sodium, affecterait peu E_{Na^+} . Que ceci soit vrai pour le compartiment axonal n'est pas hors de propos, car il est limité par un faible diamètre, cependant c'est un argument moins convaincant concernant le compartiment somatique, qui est large, et où il est difficile d'imaginer que les pompes Na^+/K^+ ATPases puissent extruder la totalité du Na^+ superflu, en apport constant via la pipette de patch. En outre, lorsque nous diminuons E_{Na^+} en présence d'ouabaine, l'amplitude du PA est réduite d'environ 7 mV, une valeur bien inférieure à celle attendue. En effet, en modifiant la concentration extracellulaire de Na^+ , nous avons pu obtenir des variations de plus de 20 mV d'amplitude du PA.

Une autre hypothèse pourrait être que la concentration de sodium intracellulaire ait peu d'impact sur l'excitabilité, pour des raisons encore mal comprises. Une explication possible serait que les canaux sodium soient plus sensibles à la concentration de sodium extracellulaire, de par leur propriétés biophysiques, et leur affinité pour le sodium (Lenaeus et al., 2017).

Le fait de savoir pourquoi les variations de Na^+ intracellulaire affectent peu l'excitabilité, que cet effet soit entièrement dû aux pompes Na^+/K^+ ATPases ou à un autre mécanisme reste donc une question ouverte.

Evolution du seuil en fonction du potentiel

Les variations de potentiel sont largement corrélées à la valeur du seuil du potentiel d'action (de Polavieja et al., 2005; Hu et al., 2009; Wilent, 2005). Comment les VGC sont affectés par de telles variations reste cependant vague. Notamment, le rôle de l'inactivation des Na_v selon le potentiel reste peu étudié.

Par des variations de potentiel de durée prolongée (200-300 ms), nous avons fait varier le taux d'inactivation des Na_v , et montrons que le seuil suit une évolution exponentielle à partir du RMP. Une dépolarisation de plus de 10 mV à partir du RMP (-77 mV), induit une élévation du seuil faible (< 2 mV, à -66mV). Puis le seuil augmente plus rapidement en fonction

du potentiel. Ces propriétés d'excitabilité sont essentielles dans l'intégration des entrées synaptiques. Comme il a déjà été mentionné par Azouz et ses collègues, l'excitabilité du neurone est accrue lorsque des inputs synaptiques arrivent rapidement, créant une forte pente de dépolarisation, alors que les canaux Na_V n'ont pas le temps de s'inactiver (Azouz & Gray, 2000). Au contraire une pente de dépolarisation plus lente, laisserait le temps aux canaux Na_V de s'inactiver et réduirait le seuil du PA.

Effet de la TTX et de la DTx-K

La conductance sodium ainsi que la conductance K_{V1} , sont deux forts régulateurs de l'excitabilité (Hu et al., 2009; Storm, 1988; Stuart, Schiller, & Sakmann, 1997, voir aussi l'Annexe 1 : Rama et al., 2017). Nous avons voulu explorer leurs effets sur le seuil du PA en fonction du taux d'inactivation des Na_V selon le potentiel.

Nos résultats montrent que l'effet de la TTX et de la DTx-K sont globalement indépendants du potentiel. En effet, une faible concentration de TTX rehausse les valeurs de seuil obtenues, et l'application de DTx-K les diminuent, sans toutefois modifier leur évolution en fonction du potentiel. En réalité, cet effet est prédit par la théorie (Platkiewicz & Brette, 2010). Dans leur étude de 2010, Platkiewicz et Brette montrent que le seuil du PA varie selon $k(-\ln(h) - \ln(gNa) + \ln(g))$, où k est le facteur de pente de la courbe d'activation des Na_V axonaux, g_{Na} est la conductance totale des canaux sodium axonaux, g est la conductance totale des canaux autre que sodium, et $h(v)$ est la courbe d'inactivation des canaux sodium. D'après cette équation, l'effet de la conductance sodium et potassium agit sur la conductance g_{Na} et la conductance totale g , qui sont dans cette théorie, indépendantes du potentiel. Ainsi, nous confirmons que les conductances Na_V et K_{V1} n'impactent pas l'évolution du seuil, contrairement à l'inactivation des canaux sodium, et leurs effets sont dissociés.

Notons que le fait que la conductance K_{V1} n'ait pas d'impact sur le seuil reste surprenant, car ce canal possède un facteur d'inactivation. Bien que l'inactivation de ce canal soit lente (>1s), 200 à 300 ms sont suffisantes à réduire de manière considérable le courant I_D (cf. Figure 5, Introduction). Ici cependant, il semblerait que ce facteur d'inactivation soit négligeable.

Ceci a des implications sur les propriétés générales d'excitabilité du neurone, dont les canaux sodium au SIA sont majoritairement les $Na_V1.6$ pour toutes les populations de neurones, et ont donc les mêmes propriétés biophysiques (Lorincz & Nusser, 2008). Pour avoir

différents schémas d'excitabilité, les neurones ont en réalité d'autres options que la simple régulation des valeurs de conductances maximales sodium et potassium.

Par exemple, la morphologie du neurone et la position du SIA semblent être deux facteurs régulant l'excitabilité dans un certain nombre d'études (Brette, 2013; Gullledge & Bravo, 2016; Hamada et al., 2016; Kress, Dowling, Eisenman, & Mennerick, 2010; Kuba et al., 2006). Aussi, les canaux Na_v peuvent s'associer à diverses protéines auxiliaires, ou être régulés par des neuromodulateurs induisant leur phosphorylation, et modifiant leurs propriétés d'excitabilité (Evans, Dumitrescu, Kruijssen, Taylor, & Grubb, 2015; Yu & Catterall, 2004).

Toutefois, nous ne pouvons pas ignorer que les différentes conductances exprimées par les neurones sont nombreuses et participent à définir des schémas d'excitabilité complexes. Par exemple, dans notre cas le courant I_D montre un effet sur le seuil du PA à des potentiels inférieurs au potentiel de repos (cf. Figure 5, B). Les canaux K_v1 , étant localisés dans l'axone, au niveau du SIA, il est fort à parier que leur présence hyperpolarise le potentiel de l'axone et joue un rôle essentiel dans l'intégration des entrées synaptiques sous-liminaires, en influençant la disponibilité des Na_v . D'autres conductances peuvent y participer, en particulier, il a été montré dans les neurones pyramidaux L5, que les canaux HCNs présents majoritairement au soma régulent activement le potentiel de repos du neurone et également l'état d'activation des conductances axonales (K_v7) (Hu & Bean, 2018), et probablement aussi la conductance K_v1 . Les variations de potentiels affecteraient donc grandement ces conductances sous-liminaires et il est possible qu'une modélisation plus complexe soit nécessaire pour prendre en compte ce facteur.

Effet de la latence

La latence du PA est un paramètre en étroite relation avec la pente de dépolarisation, elle-même corrélée à la valeur du seuil du PA.

Nous montrons que l'excitabilité est réduite à une latence de 50 ms, en comparaison à une latence plus courte de 10 ms. En effet, le seuil du PA se dépolarise d'environ 4 mV. Le neurone favorise donc les entrées synaptiques synchronisées qui dépolarisent le neurone rapidement, comme discuté plus haut. Nos expériences précédentes suggèrent que l'inactivation des Na_v et la conductance K_v1 sont les acteurs de cet effet.

Effet des conductances K_v1 et Na_v

Nous avons regardé comment les conductances sodium et potassium K_v1 sont modulées par la latence et impactent l'excitabilité du neurone.

Nous montrons que le courant I_D participe à cette réduction d'excitabilité à une latence de 50 ms. En effet, bloquer ce courant hyperpolarise le seuil du PA d'environ 4 mV. Aussi, les toxines utilisées, la DTx-K (spécifique des $K_v1.1$) et la DTx-I (spécifique des $K_v1.1, 1.2, 1.6$), ont montré un effet similaire sur le seuil, suggérant que le courant I_D est supporté par les sous-unités $K_v1.1$ dans les neurones pyramidaux.

A une courte latence (10 ms), le courant I_D n'a pas d'impact sur l'excitabilité. Ceci est dû à un fort courant sodium qui masque ce courant potassium, qui est à nouveau visible après une application modérée de TTX (50 nM).

Notons une inconsistance avec les données précédentes qui peut paraître troublante. En effet, dans notre expérience sur la mesure du seuil en fonction du potentiel (cf. Figure 5) l'effet du courant I_D est présent dès -82 mV. Cependant, les données sont manquantes à partir de -66 mV, en raison du protocole utilisé : l'application de DTx-K rend les neurones plus excitables et il est impossible d'appliquer le protocole de dépolarisation sans obtenir de PA sur ce laps de temps. Remarquons aussi, qu'en générant un PA avec un créneau de courant de 10 ms, le seuil moyen du PA est d'environ -61 mV, soit une valeur bien plus dépolarisée. Nous avons donc une discontinuité dans l'étude du courant I_D en fonction du potentiel.

Nos données montrent en réalité que le courant I_D entre en compétition avec le courant I_{Na} dans une fenêtre de potentiel ou temporelle bien précise. Le courant I_D est visible lorsque la conductance sodium est faible, soit à des potentiels proches du RMP en raison d'une faible ouverture des Na_v , soit à une latence longue (50 ms) dû à leur forte inactivation. Aussi, à une latence de 10 ms, les conditions d'ouverture et d'inactivation des Na_v semblent favoriser un courant Na^+ fort, à même de masquer le courant potassium I_D (cf. Figure 8).

Relevons la forte inactivation des canaux sodium à une longue latence. En effet, la réduction du courant sodium nécessaire à démasquer le courant I_D , a nécessité l'application de 50 nM de TTX, une concentration capable de réduire le courant sodium à 80% (Madeja, 2000; Seutin, & Engel, 2011). Malgré cela, l'effet de l'inactivation des Na_v sur le seuil a un effet relativement faible, une hyperpolarisation d'environ -1,5 mV lorsque le courant I_D est bloqué par l'application de DTx-K, au lieu des -4, 5 mV en condition contrôle, montrant que cette

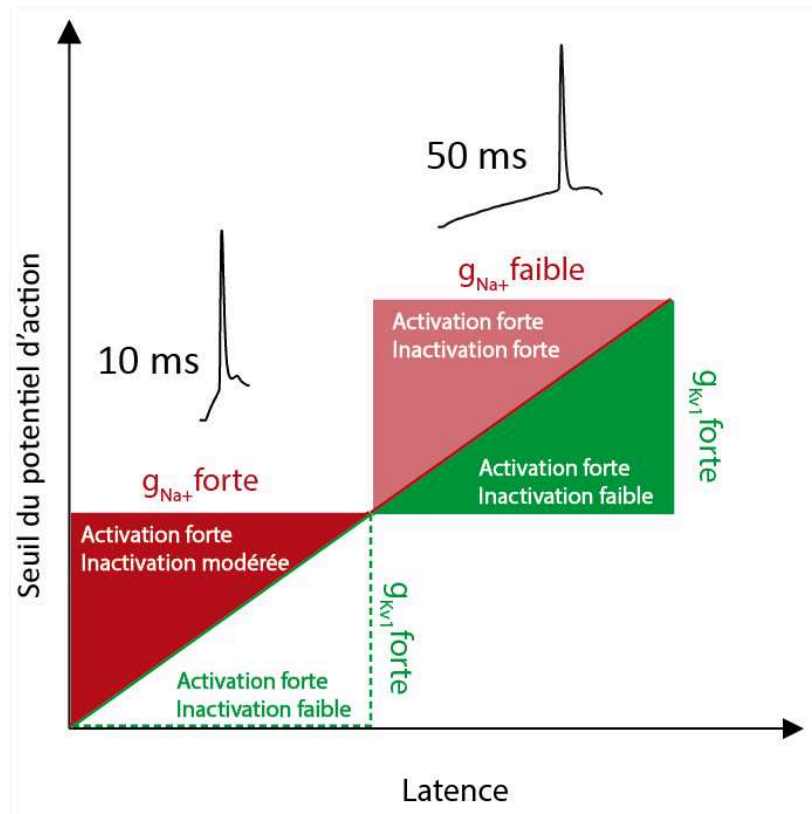


Figure 8. L'état des conductances sodium et potassium K_v1 en fonction de la latence détermine le seuil du potentiel d'action.

Schéma récapitulatif représentant l'état des conductances sodium (g_{Na}) et potassium K_v1 (g_{Kv1}) en fonction de la latence, et leur effet sur le seuil du PA. Les triangles rouge et vert représentent l'état d'activation et d'inactivation des conductances sodium, et potassium K_v1 respectivement, conduisant à une conductance (g) faible, modérée ou forte. A une latence de 10 ms, la forte conductance sodium masque la forte conductance potassium K_v1 (en pointillé).

baisse d'excitabilité est majoritairement soutenue par le courant I_D . D'ailleurs, la baisse d'excitabilité induite par le courant I_D est telle, que dans une grande majorité des cas, pour des latences plus longues (100 ms), un plateau de potentiel apparaît et restreint, voire entrave complètement la génération de PAs (données non incluses).

L'hyperpolarisation invariable du courant I_D , en fonction de différentes concentrations de TTX, à longue latence, indique une absence de compétition entre ces deux courants. L'effet du courant I_D dans ces conditions expérimentales est encore une fois, indépendant de la conductance sodium. Nous confirmons par-là nos résultats précédents.

Toutefois, notons que ceci n'est vrai pas vrai à une latence courte de 10 ms, où les conductances N_{av} et K_{v1} entrent en compétition, et font varier localement l'évolution du seuil du PA en fonction du potentiel, par un effet qui s'ajouterait à celui de l'inactivation des N_{av} . Ceci apparaît lorsque le courant I_D devient masqué, pour des latences très courtes (10 ms) et/ou lorsque des potentiels supérieurs à -66 mV sont atteints, auxquels nos neurones se sont montrés particulièrement excitables, et où les quelques données que nous avons laissés à croire qu'en effet le courant I_D n'impacte plus l'excitabilité (cf. Figure 5, B, non significatif pour n insuffisant). Cette disparité au modèle théorique discuté précédemment, viendrait du fait que la conductance totale des VGC soit un paramètre qui varie grandement en fonction du potentiel aux valeurs proches du RMP, et donc dépend du potentiel.

Dans les enregistrements *in vivo*, les neurones étant continuellement dépolarisés par les nombreuses entrées synaptiques, il est possible que ce facteur puisse être négligé, et de considérer que la conductance K_{v1} , soit proche de sa conductance maximale. Ceci n'est pourtant pas le cas dans nos conditions expérimentales, et la dépendance de la conductance K_{v1} au potentiel permettrait d'ajuster plus finement les prédictions du seuil du PA.

C. Perspectives expérimentales

Les observations récentes recensant la position de l'axone au sein du neurone ont relevé une proportion non négligeable d'axones émergeant non pas du soma mais d'une dendrite, et ceci pour plusieurs populations de neurones (Kole & Brette, 2018). En particulier, Hamada et ses collègues ont répertorié 40% d'axones débutant sur une branche dendritique dans les neurones pyramidaux L5. Dans nos expériences de pincements, de tels neurones ont été écartés. Pourtant, il serait intéressant d'étudier l'effet de la résistance axiale sur de tels neurones. En effet, pincer ce tronc dendritique aurait probablement permis de faciliter la manipulation, de par son diamètre plus grand, et d'autre part, les pincements dendritiques réalisés par Bekkers et ses collègues ont montré un effet réversible, ce qui n'a pas été le cas avec nos manipulations (Bekkers & Häusser, 2007).

Les modifications de la solution intracellulaire ont montré également un effet significatif. D'autres modifications de cette solution auraient été possibles. Par exemple, y incorporer du Dextran, une grosse molécule ayant un poids moléculaire élevé, pour modifier sa viscosité et limiter la mobilité des ions.

L'étude sur les canaux sodium et potassium K_v1 permet d'éclaircir leur impact respectif sur le seuil du potentiel d'action. Un modèle neuronal théorique, prenant en compte ces nouvelles données, permettrait de compléter ces travaux en illustrant la compétition entre ces deux conductances. D'autre part, les expériences mesurant la relation entre le seuil du PA et les facteurs E_{Na^+} et g_{Na} , pourrait également servir à ajuster les modèles préexistants.

Conclusion

Durant cette thèse nous avons clarifié les déterminants du seuil du potentiel d'action. Le nombre de facteurs importants impactant l'excitabilité, ainsi que le couplage du compartiment somatodendritique et du compartiment axonal à l'initiation en font un sujet complexe. Un nombre croissant de données ont mis en avant deux paramètres clés manquant de preuves expérimentales : la résistance axiale et l'inactivation des canaux sodium (Brette, 2013; Platkiewicz & Brette, 2011).

Dans la première partie de ma thèse, nous avons étudié le rôle de la résistance axiale (R_a) sur le seuil du potentiel d'action. Nous avons mis en évidence que les variations de diamètre du tronc axonal ainsi que la composition ionique intracellulaire impactent l'excitabilité du neurone. Ces deux manipulations impactent directement le facteur de résistance axiale entre le compartiment somatique et le site d'initiation du potentiel d'action (SIA), et leur effet est prédit par la théorie. Nous montrons, pour la première fois, des preuves expérimentales claires fortifiant l'idée que la R_a est un paramètre essentiel de l'excitabilité. Ceci a des implications directes sur la relation entre l'excitabilité du neurone et sa géométrie qui a récemment été explorée par plusieurs groupes de recherche. Notamment, sans considérer la présence de facteurs confondants, notre étude suggère qu'un SIA situé distalement, que ce soit de manière intrinsèque ou suite à une relocalisation après un protocole de stimulation, favoriserait une excitabilité accrue.

Dans la deuxième partie de ma thèse, nous avons décrit de nombreux paramètres contrôlant le seuil de génération du potentiel d'action : g_{Na} , E_{Na+} , le taux d'inactivation des Na_v , ainsi que la présence d'autres conductances, en particulier, celles présentes aux potentiels sous-liminaires comme nous l'exposons ici avec la conductance K_v1 . Aussi, d'après nos résultats, c'est l'inactivation des Na_v qui définit globalement l'évolution du seuil en fonction du potentiel et est un fort prédicteur du seuil du potentiel d'action. Nous confirmons par-là une hypothèse fortement soutenue par la théorie.

D'autre part, la latence du potentiel d'action se révèle être un moyen efficace de filtrer les entrées synaptiques. En jeu, l'inactivation des canaux sodium, mais également la présence des canaux K_v1 . De manière singulière, dans les neurones pyramidaux L5, nous montrons

qu'une compétition entre la conductance Na_v et K_v1 favorise les entrées synaptiques des latences réduites avoisinant les 5 à 10 ms. Le mécanisme résulte des propriétés biophysiques de ces canaux, et de leur densité. Alors que le courant I_D réduit l'excitabilité et dépolarise le seuil du PA ; à ces latences spécifiques, une forte conductance sodium masque son effet.

Ainsi nous avons détaillés différents paramètres définissant le seuil du potentiel d'action et avons permis de mieux comprendre leur rôle respectif. En outre, nous confirmons expérimentalement le rôle de la résistance axiale et de l'inactivation des canaux sodium sur l'excitabilité.

Bibliographie

- Aljadeff, J., Segev, R., Berry, M. J., & Sharpee, T. O. (2013). Spike Triggered Covariance in Strongly Correlated Gaussian Stimuli. *PLoS Computational Biology*, 9(9).
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003206>
- Araki, T., & Otani, T. (1955). Response of single motoneurons to direct stimulation in toad's spinal cord. *Journal of Physiology*.
- Azouz, R., & Gray, C. M. (2000). Dynamic spike threshold reveals a mechanism for synaptic coincidence detection in cortical neurons in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(14), 8110–8115.
<https://doi.org/10.1073/pnas.130200797>
- Azouz, R., & Gray, C. M. (2003). Adaptive coincidence detection and dynamic gain control in visual cortical neurons in vivo. *Neuron*, 37(3), 513–523. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)01186-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)01186-8)
- Baranauskas, G., David, Y., & Fleidervish, I. A. (2013). Spatial mismatch between the Na⁺ flux and spike initiation in axon initial segment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(10), 4051–4056. <https://doi.org/10.1073/pnas.1215125110>
- Baranauskas, G., & Martina, M. (2006). Sodium Currents Activate without a Hodgkin and Huxley-Type Delay in Central Mammalian Neurons. *J. Neurosci.*, 26(2), 671–684.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.2283-05.2006>
- Baranauskas, G., Mukovskiy, A., Wolf, F., & Volgushev, M. (2010). The determinants of the onset dynamics of action potentials in a computational model. *Neuroscience*, 167(4), 1070–1090.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.02.072>
- Barnes, A. P., & Polleux, F. (2009). Establishment of Axon-Dendrite Polarity in Developing Neurons. *Annual Review of Neuroscience*, 32(1), 347–381.
<https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.060407.125536>
- Bean, B. P. (2007). The action potential in mammalian central neurons. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(6), 451–465. <https://doi.org/10.1038/nrn2148>
- Bekkers, J. M., & Häusser, M. (2007). Targeted dendrotomy reveals active and passive contributions of the dendritic tree to synaptic integration and neuronal output. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(27), 11447–11452.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0701586104>
- Bialowas, A., Rama, S., Zbili, M., Marra, V., Fronzaroli-Molinieres, L., Ankri, N., ... Debanne, D. (2015). Analog modulation of spike-evoked transmission in CA3 circuits is determined by axonal Kv1.1 channels in a time-dependent manner. *European Journal of Neuroscience*, 41(3), 293–304.
<https://doi.org/10.1111/ejn.12787>
- Brette, R. (2010). A threshold equation for action potential initiation. *PLoS Computational Biology*, 6(7), e1000850. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000850>
- Brette, R. (2013). Sharpness of Spike Initiation in Neurons Explained by Compartmentalization. *PLoS Computational Biology*, 9(12), e1003338. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003338>
- Brette, R. (2015a). Philosophy of the spike: rate-based vs. spike-based theories of the brain, 9(November), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2015.00151>
- Brette, R. (2015b). What Is the Most Realistic Single-Compartment Model of Spike Initiation? *PLOS Computational Biology*, 11(4), e1004114. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004114>
- Brette, R., Rudolph, M., & Carnevale, T. (2007). Simulation of networks of spiking neurons: a review of tools and strategies. *Journal of Computational ...*, 23(3), 349–398.
<https://doi.org/10.1007/s10827-007-0038-6.Simulation>
- Brock, L. G., Coombs, J. S., & Eccles, J. C. (1953). Intracellular recording from antidromically activated motoneurons. *Journal of Physiology*, (1953), 429–461.
- Campanac, E., Gassel, C., Baude, A., Rama, S., Ankri, N., & Debanne, D. (2013). Enhanced intrinsic excitability in basket cells maintains excitatory-inhibitory balance in hippocampal circuits.

- Neuron*, 77(4), 712–722. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.020>
- Catterall, W. A. (2012). Voltage-gated sodium channels at 60: Structure, function and pathophysiology. *Journal of Physiology*, 590(11), 2577–2589. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.224204>
- Catterall, W. A., Raman, I. M., Robinson, H. P. C., Sejnowski, T. J., & Paulsen, O. (2012). The Hodgkin-Huxley Heritage: From Channels to Circuits. *Journal of Neuroscience*, 32(41), 14064–14073. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3403-12.2012>
- Clark, B. D., Goldberg, E. M., & Rudy, B. (2009). Electrogenic tuning of the axon initial segment. *Neuroscientist*, 15(6), 651–668. <https://doi.org/10.1177/1073858409341973>
- Colbert, C. M., & Johnston, D. (1996). Axonal action-potential initiation and Na⁺ channel densities in the soma and axon initial segment of subicular pyramidal neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16(21), 6676–6686. <https://doi.org/8824308>
- Colwell, L. J., & Brenner, M. P. (2009). Action potential initiation in the Hodgkin-Huxley model. *PLoS Computational Biology*, 5(1), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000265>
- Coombs, J. S., Curtis, D. R., & Eccles, J. C. (1957). The generation of impulses in motoneurons. *Journal of Physiology*, 232–249.
- Cudmore, R. H., Fronzaroli-Molinieres, L., Giraud, P., & Debanne, D. (2010). Spike-time precision and network synchrony are controlled by the homeostatic regulation of the D-type potassium current. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(38), 12885–12895. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0740-10.2010>
- de Polavieja, G. G., Harsch, A., Kleppe, I., Robinson, H. P. C., & Juusola, M. (2005). Stimulus history reliably shapes action potential waveforms of cortical neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(23), 5657–5665. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0242-05.2005>
- Debanne, D. (2004). Information processing in the axon. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(4), 304–316. <https://doi.org/10.1038/nrn1397>
- Debanne, D., Bialowas, A., & Rama, S. (2013). What are the mechanisms for analogue and digital signalling in the brain? *Nature Reviews. Neuroscience*, 14(1), 63–69. <https://doi.org/10.1038/nrn3361>
- Debanne, D., Campanac, E., Bialowas, A., Carlier, E., & Alcaraz, G. (2011). Axon Physiology. *Physiological Reviews*, 91(2), 555–602. <https://doi.org/10.1152/physrev.00048.2009>
- Dodson, P. D., Barker, M. C., & Forsythe, I. D. (2002). Two heteromeric Kv1 potassium channels differentially regulate action potential firing. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(16), 6953–6961. <https://doi.org/20026709>
- Dubey, P., Jorgenson, K., & Roy, S. (2018). Actin Assemblies in the Axon Shaft – some Open Questions. *Current Opinion in Neurobiology*, 51, 163–167. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.06.012>
- Egri, C., & Ruben, P. C. (2012). Action Potentials: Generation and Propagation. *ELS*, (April). <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000278.pub2>
- Elmslie, K. S. (2010). Action Potential: Ionic Mechanisms. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1–10. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000002.pub2>
- Engel, D., & Jonas, P. (2005). Presynaptic action potential amplification by voltage-gated Na⁺ channels in hippocampal mossy fiber boutons. *Neuron*, 45(3), 405–417. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.12.048>
- Evans, M. D., Dumitrescu, A. S., Kruijssen, D. L. H., Taylor, S. E., & Grubb, M. S. (2015). Rapid Modulation of Axon Initial Segment Length Influences Repetitive Spike Firing. *Cell Reports*, 13(6), 1233–1245. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.066>
- Evans, M. D., Sammons, R. P., Lebron, S., Dumitrescu, A. S., Watkins, T. B., Uebele, V. N., ... Grubb, M. S. (2013). Calcineurin signaling mediates activity-dependent relocation of the axon initial segment. *J Neurosci*, 33(16), 6950–6963. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0277-13.2013>
- Fatt, P. (1957). Sequence of events in synaptic activation of a motoneurone. *Journal of Physiology*.

- Fernandez, F. R., & White, J. A. (2010). Gain Control in CA1 Pyramidal Cells Using Changes in Somatic Conductance. *Journal of Neuroscience*, *30*(1), 230–241. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3995-09.2010>
- Fleiderovich, I. a, Lasser-Ross, N., Gutnick, M. J., & Ross, W. N. (2010). Na⁺ imaging reveals little difference in action potential-evoked Na⁺ influx between axon and soma. *Nature Neuroscience*, *13*(7), 852–860. <https://doi.org/10.1038/nn.2574>
- Fontaine, B., Peña, J. L., & Brette, R. (2014). Spike-Threshold Adaptation Predicted by Membrane Potential Dynamics In Vivo. *PLoS Computational Biology*, *10*(4), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003560>
- Fourcaud-Trocme, N., & Brunel, N. (2005). Dynamics of the instantaneous firing rate in response to changes in input statistics. *Journal of Computational Neuroscience*, *18*(3), 311–321. <https://doi.org/10.1007/s10827-005-0337-8>
- Fourcaud-trocme, N., Hansel, D., Vreeswijk, C. Van, & Brunel, N. (2003). How Spike Generation Mechanisms Determine the Neuronal Response to Fluctuating Inputs. *The Journal of Neuroscience*, *23*(37), 11628–11640.
- Foust, A. J., Yu, Y., Popovic, M., Zecevic, D., & McCormick, D. a. (2011). Somatic membrane potential and Kv1 channels control spike repolarization in cortical axon collaterals and presynaptic boutons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *31*(43), 15490–15498. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2752-11.2011>
- Fricker, D., Verheugen, J. A. H., & Miles, R. (1999). Cell-attached measurements of the firing threshold of rat hippocampal neurones. *Journal of Physiology*, *517*(3), 791–804. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.0791s.x>
- Ganmor, E., Segev, R., & Schneidman, E. (2015). A thesaurus for a neural population code. *ELife*, *4*(September2015), 1–19. <https://doi.org/10.7554/eLife.06134>
- Geiger, J. R., & Jonas, P. (2000). Dynamic control of presynaptic Ca²⁺ inflow by fast-inactivating K⁺ channels in hippocampal mossy fiber boutons. *Neuron*, *28*(3), 927–939. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11163277>
- Gentet, L. J., & Williams, S. R. (2007). Dopamine Gates Action Potential Backpropagation in Midbrain Dopaminergic Neurons. *Journal of Neuroscience*, *27*(8), 1892–1901. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5234-06.2007>
- Glazebrook, P. A., Ramirez, A. N., Schild, J. H., Shieh, C., Doan, T., Wible, B. A., & Kunze, D. L. (2002). excitability of rat visceral sensory neurons, 467–482. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.200>
- Goldberg, E. M., Clark, B. D., Zagha, E., Nahmani, M., Erisir, A., & Rudy, B. (2008). K⁺ Channels at the Axon Initial Segment Dampen Near-Threshold Excitability of Neocortical Fast-Spiking GABAergic Interneurons. *Neuron*, *58*(3), 387–400. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.03.003>
- Grubb, M. S., & Burrone, J. (2010). Activity-dependent relocation of the axon initial segment fine-tunes neuronal excitability. *Nature*, *465*(7301), 1070–1074. <https://doi.org/10.1038/nature09160>
- Gulledge, A. T., & Bravo, J. J. (2016). Neuron Morphology Influences Axon Initial. *Eneuro*, *3*(February), 1–24.
- Gutkin, B., & Ermentrout, G. B. (2006). Neuroscience: Spikes too kinky in the cortex? *Nature*, *440*(7087), 999–1000. <https://doi.org/10.1038/440999a>
- Hamada, M. S., Goethals, S., De Vries, S. I., Brette, R., Kole, M. H. P., Vries, S. I. De, ... Kole, M. H. P. (2016). Covariation of axon initial segment location and dendritic tree normalizes the somatic action potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(51), 1–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1607548113>
- Hamada, M. S., Popovic, M. A., & Kole, M. H. (2017). Loss of saltation and presynaptic action potential failure in demyelinated axons. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *11*(February), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00045>
- Hatch, R. J., Mendis, G. D. C., Kaila, K., Reid, C. A., & Petrou, S. (2017). Gap Junctions Link Regular-Spiking and Fast-Spiking Interneurons in Layer 5 Somatosensory Cortex. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *11*(July), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00204>

- Häusser, M., Stuart, G., Racca, C., & Sakmann, B. (1995). Axonal initiation and active dendritic propagation of action potentials in substantia nigra neurons. *Neuron*, *15*(3), 637–647. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90152-3](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90152-3)
- Henze, D. A., & Buzsáki, G. (2001). Action potential threshold of hippocampal pyramidal cells in vivo is increased by recent spiking activity. *Neuroscience*, *105*(1), 121–130. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(01\)00167-1](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00167-1)
- Higgs, M. H., & Spain, W. J. (2011). Kv1 channels control spike threshold dynamics and spike timing in cortical pyramidal neurones. *The Journal of Physiology*, *589*(Pt 21), 5125–5142. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.216721>
- Hodgkin, A. L., & Huxley, A. F. (1952a). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *Journal of Physiology*, 500–544. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1952.sp004764>
- Höfflin, F., Jack, A., Riedel, C., Mack-Bucher, J., Roos, J., Corcelli, C., ... Engelhardt, M. (2017). Heterogeneity of the Axon Initial Segment in Interneurons and Pyramidal Cells of Rodent Visual Cortex. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *11*(November), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00332>
- Hoffman, D. a, Magee, J. C., Colbert, C. M., & Johnston, D. (1997). K⁺ channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Nature*, *387*(6636), 869–875. <https://doi.org/10.1038/43119>
- Hoppa, M. B., Gouzer, G., Armbruster, M., & Ryan, T. A. (2014). Control and plasticity of the presynaptic action potential waveform at small CNS nerve terminals. *Neuron*, *84*(4), 778–789. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.09.038>
- Houston, C. M., Diamanti, E., Diamantaki, M., Kutsarova, E., Cook, A., Sultan, F., & Brickley, S. G. (2017). Exploring the significance of morphological diversity for cerebellar granule cell excitability. *Scientific Reports*, *7*(October 2016), 1–16. <https://doi.org/10.1038/srep46147>
- Hu, W., & Bean, B. P. (2018). Differential Control of Axonal and Somatic Resting Potential by Voltage-Dependent Conductances in Cortical Layer 5 Pyramidal Neurons. *Neuron*, *97*(6), 1315–1326.e3. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.02.016>
- Hu, W., & Shu, Y. (2012). Axonal bleb recording. *Neuroscience Bulletin*, *28*(4), 342–350. <https://doi.org/10.1007/s12264-012-1247-1>
- Hu, W., Tian, C., Li, T., Yang, M., Hou, H., & Shu, Y. (2009). Distinct contributions of Na(v)1.6 and Na(v)1.2 in action potential initiation and backpropagation. *Nature Neuroscience*, *12*(8), 996–1002. <https://doi.org/10.1038/nn.2359>
- Jan, L. Y., & Jan, Y. N. (2012). Voltage-gated potassium channels and the diversity of electrical signalling. *The Journal of Physiology*, *590*(Pt 11), 2591–2599. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.224212>
- Jones, S. L., & Svitkina, T. M. (2016). Axon Initial Segment Cytoskeleton: Architecture, Development, and Role in Neuron Polarity. *Neural Plasticity*, *2016*. <https://doi.org/10.1155/2016/6808293>
- Juusola, M., Robinson, H. P. C., & De Polavieja, G. G. (2007). Coding with spike shapes and graded potentials in cortical networks. *BioEssays*, *29*(2), 178–187. <https://doi.org/10.1002/bies.20532>
- Katz, E., Stoler, O., Scheller, A., Khrapunsky, Y., Goebbels, S., Kirchhoff, F., ... Fleidervish, I. A. (2018). Role of sodium channel subtype in action potential generation by neocortical pyramidal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *201720493*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1720493115>
- Kirchheim, F., Tinnes, S., Haas, C. A., Stegen, M., & Wolfart, J. (2013). Regulation of action potential delays via voltage-gated potassium Kv1.1 channels in dentate granule cells during hippocampal epilepsy. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *7*(December), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00248>
- Kirizis, T., Kerti-Szigeti, K., Lorincz, A., & Nusser, Z. (2014). Distinct axo-somato-dendritic distributions of three potassium channels in CA1 hippocampal pyramidal cells. *European Journal of Neuroscience*, *39*(11), 1771–1783. <https://doi.org/10.1111/ejn.12526>
- Kobayashi, T., Storrie, B., Simons, K., & Dotti, C. G. (1992). A functional barrier to movement of lipids

- in polarized neurons. *Nature*, 359(6396), 647–650. <https://doi.org/10.1038/359647a0>
- Koch, C., Bernander, Ö., & Douglas, R. J. (1995). Do neurons have a voltage or a current threshold for action potential initiation? *Journal of Computational Neuroscience*, 2(1), 63–82. <https://doi.org/10.1007/BF00962708>
- Kole, M. H., & Brette, R. (2018). The electrical significance of axon location diversity. *Current Opinion in Neurobiology*, 51, 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.02.016>
- Kole, M. H. P., Ilschner, S. U., Kampa, B. M., Williams, S. R., Ruben, P. C., & Stuart, G. J. (2008). Action potential generation requires a high sodium channel density in the axon initial segment. *Nature Neuroscience*, 11(2), 178–186. <https://doi.org/10.1038/nn2040>
- Kole, M. H. P., Letzkus, J. J., & Stuart, G. J. (2007). Axon initial segment Kv1 channels control axonal action potential waveform and synaptic efficacy. *Neuron*, 55(4), 633–647. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.07.031>
- Kole, M. H. P., & Stuart, G. J. (2012). Signal Processing in the Axon Initial Segment. *Neuron*, 73(2), 235–247. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.01.007>
- Kress, G. J., Dowling, M. J., Eisenman, L. N., & Mennerick, S. (2010). Axonal sodium channel distribution shapes the depolarized action potential threshold of dentate granule neurons. *Hippocampus*, 20(4), 558–571. <https://doi.org/10.1002/hipo.20667>
- Kress, G. J., Dowling, M. J., Meeks, J. P., & Mennerick, S. (2008). High Threshold, Proximal Initiation, and Slow Conduction Velocity of Action Potentials in Dentate Granule Neuron Mossy Fibers. *Journal of Neurophysiology*, 100(1), 281–291. <https://doi.org/10.1152/jn.90295.2008>
- Kress, G. J., & Mennerick, S. (2009). Action potential initiation and propagation: Upstream influences on neurotransmission. *Neuroscience*, 158(1), 211–222. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.03.021>
- Kress, G. J., & Mennerick, S. (2010). NIH Public Access. *Psychiatry: Interpersonal and Biological Processes*, 158(1), 211–222. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.03.021>
- Kuba, H., Ishii, T. M., & Ohmori, H. (2006). Axonal site of spike initiation enhances auditory coincidence detection. *Nature*, 444(7122), 1069–1072. <https://doi.org/10.1038/nature05347>
- Kuba, H., & Ohmori, H. (2009). Roles of axonal sodium channels in precise auditory time coding at nucleus magnocellularis of the chick. *Journal of Physiology*, 587(1), 87–100. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.162651>
- Lecar, H., & Nossal, R. (1971). Theory of threshold fluctuations in nerves. I. Relationships between electrical noise and fluctuations in axon firing. *Biophysical Journal*, 11(12), 1048–1067. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(71\)86277-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(71)86277-X)
- Lenaeus, M. J., Gamal El-Din, T. M., Ing, C., Ramanadane, K., Pomès, R., Zheng, N., & Catterall, W. A. (2017). Structures of closed and open states of a voltage-gated sodium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(15), E3051–E3060. <https://doi.org/10.1073/pnas.1700761114>
- Leterrier, C. (2016). *The Axon Initial Segment, 50 Years Later: A Nexus for Neuronal Organization and Function*. *Current Topics in Membranes* (Vol. 77). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2015.10.005>
- Leterrier, C. (2018). The axon initial segment: an updated viewpoint. *The Journal of Neuroscience*, 38(9), 1922–1937. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1922-17.2018>
- Lezmy, J., Lipinsky, M., Khrapunsky, Y., Patrich, E., Shalom, L., Peretz, A., ... Attali, B. (2017). M-current inhibition rapidly induces a unique CK2-dependent plasticity of the axon initial segment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201708700. <https://doi.org/10.1073/pnas.1708700114>
- Lorincz, A., & Nusser, Z. (2008). Cell-Type-Dependent Molecular Composition of the Axon Initial Segment. *Journal of Neuroscience*, 28(53), 14329–14340. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4833-08.2008>
- Lorincz, A., & Nusser, Z. (2010). Molecular identity of dendritic voltage-gated sodium channels. *Science*, 328, 906–910. <https://doi.org/10.1126/science.1187958>
- Madeja, M. (2000). Do neurons have a reserve of sodium channels for the generation of action

- potentials? A study on acutely isolated CA1 neurons from the guinea-pig hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, 12(August 1999), 1–7. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00871.x>
- Mainen, Z. F., Joerges, J., Huguenard, J. R., & Sejnowski, T. J. (1995). A model of spike initiation in neocortical pyramidal neurons. *Neuron*, 15(6), 1427–1439. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90020-9](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90020-9)
- McCormick, D. a, Shu, Y., & Yu, Y. (2007). Neurophysiology: Hodgkin and Huxley model--still standing? *Nature*, 445(January), E1-E2; discussion E2-E3. <https://doi.org/10.1038/nature05523>
- Michalikova, M., Remme, M. W. H., & Kempter, R. (2017). Spikelets in Pyramidal Neurons : Action Potentials Initiated in the Axon Initial Segment That Do Not Activate the Soma, 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005237>
- Moore, J. W., Stockbridge, N., & Westerfield, M. (1983). On the site of impulse in a neurone. *The Journal f Physiology*, 183–200.
- Muir, J., & Kittler, J. T. (2014). Plasticity of GABAA receptor diffusion dynamics at the axon initial segment. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(June), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00151>
- Naundorf, B., Wolf, F., & Volgushev, M. (2006). Unique features of action potential initiation in cortical neurons. *Nature*, 440(7087), 1060–1063. <https://doi.org/10.1038/nature04610>
- Neishabouri, A., & Faisal, A. A. (2014). Axonal Noise as a Source of Synaptic Variability. *PLoS Computational Biology*, 10(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003615>
- Öz, P., Huang, M., & Wolf, F. (2015). Action potential initiation in a multi-compartmental model with cooperatively gating Na channels in the axon initial segment. *Journal of Computational Neuroscience*. <https://doi.org/10.1007/s10827-015-0561-9>
- Palmer, L. M., & Stuart, G. J. (2006). Site of action potential initiation in layer 5 pyramidal neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(6), 1854–1863. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4812-05.2006>
- Peña, J. L., & Konishi, M. (2002). From postsynaptic potentials to spikes in the genesis of auditory spatial receptive fields. *The Journal of Neuroscience*, 22(13), 5652–5658. <https://doi.org/20026572>
- Platkiewicz, J., & Brette, R. (2010). A threshold equation for action potential initiation. *PLoS Computational Biology*, 6(7), 25. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000850>
- Platkiewicz, J., & Brette, R. (2011). Impact of fast sodium channel inactivation on spike threshold dynamics and synaptic integration. *PLoS Computational Biology*, 7(5), e1001129. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1001129>
- Popovic, M. a, Foust, A. J., McCormick, D. a, & Zecevic, D. (2011). The spatio-temporal characteristics of action potential initiation in layer 5 pyramidal neurons: a voltage imaging study. *The Journal of Physiology*, 589(Pt 17), 4167–4187. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.209015>
- Rama, S., Zbili, M., Bialowas, A., Fronzaroli-Molinieres, L., Ankri, N., Carlier, E., ... Debanne, D. (2015). Presynaptic hyperpolarization induces a fast analogue modulation of spike-evoked transmission mediated by axonal sodium channels. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms10163>
- Rama, S., Zbili, M., & Debanne, D. (2018). Signal propagation along the axon. *Current Opinion in Neurobiology*, 51, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.02.017>
- Rama, S., Zbili, M., Fékété, A., Tapia, M., Benitez, M. J., Boumedine, N., ... Debanne, D. (2017). The role of axonal Kv1 channels in CA3 pyramidal cell excitability. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00388-1>
- Rasband, M. N. (2010). The axon initial segment and the maintenance of neuronal polarity. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(8), 552–562. <https://doi.org/10.1038/nrn2852>
- Rush, A. M., Dib-Hajj, S. D., & Waxman, S. G. (2005). Electrophysiological properties of two axonal sodium channels, Nav1.2 and Nav1.6, expressed in mouse spinal sensory neurones. *Journal of Physiology*, 564(3), 803–815. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.083089>
- Schmidt-Hieber, C., & Bischofberger, J. (2010). Fast Sodium Channel Gating Supports Localized and

- Efficient Axonal Action Potential Initiation. *Journal of Neuroscience*, 30(30), 10233–10242. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6335-09.2010>
- Scott, R. S., Henneberger, C., Padmashri, R., Anders, S., Jensen, T. P., & Rusakov, D. A. (2014). Neuronal adaptation involves rapid expansion of the action potential initiation site. *Nature Communications*, 5(May), 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms4817>
- Sekerli, M., Member, S., Negro, C. A. Del, Lee, R. H., Butera, R. J., & Member, S. (2004). Neuronal Time-Series : New Metrics and Evaluation of Methodologies, 51(9), 1665–1672.
- Sengupta, B., Stemmler, M., Laughlin, S. B., & Niven, J. E. (2010). Action potential energy efficiency varies among neuron types in vertebrates and invertebrates. *PLoS Computational Biology*, 6(7), 35. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000840>
- Seutin, V., & Engel, D. (2010). Differences in Na⁺ conductance density and Na⁺ channel functional properties between dopamine and GABA neurons of the rat substantia nigra. *Journal of Neurophysiology*, 103(6), 3099–3114. <https://doi.org/10.1152/jn.00513.2009>
- Seutin, V., Engel, D., Seutin, V., & Engel, D. (2011). Differences in Na + Conductance Density and Na + Channel Functional Properties Between Dopamine and GABA Neurons of the Rat Substantia Nigra Differences in Na z Conductance Density and Na z Channel Functional Properties Between Dopamine and GABA Neurons o, (March 2010), 3099–3114. <https://doi.org/10.1152/jn.00513.2009>
- Shu, Y., Duque, A., Yu, Y., Haider, B., & McCormick, D. A. (2007). Properties of action-potential initiation in neocortical pyramidal cells: evidence from whole cell axon recordings. *Journal of Neurophysiology*, 97(1), 746–760. <https://doi.org/10.1152/jn.00922.2006>
- Shu, Y., Hasenstaub, A., Badoual, M., Bal, T., & McCormick, D. a. (2003). Barrages of synaptic activity control the gain and sensitivity of cortical neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(32), 10388–10401. <https://doi.org/23/32/10388> [pii]
- Shu, Y., Yu, Y., Yang, J., & McCormick, D. a. (2007). Selective control of cortical axonal spikes by a slowly inactivating K⁺ current. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(27), 11453–11458. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702041104>
- Song, A. hong, Wang, D., Chen, G., Li, Y., Luo, J., Duan, S., & Poo, M. ming. (2009). A Selective Filter for Cytoplasmic Transport at the Axon Initial Segment. *Cell*, 136(6), 1148–1160. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.016>
- Spampanato, J., Escayg, A., Meisler, M. H., & Goldin, A. L. (2001). Functional effects of two voltage-gated sodium channel mutations that cause generalized epilepsy with febrile seizures plus type 2. *J Neurosci*, 21(19), 7481–7490. <https://doi.org/21/19/7481> [pii]
- Storm. (1988). Temporal integration by a slowly inactivating K⁺ current in hippocampal neurons. *Nature*, 336, 379–381.
- Stuart, G., Schiller, J., & Sakmann, B. (1997). Action potential initiation and propagation in rat neocortical pyramidal neurons. *The Journal of Physiology*, 505 (Pt 3), 617–632. <https://doi.org/10.1152/jn.01288.2006>.
- Teleńczuk, M., Brette, R., Destexhe, A., & Teleńczuk, B. (2018). Contribution of the axon initial segment to action potentials recorded extracellularly. *BioRxiv*, 5(June), 243808. <https://doi.org/10.1101/243808>
- Telenczuk, M., Fontaine, B., & Brette, R. (2016). The basis of sharp spike onset in standard biophysical models Abbreviated title : The biophysical basis of sharp spike onsets. *PLoS ONE*, 1–20.
- Thome, C., Kelly, T., Yanez, A., Schultz, C., Engelhardt, M., Cambridge, S. B. B., ... Egorov, A. V. V. (2014). Axon-carrying dendrites convey privileged synaptic input in hippocampal neurons. *Neuron*, 83(6), 1418–1430. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.08.013>
- Unsain, N., Stefani, F. D., & Cáceres, A. (2018). The actin/spectrin membrane-associated periodic skeleton in neurons. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 10(MAY), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2018.00010>
- Vacher, H., Mohapatra, D. P., & Trimmer, J. S. (2008). Localization and Targeting of Voltage-Dependent Ion Channels in Mammalian Central Neurons. *Physiological Reviews*, 88(4), 1407–1447. <https://doi.org/10.1152/physrev.00002.2008>

- Wefelmeyer, W., Cattaert, D., & Burrone, J. (2015). Activity-dependent mismatch between axo-axonic synapses and the axon initial segment controls neuronal output. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(31), 9757–9762. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502902112>
- Wilent, W. B. (2005). Stimulus-Dependent Changes in Spike Threshold Enhance Feature Selectivity in Rat Barrel Cortex Neurons. *Journal of Neuroscience*, *25*(11), 2983–2991. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4906-04.2005>
- Wilent, W. B., & Contreras, D. (2005). Dynamics of excitation and inhibition underlying stimulus selectivity in rat somatosensory cortex. *Nature Neuroscience*, *8*(10), 1364–1370. <https://doi.org/10.1038/nn1545>
- Wollner, D. A., & Catterall, W. A. (1986). Localization of sodium channels in axon hillocks and initial segments of retinal ganglion cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *83*(21), 8424–8428. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.21.8424>
- Xiwei Zheng, Cong Bi, Marissa Brooks, and D. S. H. (2015). HHS Public Access. *Anal Chem.*, *25*(4), 368–379. <https://doi.org/10.1016/j.cogdev.2010.08.003>. Personal
- Xu, K., Zhong, G., & Zhuang, X. (2013). Actin, Spectrin, and Associated Proteins Form a Periodic Cytoskeletal.pdf. *Science (New York, N.Y.)*, *339*(January), 452–456. <https://doi.org/10.1126/science.1232251>
- Yu, F. H., & Catterall, W. A. (2004). The VGL-Chanome: A Protein Superfamily Specialized for Electrical Signaling and Ionic Homeostasis. *Science Signaling*, *2004*(253), re15-re15. <https://doi.org/10.1126/stke.2532004re15>
- Yu, Y., Shu, Y., & McCormick, D. A. (2008). Cortical Action Potential Backpropagation Explains Spike Threshold Variability and Rapid-Onset Kinetics. *Journal of Neuroscience*, *28*(29), 7260–7272. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1613-08.2008>
- Zhang, Y., Abiraman, K., Li, H., Pierce, D. M., Tzingounis, A. V., & Lykotrafitis, G. (2017). Modeling of the axon membrane skeleton structure and implications for its mechanical properties. *PLoS Computational Biology*, *13*(2), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005407>

Annexes

A. Annexe 1, Article 2 The role of axonal Kv1 channels in CA3 pyramidal cell excitability

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

The role of axonal Kv1 channels in CA3 pyramidal cell excitability

Sylvain Rama¹, Mickael Zbili¹, Aurélie Fékété¹, Mónica Tapia², Maria José Benitez^{2,3}, Norah Boumedine¹, Juan José Garrido² & Dominique Debanne¹

Received: 24 June 2016

Accepted: 22 February 2017

Published online: 22 March 2017

Axonal ion channels control spike initiation and propagation along the axon and determine action potential waveform. We show here that functional suppression of axonal Kv1 channels with local puff of dendrotoxin (DTx), laser or mechanical axotomy significantly increased excitability measured in the cell body. Importantly, the functional effect of DTx puffing or axotomy was not limited to the axon initial segment but was also seen on axon collaterals. In contrast, no effects were observed when DTx was puffed on single apical dendrites or after single dendrotomy. A simple model with Kv1 located in the axon reproduced the experimental observations and showed that the distance at which the effects of axon collateral cuts are seen depends on the axon space constant. In conclusion, Kv1 channels located in the axon proper greatly participate in intrinsic excitability of CA3 pyramidal neurons. This finding stresses the importance of the axonal compartment in the regulation of intrinsic neuronal excitability.

Ion channels in the axon determine both the generation of the action potential (AP) in the axon initial segment (AIS) and its conduction along the axon proper to the presynaptic terminals¹. Voltage-gated ion channels in the axon also control the spike waveform and thus, voltage change in the soma determines output strength^{2–8}.

Among voltage-gated channels, Kv1 channels play a unique role. They are responsible for the fast-activating, slowly-inactivating D-type current which is broadly expressed in neurons of the central nervous system including CA1 and CA3 pyramidal neurons^{9, 10}, L5 and L2/3 pyramidal cells^{11, 12} and parvalbumin (PV)-positive fast-spiking interneurons^{13, 14}. Given that I_D is activated at voltages near AP threshold, it has potentially a critical role in determining the transformation from synaptic input into AP output. In fact, the D-type current plays an important role in controlling AP shape and threshold^{4, 11, 15}, synaptic strength^{4, 8, 15}, spike-time precision¹⁶ and synaptic delay¹⁷. It also enhances the fidelity of neurotransmission¹⁸. In addition, several forms of long-lasting modulation of intrinsic excitability result from the regulation of Kv1 channels^{16, 19, 20}.

The location of Kv1 channels responsible for the modulation of neuronal excitability in the cell body is not precisely known. Depending on studies it can vary from distal dendrites²¹, to proximal dendrites²², AIS and axon^{4, 13, 23, 24}. We therefore determined here the location of functional Kv1 channels in CA3 pyramidal cells that display a strong D-type current¹⁶. Using a combination of pharmacological tools in parallel with mechanical or laser axotomy, we show that Kv1.1 channels in the AIS and in the axon trunk regulate the intrinsic excitability of CA3 pyramidal cells measured in the soma.

Results

Kv1.1 channels in the AIS and the axon proper of hippocampal cells. We first determined the location of Kv1.1 channels in CA3 neurons from organotypic slice cultures. Slices were cultured for 8–10 days *in vitro* before being re-sectioned at 14 μm with a cryostat and processed for immunohistochemistry (see Experimental Procedures). Kv1.1 immunostaining was observed in both the cell body and the AIS identified by Ankyrin G immunostaining in CA3 neurons (Fig. 1A and B). The length of the AIS in CA3 pyramidal cells was found to be comparable with values found in acute slices²⁵ ($55.9 \pm 0.1 \mu\text{m}$, $n = 34$ AIS). Interestingly, CA1 pyramidal cells expressed no Kv1.1 immunostaining (Fig. 1C). This lack of Kv1.1 labelling in CA1 pyramidal cells at this relatively early stage of development (slices cut at P7 and 8–10 days of development *in vitro*) can easily be explained by the fact that I_D is mainly expressed in CA1 after P21²⁶. Moreover, Kv1.1 channels are expressed at P6 in the area CA3²⁷.

To better identify the precise location of Kv1.1 channels in the subcellular compartment of the neurons, we used hippocampal neurons from dissociated cultures (see Experimental procedures). Kv1.1 immunostaining was

¹UNIS, INSERM UMR_S 1072, Aix-Marseille Université, 13015, Marseille, France. ²Instituto Cajal, CSIC, Madrid, 28002, Spain. ³Universidad Autónoma de Madrid, 28049, Madrid, Spain. Correspondence and requests for materials should be addressed to D.D. (email: dominique.debanne@univ-amu.fr)

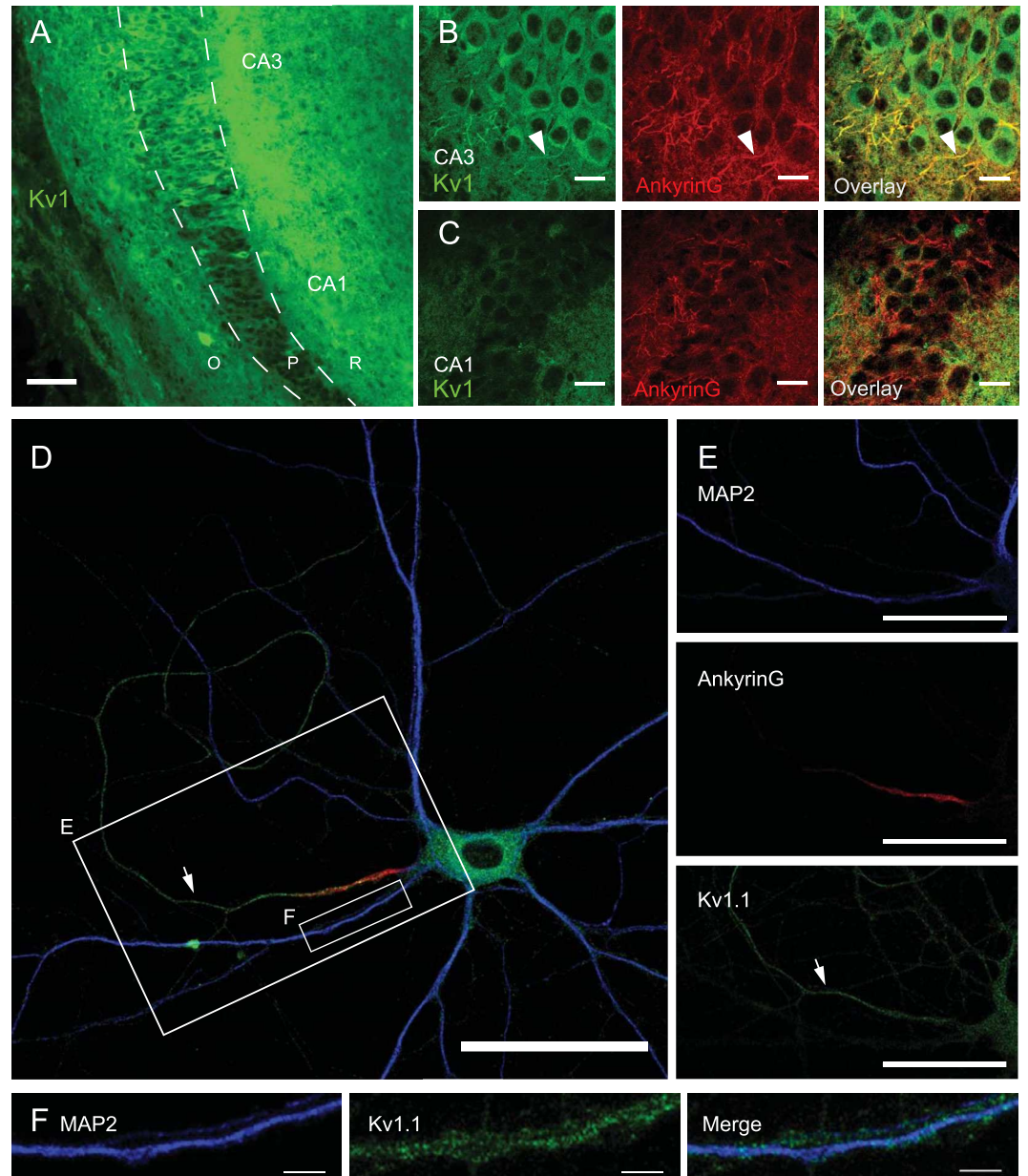


Figure 1. Kv1.1 channels are enriched in AIS area of CA3 pyramidal cells. (A) General view of an organotypic culture immunostained for Kv1.1 channels. Note the lack of Kv1.1 immunostaining in CA1 and the strong staining in CA2 and CA3. O, P, R: Oriens, Pyramidale & Radiatum areas. (B) Staining of CA3 area with Kv1.1 antibodies (left), ankyrin G antibodies (middle) and superimposition of both (right). Note the strong staining of cell soma with Kv1.1 antibodies and the staining of an extension from soma (left panel, arrowhead). Ankyrin G antibodies stain the AIS (middle panel, arrowhead), co-localised with Kv1.1 staining (right panel, arrowhead). (C) Representative views of CA1 area stained with Kv1.1 antibodies (left), Ankyrin G antibodies (middle) and superposition of both (right). Kv1.1 antibodies do not stain any particular structures and are not present in the cell bodies of pyramidal cells (left). Superposition of Kv1.1 and Ankyrin G staining does not show any co-localisation (right). (D) 19 DIV hippocampal neuron immunostained with the somatodendritic marker MAP2 (blue), the AIS marker AnkyrinG (red) and Kv1.1 (green) revealing a strong staining in the axon (arrowhead). (E) Detail of the area showed in (D). Note the Kv1.1 staining all along the axon (arrows). (F) Detail on a dendrite showed in (D), to show the lack of colocalization between MAP2 (left) and Kv1.1 (middle) staining. Right: composite image with both stainings. Scale bars: 20 μm (B,C), 50 μm (A,D,E) 0.2 μm (F).

not only limited to the AIS revealed by immunostaining of Ankyrin G but clearly extended up to the end of the axon collaterals (Fig. 1D). While the soma displayed an intracellular staining, Kv1.1 immunostaining was found to be located in the AIS and all along the axon (Fig. 1E, arrows). The Kv1.1 staining observed near the dendrites corresponded to axons running along dendrites (Fig. 1F). Next, we have examined whether Kv1.2 were also

present on the axon or dendrites of hippocampal cells. In contrast with the labeling of Kv1.1 channels, the labeling obtained with Kv1.2 was found to be much lighter (Supplementary Figure 1). We conclude that Kv1.1 channels are located all along the axon of hippocampal neurons.

Axonal but not dendritic Kv1.1 channel blockade increases somatic excitability. To assess the contribution of axonal Kv1 channels on intrinsic neuronal excitability, we monitored the excitability of CA3 pyramidal cells before and after puffing the specific Kv1.1 channel blocker, DTx-K or the broader spectrum Kv1 channel blocker, DTx-I. CA3 pyramidal cells were recorded with a pipette containing Alexa 488 (50 μ M) to reveal their morphology (Fig. 2A). Long depolarizing current pulses were injected in the soma to elicit a few spikes in control conditions (Fig. 2B). The extent of the DTx application was visualized with addition of Alexa 594 (50 μ M) to the pipette medium (see Experimental Procedures). Puffing DTx on the proximal part of the axon (0–150 μ m from the soma) roughly increased the excitability by a factor 2. The AP number increased from 5.2 ± 1.2 in control to 9.5 ± 1.7 after application of DTx-K & I, $n = 8$, $p < 0.05$ Wilcoxon) and the delay to the first AP was reduced (from 585 ± 78 ms vs. 300 ± 51 ms, $n = 8$, $p < 0.01$, Wilcoxon; Fig. 2C). In parallel, the jitter of the first AP decreased (from 69 ± 13 ms to 31 ± 6 ms, $n = 8$, $p < 0.01$, Wilcoxon; Fig. 2D) and the depolarizing slope measured 100 ms before the first AP increased (from 16 ± 2 mV/s to 28 ± 3 mV/s, $n = 8$, $p < 0.01$, Wilcoxon; Fig. 2E). In contrast, puffing DTx on the dendrites ($n = 10$) (Fig. 2F–J) or puffing ACSF on the AIS (see Fig. 3 for statistics) produced no change in excitability neither on the delay of the first spike, the jitter of the first spike, nor on the depolarizing slope before the first spike.

In order to characterize the spatial extent of DTx application, the effects were plotted against the location of the puff (Fig. 3). The strongest effect of DTx was observed on the axon (at ~ 50 μ m from the soma), i.e. corresponding to the location of the AIS. Interestingly, the effects decreased with the distance but were still high far away from the AIS area. The slight increase in excitability observed when DTx was puffed on proximal dendrites (Fig. 3) might be due to the relatively large diffusion area of DTx (estimated to be 48 ± 2 μ m, $n = 33$) that may possibly inhibit Kv1 channels located on both the soma and the AIS.

Axotomy but not dendrotomy increases excitability recorded at the soma. Because of the spreading geometry of the axon, puffing DTx on proximal dendrites may well affect the axonal compartment. To circumscribe this possible issue, we sectioned axon or dendrite collaterals and studied their impact on neuronal excitability²⁸. CA3 neurons were recorded with a pipette containing Alexa 488 (50 μ m) to visualize the axonal arborisation. To cut axon or dendrite collaterals, a second pipette was placed below the collateral at 60 to 306 μ m from the cell body and pulled up out of the slice (Fig. 4A and B). The efficiency of the section was confirmed by the disappearance of fluorescence downstream of the cut. Cutting axon collaterals was impossible near the AIS because it destabilized the recording. To circumvent this problem, we used the laser axotomy technique²⁹ in which the axon was continuously illuminated in line scan mode (see Experimental Procedures; Fig. 4C). Cutting axon collateral slightly decreased input resistance (from 135 ± 14 to 130 ± 14 M Ω , $n = 14$, $p < 0.001$, Wilcoxon test) but had no significant effect on membrane capacitance (from 240 ± 15 to 237 ± 15 pF, $n = 14$, $p > 0.05$, Wilcoxon test). Importantly, it also increased neuronal excitability (from 5 ± 2 to 10 ± 3 spikes, $n = 7$; Fig. 5A). The first spike latency was found to be reduced (from 577 ± 73 to 285 ± 94 ms, $n = 7$; Fig. 5B), the slope before the first spike increased from 12.4 ± 1.4 to 181 ± 89 mV/s ($n = 7$) and the jitter of the first spike decreased from 56 ± 23 to 30 ± 13 ms ($n = 7$). In contrast, cutting dendrites produced no significant effect on intrinsic excitability (from 2 ± 0.6 to 1.9 ± 0.7 spikes, $n = 6$), the delay before the first AP (from 824 ± 25 to 818 ± 12 ms, $n = 6$), the depolarizing slope (from 7 ± 0.5 to 6.3 ± 1.1 mV/s, $n = 6$) or the jitter of the first AP (from 53 ± 7 to 74 ± 10 ms, $n = 6$) (Fig. 5C and D). Interestingly, the effects of axonal section were the largest near the AIS and declined with distance (Fig. 5E), reaching the baseline at approximately 200 μ m from the soma. We conclude that axotomy beyond the AIS selectively enhances excitability indicating that axonal Kv1.1 channels control excitability measured in the soma.

A model with Kv1 channels in the axon reproduced the experimental observations. To further understand the role of axonal Kv1 channels in the control of intrinsic excitability, we used a modelling approach (Fig. 6A). All the compartments contained passive conductance, voltage-dependent Na⁺ and delayed rectifier K⁺ channels (see Experimental Procedures). The D-type conductance was only inserted in the AIS and the axon. All parameters were measured in the soma, to mimic our experimental observations. As in the experiments, removing the axon after the AIS increased the excitability of the model whereas removing a dendrite had no effect (Fig. 6B). The model reproduced the distance dependent effect of axotomy and dendrotomy (Fig. 6C, see Fig. 6E for comparison). The axon cut entailed an increase of the spike number, a decrease of the first spike delay, a decrease of the jitter and an increase of the depolarizing slope before the first AP (red dots in Fig. 6C). Moreover, as observed in our experiments these effects depended on the distance where we performed the simulated axotomy. In contrast, dendrotomy had no effect regardless of the cutting distance (green dots in Fig. 6C).

In order to characterize the distance dependence of axonal removal, we plotted the effect on the delay to the first spike as a function of the distance of the axon collateral cut with varying intracellular resistivity (R_i). R_i determines the axonal space constant (λ), in an inverse proportional way ($\lambda \propto 1/\sqrt{R_i}$). A distal axonal cut (150 μ m) had an impact on the first spike delay only when the R_i was small (150 Ω cm or less) but not when it was large (300 Ω cm) (Fig. 6D).

We set as the threshold for detecting an effect on the delay, the cutting distance that produced 2% decrease. This critical distance was found to vary as a function of R_i (on the dotted line in Fig. 6D) and a linear relationship between λ and the threshold cutting distance was found (Fig. 6E). By fitting our experimental results, the axonal cutting distance leading to a 2% decrease in the delay was found to be 297 μ m (Fig. 6F) and the λ was estimated to be ~ 163 μ m. This value is consistent with previous findings showing that Kv1-dependent enlarging of AP has a

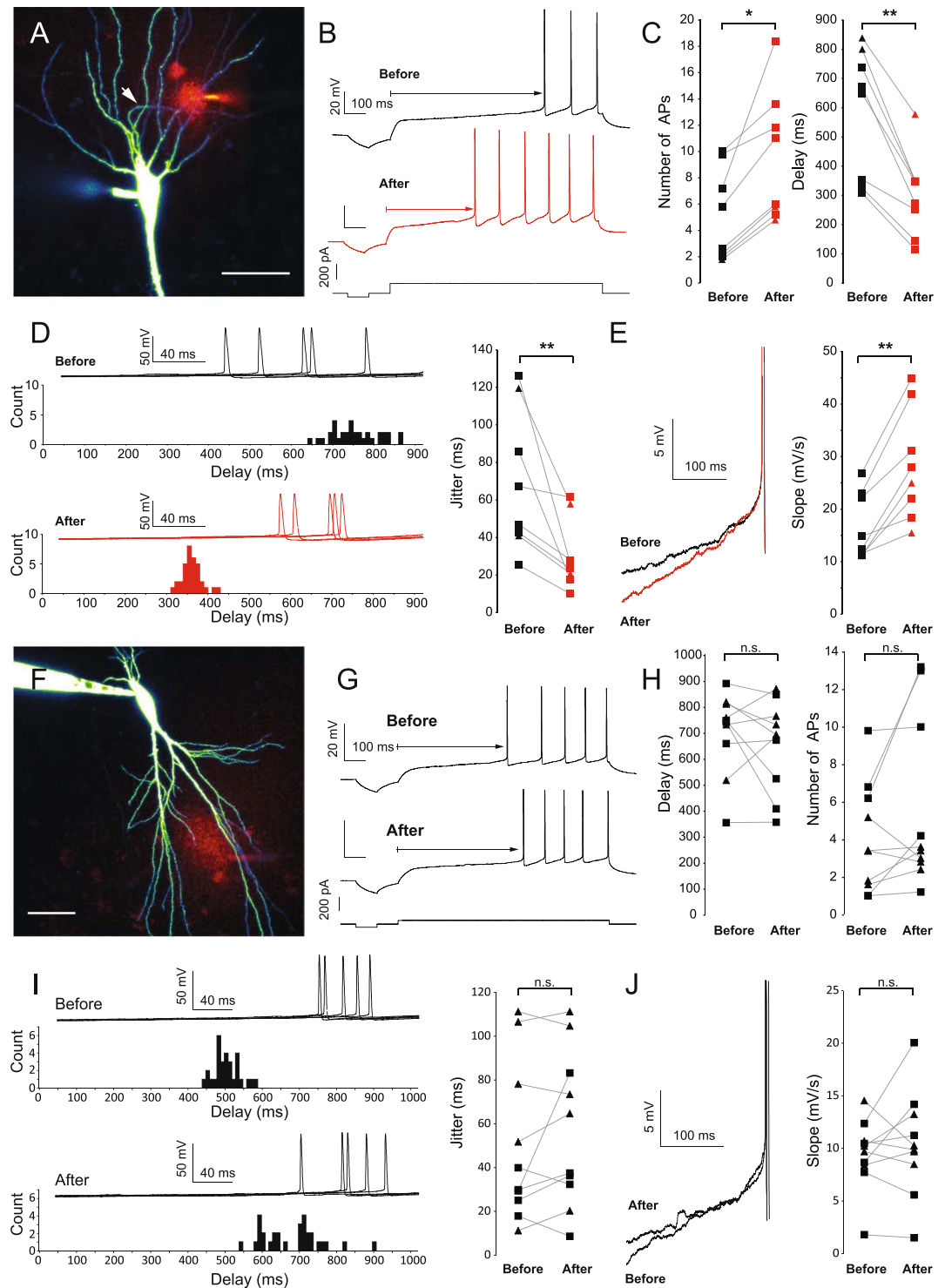


Figure 2. DTx puffs on the axon increase somatic excitability. **(A)** Puff of DTx-K and Alexa 594 on the axon of a CA3 pyramidal neuron filled with Alexa 488. Arrow: axon. Scale Bar: 50 μm . **(B)** Example of spike discharge before (black) and after (red) 40 puffs of DTx-K on the AIS. Note the increased number of APs and the decreased delay to the first spike. **(C)** Pooled data of the impact of DTx-K and DTx-I puffs on the axon (0–150 μm from the soma). Stars: Wilcoxon test, $p < 0.05$, $n = 8$. **(D)** Effect of DTx puffs on the jitter of the first AP. Stars: Wilcoxon test, $p < 0.05$, $n = 8$. **(E)** Effect of DTx puffs on the depolarizing slope before the first AP (traces aligned on the spike threshold). Stars: Wilcoxon test, $p < 0.05$, $n = 8$. **(F)** Puff of DTx-K and Alexa 594 on the dendrites of a CA3 pyramidal neuron filled with Alexa 488. Scale Bar: 50 μm . **(G)** Example of spike discharge before (top) and after (bottom) 40 puffs of DTx-K on the dendrites. **(H)** Pooled data of the impact of DTx-K and DTx-I puffs on the dendrites (0–150 μm from the soma). **(I)** Effect of dendritic puff of DTx on the jitter of the first spike. **(J)** Effect of DTx puffs on the depolarizing slope before the first AP. For panels C, D, E, H, I & J: squares: puffs of DTx-K, triangles: puffs of DTx-I.

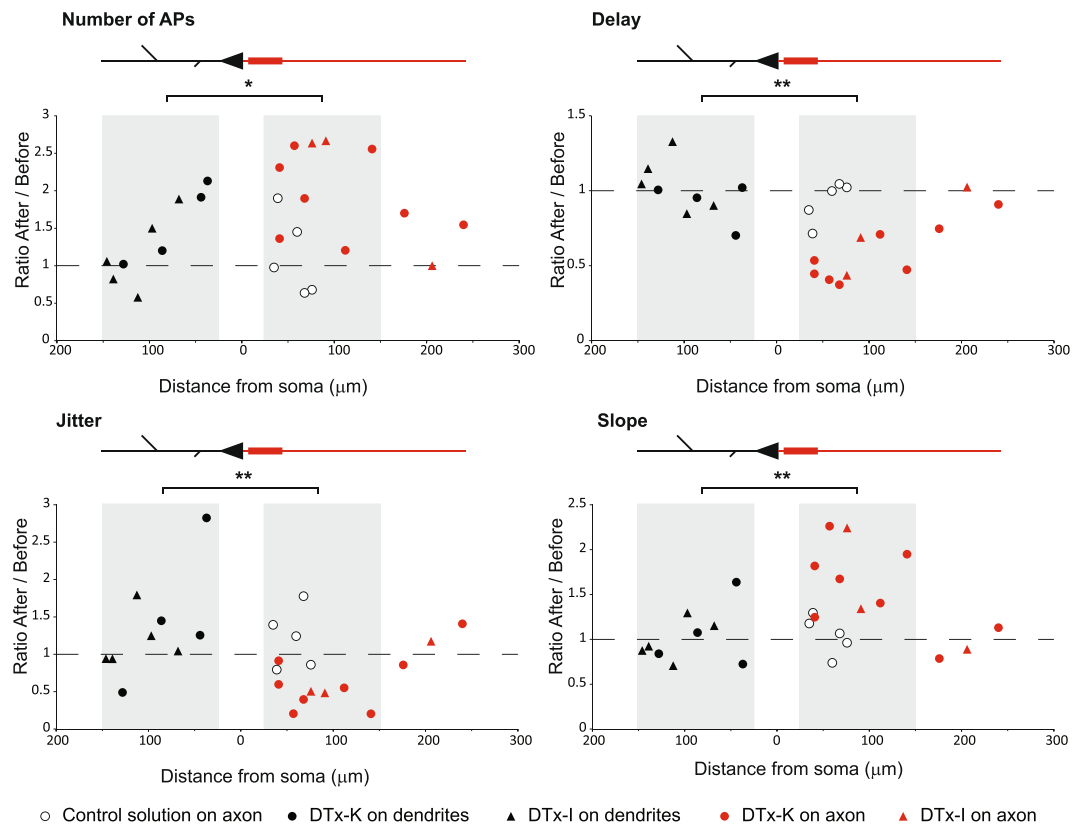


Figure 3. Effect of puffing DTx-K or DTx-I on global excitability according to the distance from the soma. Full set of experiments, showing the relative effect of DTx-K or DTx-I on the delay, number of APs, jitter and slope and according to the distance from soma, on axon or dendrites of CA3 pyramidal cells. White circles: puff of control extracellular solution on the axon; black circles: puff of DTx-K on dendrites; red circles: puff of DTx-K on axon; black triangles: puff of DTx-I on dendrite; red triangles: puff of DTx-I on axon. Note the maximum effect of DTx on the excitability around 50 μm on the axon, which coincides with AIS position. Grey areas: experiments showed in Fig. 2. Star: Mann-Whitney test, $p < 0.05$ ($n = 9$ for dendritic puffs and $n = 8$ for axonal puffs); Double star: Mann-Whitney test, $p < 0.01$ ($n = 9$ for dendritic puffs and $n = 8$ for axonal puffs). All puffs of control solution on axon are significantly different from DTx puffs on axon (Mann-Whitney tests, all $p < 0.05$ ($n = 5$ for axonal puffs of control solution and $n = 8$ for axonal puffs of DTx)).

space constant of 145 μm in CA3 neurons³⁰. In conclusion, the model reproduced the effects of axon or dendrite cuts and it shows that the critical distance at which the cuts have an effect is determined by cable properties.

Relative contribution of axonal versus somato-dendritic Kv1 channels to CA3 excitability. Even if no obvious impact was observed on intrinsic excitability upon cutting a single dendrite, one cannot exclude the possibility that a small amount of functional Kv1 channels are present in the somato-dendritic compartment. As the dendritic surface is large, sparsely distributed Kv1 channels could be well sufficient to regulate intrinsic excitability recorded in the soma. To investigate this possibility, Kv1 channels were successively inhibited in the different compartments of the neuron (Supplementary Figure 2A). We started by sectioning the axon just after the AIS (at 50–90 μm from soma) to inhibit Kv1 channels in the axon proper. Then we puffed DTx-K on the AIS. Finally, DTx-K was bath-applied to inhibit Kv1.1 channels located in the soma and the dendrites. Intrinsic excitability was monitored in each step of the experiment (Supplementary Figure 2B). Following bath application of DTx-K, intrinsic excitability was found to be increased: the number of evoked action potentials increased from 7 ± 2 to 13 ± 3 spikes, $n = 7$; $p < 0.05$, Wilcoxon test). The first spike latency was found to be reduced (from 157 ± 73 to 25 ± 5 ms, $n = 7$; $p < 0.05$, Wilcoxon test), the jitter of the first spike decreased (from 23 ± 11 to 2.5 ± 1 ms; $n = 7$; $p < 0.05$, Wilcoxon test), but the slope before the first spike did not change (from 760 ± 170 to 831 ± 140 mV/s; $n = 7$; $p > 0.05$, Wilcoxon test). To compare the contribution of Kv1 channels in the axon proper and in the somato-dendritic compartment to intrinsic excitability, we normalized the different parameters measured in the situations “Axon cut” and “DTx-K in the bath” with the “Control” situation, and with the “DTx-K puff on AIS” situation, respectively (Supplementary Figure 2C). Except for the slope ($p < 0.05$, Mann-Whitney test), the two conditions were not statistically different. This normalization shows that cutting the axon below the AIS is roughly the same than inhibiting Kv1.1 channels on all somatic and dendritic compartments.

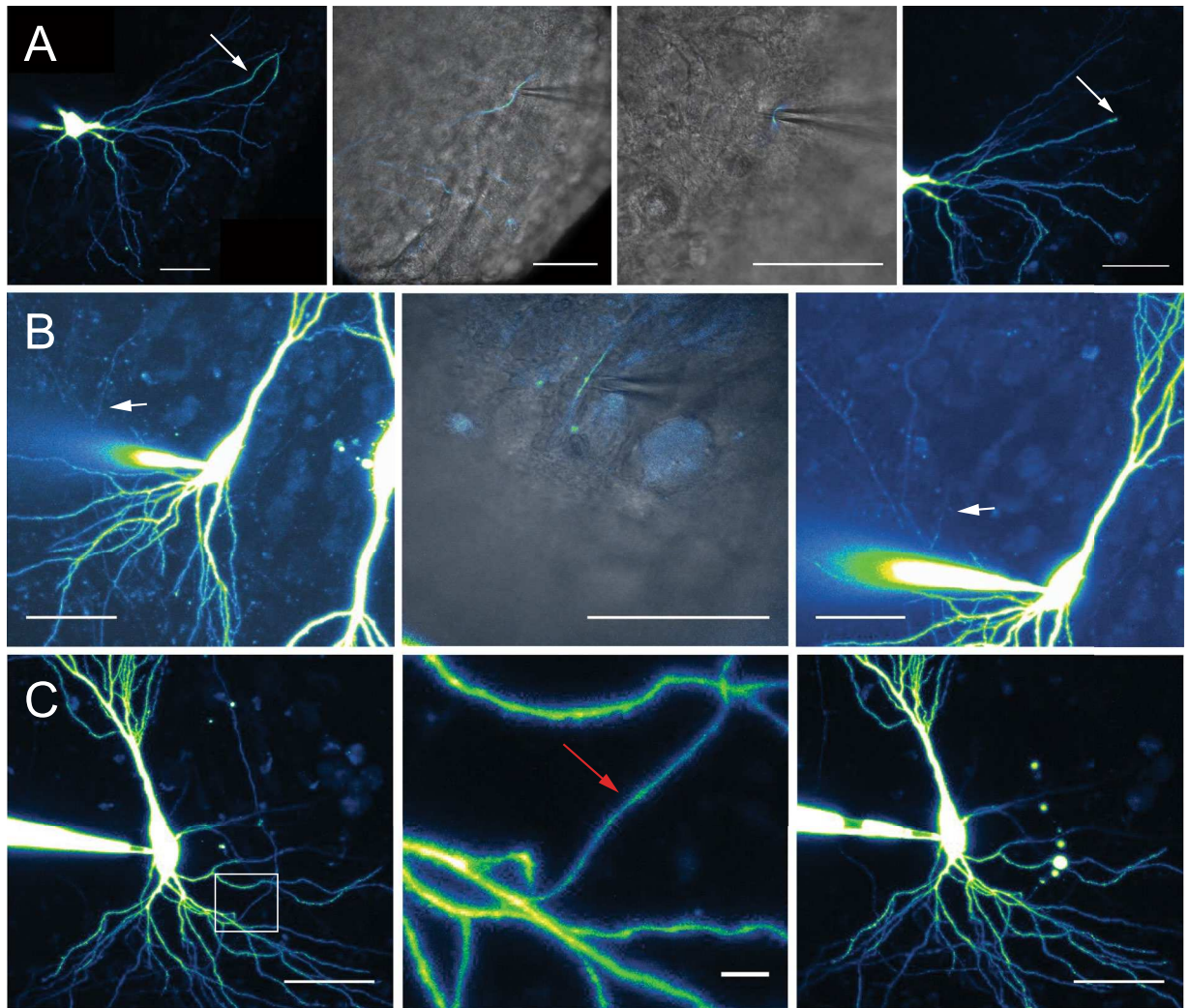


Figure 4. Methods of dendritic and axonal resection and burning. **(A)** Typical dendrite resection. Left panel: after filling a CA3 pyramidal neuron with Alexa 488 50 μ M, dendritic branches could be imaged from apical or basal side of the neuron. Arrow: dendritic branch chosen to be cut. Middle left panel: by using the transmitted light PMT, a second pipette was precisely placed under the selected dendritic branch. Middle right panel: cautiously moving the pipette, it was possible to pull out the dendrite from the slice. Right panel: a brief and strong upward movement results in the dendrite resection, at the point chosen before. Note the absence of Alexa 488 fluorescence downstream of the section. Scale bars: 20 μ m. **(B)** Same protocol applied to axonal branches. Left panel: a collateral crossing the pyramidal layer was chosen. Middle panel: pipette pulling out the axonal branch. Right panel: after section, no fluorescence is visible downstream of the section point. Scale bars: 20 μ m. **(C)** Laser burning of an axon collateral. Left panel: confocal acquisition of a CA3 pyramidal neuron. Middle panel: enlargement of the white box showed in the left panel. The axon is clearly identified as a thin, aspiny process. Red arrow: chosen burning point. Right panel: after cautious burning in line-scan mode, membrane bubbles develop downstream of the burning point, and Alexa 488 staining disappears. No effect can be seen upstream the burning point. Scale bars: 20, 5 and 20 μ m.

Discussion

The present study demonstrates that Kv1.1 channels located in the axon determine the excitability of CA3 pyramidal neurons. Using a combination of techniques including immunohistochemical labelling, targeted axotomy, focal block of Kv1.1 channels and modelling, it was found that Kv1.1 channels are essentially located in the AIS and the axon and that their functional removal beyond the AIS significantly alter intrinsic excitability and spike firing properties measured in the soma. Moreover, it underlines the importance of preserving the whole axonal arborisation to study the excitability of central neurons.

Axonal Kv1 channels determine intrinsic excitability in CA3 pyramidal cells. We establish here that axonal Kv1 channels determine excitability measured in the cell body of CA3 pyramidal neurons. The axonal location of Kv1 channels is relatively well established. In neocortical pyramidal cells, functional Kv1 channels are highly expressed in the AIS and beyond, in the axon proper⁴. In fast spiking basket-cell interneuron, DTx applied

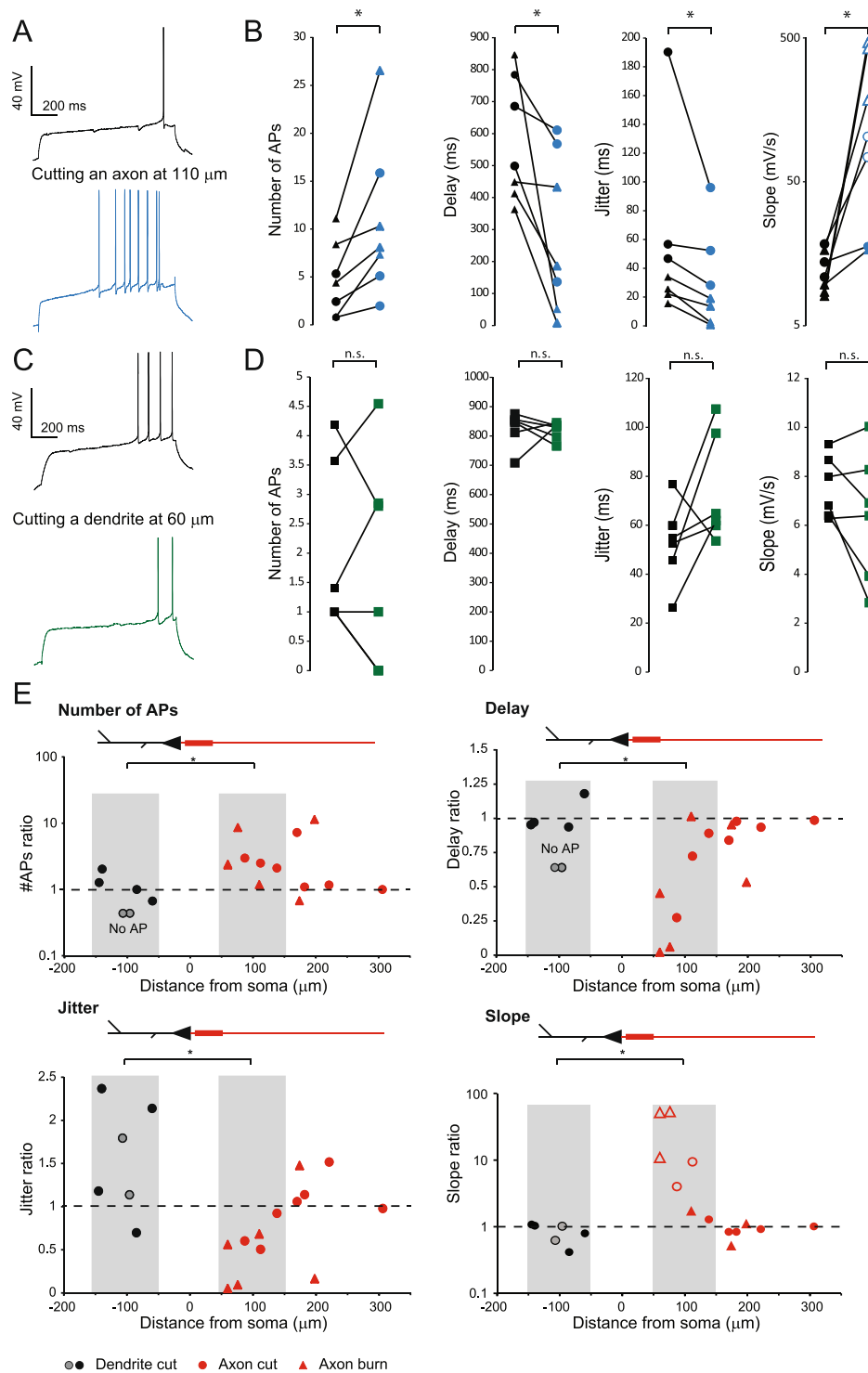


Figure 5. Excitability is increased by axon section but not dendrite section. **(A)** Typical example showing the excitability before (top) and after (bottom) axon resection or burning. **(B)** Pooled data of the effects of axon resection or burning on the spike number, the delay to the first spike, the jitter and the depolarizing slope (n = 7). Star: Wilcoxon test, p < 0.05. Triangle: burning, Circles: cutting. Note that the empty circles in the slope panel correspond to slopes measured 20 ms (and not 100 ms) before the first spike because the delay was too short. **(C)** Typical example showing the excitability before (top) and after (bottom) dendrite resection. **(D)** Pooled data of the effects of dendrotomy on the spike number, the delay to the first spike, the jitter and the depolarizing slope (n = 6). **(E)** Relative effects of dendrotomy and axotomy as a function of the distance from soma, on AP number, delay, jitter and slope. Black circles: dendrite cut; grey circles: dendrite cuts resulting in a disappearance of APs during the depolarizing step. Red circles: axon cut; Red triangles: axon burn. Grey areas on each graph correspond to the experiments used for statistics in Fig. 5B and D.

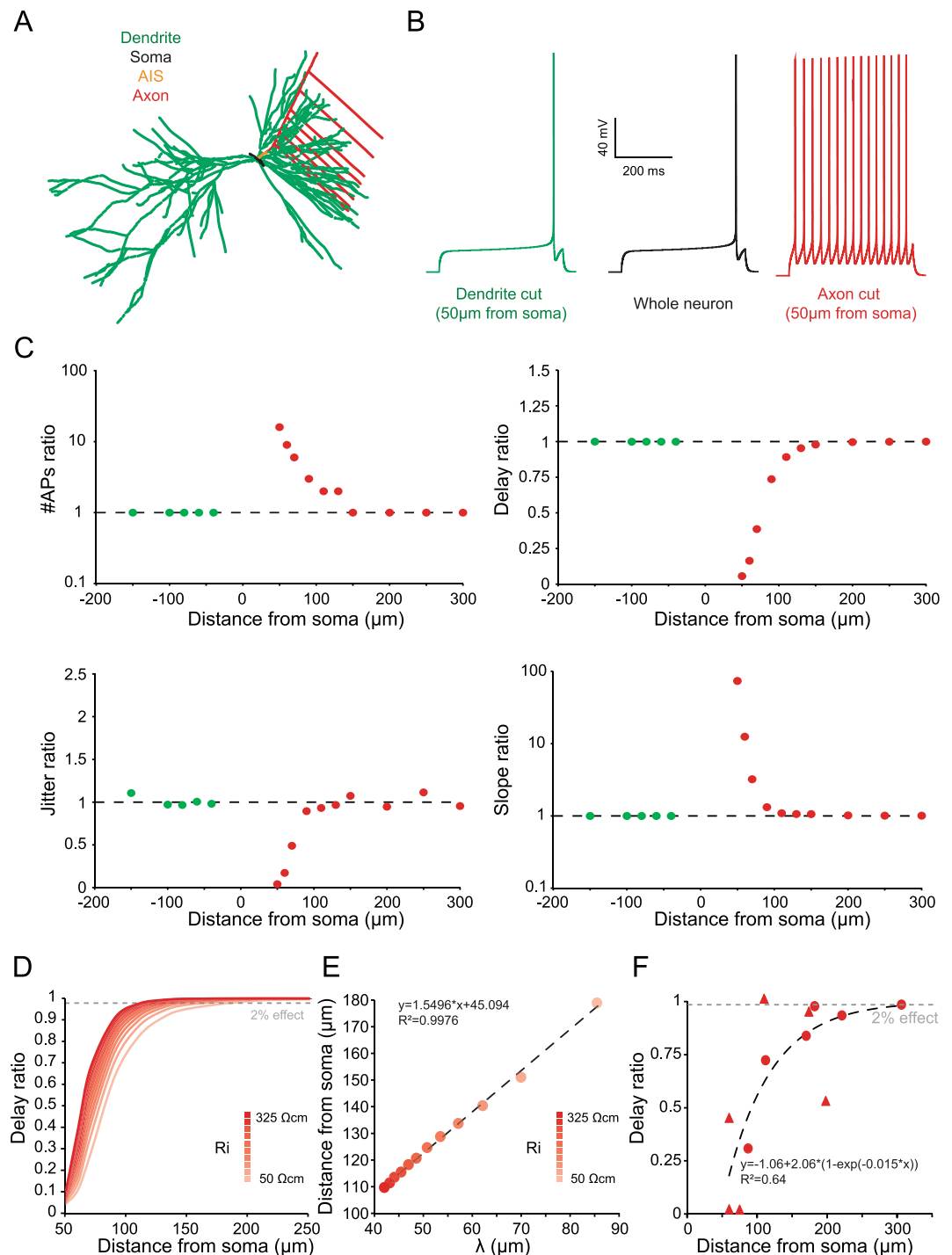


Figure 6. Modelling study of axon and dendrite cuts. **(A)** Drawing of the computational model. **(B)** Effect of axonal or dendritic cut on excitability and first spike delay during a 1 s current injection. Note the increase of AP number and decrease of first spike delay after axonal cut. **(C)** Spatial effect of axonal or dendritic cutting on number of APs, first spike delay, first spike jitter and depolarizing slope before the first spike during a 1 s current injection. Note that the model reproduces the experimental results of Fig. 3D. **(D)** Spatial extent of spike delay decrease by axonal cutting with various intracellular resistivity (R_i). Note that the larger the R_i , the shorter the spatial extent. **(E)** Distance of axonal cut to get a 2% spike delay decrease as a function of space constant (λ). Note the linear relationship. **(F)** Fit of experimental data of delay reduction by axonal cutting (from Fig. 5D).

focally has an effect only on the axon initial segment but not on the cell body¹³. However, in these studies it was not clear whether the excitability of the cell measured in the cell body was influenced by Kv1 channels located farther than the AIS. We show here that axonal Kv1 channels located beyond the AIS control the excitability of CA3

pyramidal cells recorded in the soma. The elimination of functional Kv1 channels in the axon was made through 2 techniques. In a first step, focal puffs of DTx-K or DTx-I were found to increase excitability of pyramidal cells when they were applied on the axon but not on the dendrites. As similar effects were obtained with the two toxins, we conclude that the increase in excitability is mediated by inhibition of axonal Kv1.1 channels. These changes in excitability were associated with a reduced delay to the first spike, a hallmark of the action of the Kv1-mediated D-type current. In a second step, axon collaterals were cut mechanically or after high intensity laser illumination. Here again, excitability was significantly increased after physical elimination of axon collaterals but not after cutting dendrites. Interestingly, axon cuts up to 150–200 μm from the soma (i.e. \sim 90–140 μm from the end of the AIS) induced a significant elevation in excitability associated with a reduced delay to the first spike, a reduced jitter and an increase in the depolarizing slope before the spike. The increase in excitability observed experimentally after axotomy was not the result of the deterioration of the recording. The membrane capacitance remained unchanged in these experiments. Similar changes in excitability were observed after local application of Kv1.1 channel blocker and the experimental observations were reproduced in the model.

Spike jitter is determined by axonal Kv1.1 channels. Kv1 channel is a primary determinant of spike-time precision in CA3 pyramidal cells¹⁶. In fact, the Kv1-mediated D-type current is thought to reduce spike-time precision by reducing the rate of depolarization before the spike¹⁶, thus introducing a larger jitter in spike-timing³¹. We show here that blocking axonal Kv1.1 channels with local puffs of DTx increased spike-time precision and the rate of depolarization before the spike. Similar results were observed following mechanical or laser axotomy of collaterals. However, no improvement of spike-time precision was observed after focal application of DTx in the dendrites or after dendrotomy. The modification observed after focal blockade of Kv1 channels with DTx is very similar to those induced by a global block with bath application of DTx¹⁶, suggesting that all the effect is mediated by Kv1 channels located in the axon.

The axon as a regulator of intrinsic excitability. Our study shows that ion channels located in the axon are major determinants of the whole neuronal excitability. Thus, integration of neuronal information is not limited to the somato-dendritic region of the neuron as initially thought³². Rather, in the case of CA3 pyramidal cells, it extends up to the first 150–200 μm of their axon. Our modelling study indicates that the impact axonal channels have on excitability is mainly determined by the axonal space constant. The fact that axonal ion channels determine firing properties had been previously reported in the case of neocortical neurons in which Na⁺ channels located at \sim 120 μm from the soma were responsible for intrinsic bursting²⁹. Moreover, we could estimate that the potency of axonal Kv1 channels in the axon proper is roughly the same than for Kv1 channels located in the whole somato-dendritic area. The finding that distal axonal Kv1 channels control excitability of CA3 pyramidal cells raises some concerns about studies conducted in acute slices. Because axons might be severed at different distance from one cell to the other, it might introduce important variability in the measures of intrinsic excitability.

In conclusion, the axon of CA3 pyramidal cells cannot be considered anymore as a pure conduction cable without any interaction with the cell body. Rather, the axon proper at the AIS and beyond the AIS appears to be an essential determinant of neuronal excitability.

Experimental procedures

Organotypic cultures of rat hippocampus. Hippocampal slice cultures were prepared as described previously³³. All experiments were carried out according to the European and Institutional guidelines for the care and use of laboratory animals (Council Directive 86/609/EEC and French National Research Council) and approved by the local health authority (#D1305508, Préfecture des Bouches-du-Rhône, Marseille). Postnatal day 7–8 Wistar rats were deeply anesthetized by intraperitoneal injection of chloral hydrate, the brain removed and each hippocampus dissected. Hippocampal slices (350 μm) were placed on 20 mm latex membranes (Millicell) inserted into 35 mm petri dishes containing 1 ml of culture medium and maintained for up to 21 days in an incubator at 34 °C, 95% O₂–5% CO₂. The culture medium contained (in ml) 25 MEM, 12.5 HBSS, 12.5 horse serum, 0.5 penicillin/streptomycin, 0.8 glucose (1 M), 0.1 ascorbic acid (1 mg/ml), 0.4 HEPES (1 M), 0.5 B27, 8.95 sterile H₂O. To limit glial proliferation, 5 μM Ara-C was added to the culture medium.

Hippocampal neurons culture. Mouse hippocampal neurons were prepared as previously described³⁴. Neurons were obtained from E17 mouse hippocampi, which were incubated in a 0.25% trypsin solution in Ca²⁺/Mg²⁺ free Hank's buffered salt solution (HBSS) and dissociated using fire polished Pasteur pipettes. The cells were plated on polylysine-coated coverslips (1 mg/mL) at a density of 5000 cells/cm² for 2 h in plating medium (minimum essential medium [MEM], 10% horse serum, 0.6% glucose, Glutamax-I and antibiotics). Then, coverslips were inverted and transferred to culture dishes containing astrocytes. Astrocytes medium was replaced by neuronal culture medium 24 h before (Neurobasal medium, B27 supplement, Glutamax-I). To avoid contact between neurons and astrocytes paraffin beads were placed on coverslips before neuronal plating. 5 μM 1- β -D-arabinofuranosylcytosine (AraC) was added to avoid glial proliferation. Neurons were cultured for 19–23 DIV before fixation.

Immunohistochemistry. Organotypic slices were fixed with paraformaldehyde 4% during 15 min, washed 3 times with PBS and then put in a 30% sucrose solution overnight. Each culture was embedded with Tissue-Tek OCT Compound (VWR) and sliced at 14 μm with a cryostat. Immunostaining of Kv1.1 channels was performed. Double labeling of ankyrin G (rabbit, 1/500, A30, gift of F Castets) and Kv1.1 (extracellular epitope, mouse, 1/50, NeuroMAB). Secondary antibodies were raised in donkey and tagged with distinct fluorophores (anti-mouse Alexa 488; anti-rabbit Alexa 594). Confocal image acquisition was performed on a Leica TCS SP2 laser scanning microscope (Leica Microsystem, Heidelberg, Germany) using 488 nm band of an Ar laser for excitation of

Alexa-Fluor 488 (spectral detection: 492–544 nm), and 545 nm laser diode for the excitation of Alexa 594 (spectral detection: 610–650 nm).

Immunofluorescence in cultured hippocampal neurons was performed as follows. Coverslips were fixed in PFA 4%/Sucrose 4% for 20 minutes at RT, treated for 10 min with 50 mM NH₄Cl and incubated in blocking buffer (0.22% gelatin, 0.1% Triton X-100 in PBS) for 30 min, before incubation with primary antibodies for 1 h at RT in blocking buffer. The primary antibodies used were: chicken anti-MAP2 (1/10000, Abcam), mouse anti-ankyrinG (1/100, NeuroMab N106/36, IgG2a), mouse anti-Kv1.1 (extracellular epitope, 1/100, NeuroMab K36/15, IgG2b) and mouse anti-Kv1.2 (1/100, NeuroMab K14/16, IgG2b). The secondary antibodies used were goat anti-mouse IgG2a-Alexa-Fluor-594, IgG2b-Alexa-Fluor-488 and anti-chicken-Alexa-Fluor-647 (1/1000). Images were acquired in a Leica TCS SP5 laser scanning microscope (Leica Microsystem).

Electrophysiological recordings and data analysis. CA3 pyramidal neurons were whole-cell recorded in organotypic cultures. The external solution contained (mM): 125 NaCl, 26 NaHCO₃, 3 CaCl₂, 2.5 KCl, 2 MgCl₂, 0.8 NaH₂PO₄ and 10 D-glucose, and was equilibrated with 95% O₂–5% CO₂. Patch pipettes (5–10 MΩ) were filled with a solution containing (in mM): K-gluconate 120; KCl 20; HEPES 10; EGTA 0.5; MgCl₂ 2; Na₂ATP 2; NaGTP 0.3 (pH 7.4). All recordings were made at 29 °C in a temperature-controlled recording chamber (Luigs & Neumann, Ratingen, Germany). Neurons were recorded in current clamp with a Multiclamp 700B amplifier (Axon Instruments, Molecular Devices) and were held at resting membrane potential (~–65 mV). The effect of the D-current was monitored by injecting a long (1 s) depolarizing current pulse. The voltage and current signals were low-pass filtered (3 kHz), and acquisition was performed at 10 kHz with pClamp10 (Axon Instruments). Access resistance and capacitance were checked by injecting a small hyperpolarizing current. Data were analyzed with ClampFit (Axon Instruments) or self-developed software written in Labview (National Instrument). Pooled data are presented as mean ± SE and statistical analysis was performed using the Mann-Whitney *U*-test or Wilcoxon rank-signed test.

Confocal Imaging. CA3 neurons were filled with Alexa 488 50 μM (Invitrogen) for visualizing neuronal morphology. Neurons were recorded for ~10 minutes before imaging with a LSM 710 confocal system (Zeiss). Alexa 488 and 594 were excited with laser source at 488 nm and 543 nm, respectively. The axon was identified by visual clues: a thin, aspiny process emerging from the soma or a proximal dendrite. Axon collaterals emerging at right angle, and presynaptic boutons could be identified at ~150 μm from the soma.

Puff applications. Localized puffs of Kv1 channel blocker were applied on the axon or a dendrite of the recorded neuron with a patch-pipette filled with a solution containing the extracellular saline with 50 μM Alexa 594 (Invitrogen) and 100 nM DTx-K or DTx-I (Sigma). Short puffs (20–50 ms, 5 psi) were emitted every 10 s by a Toohey-Spritzer pressure system (Toohey Company). The fluorescence signals produced by puffs of Alexa 594 were acquired over episodes of 5 puffs, averaged and fitted with a Gaussian curve to estimate the area of DTx application. The axon was visually identified as the only neuronal process devoid of spines, with constant diameter, emerging from the soma or from a primary dendrite near the cell body.

Axon and dendrite cuts. For cutting dendrite or axon collaterals, neurons were filled with Alexa 488 and a patch-pipette was positioned below the collateral. By gently pulling up the pipette, the axon collateral was pulled out of the slice and then cut with a swift upward movement of the micro-manipulator. Axons or dendrites were cut in the same way. However, for cutting axon collaterals that are either too proximal or entangled with dendrite arbor we used the laser-burning technique. The axotomy was performed in line scan mode and the chosen area was illuminated with medium power laser for 1–2 minutes. Laser illumination was stopped as soon as a slight depolarization of the membrane could be seen. The neuron was let recovering for 3–5 min before checking axon morphology. Successful axotomy was characterized by the presence of membrane swellings and the disappearance of Alexa 488 staining downstream of the illumination.

Modeling. A multi-compartment model was simulated with Neuron 7.2. The diameter and length of each compartment is provided in Supplemental Table 1. The passive electrical properties C_m and R_i were set to 1.41 μF/cm² and 80 Ωcm, respectively, uniformly throughout all compartments. All simulations were run with 10 μs time steps and the nominal temperature of simulations was 28 °C. The voltage-dependence of activation and inactivation of a Hodgkin-Huxley based conductance models (g_{Na} , g_{KDR} , g_{Kv1}) are given as follows:

$$g_{Na} = G_{Na} * m^3 * h \quad (1)$$

$$g_{KDR} = G_{KDR} * n \quad (2)$$

$$g_{Kv1} = G_{Kv1} * p * k \quad (3)$$

where m , n and p are dynamic activation variables, h and k are dynamic inactivation variables. They evolve according to the following differential equations (adapted from³⁵ for g_{Na} ³⁶; for K_{DR} ^{37,38}; for K_v1):

$$dm/dt = (m_{\infty} - m)/m_{\tau} \quad \text{with } m_{\tau} = 0.1 \quad (4)$$

$$m_{\infty} = 1/(1 + e^{(0.094 * (-40 - V))}) \quad (5)$$

$$dh/dt = (h_{\infty} - h)/h_{\zeta} \quad \text{with } h_{\zeta} = 0.5 \quad (6)$$

$$h_{\infty} = 1/(1 + e^{(-0.09^*(-64-V))}) \quad (7)$$

$$dn/dt = (n_{\infty} - n)/n_{\zeta} \quad \text{with } n_{\zeta} = 10 \quad (8)$$

$$n_{\infty} = 1/(1 + e^{(0.114^*(13-V))}) \quad (9)$$

$$dp/dt = (p_{\infty} - p)/p_{\zeta} \quad \text{with } p_{\zeta} = 1 \quad (10)$$

$$p_{\infty} = 1/(1 + e^{(0.09^*(-43-V))}) \quad (11)$$

$$dk/dt = (k_{\infty} - k)/k_{\zeta} \quad \text{with } k_{\zeta} = 2000 \quad (12)$$

$$k_{\infty} = 1/(1 + e^{(-0.18^*(-63-V))}) \quad (13)$$

where V is the membrane potential of the simulated neuron. The equilibrium potential for Na^+ , K^+ and passive channels was set to +80 mV, -77 mV and -65 mV respectively. The conductance density is provided in Supplementary Table 1. For jitter simulation, we added a Gaussian noise to the injected current (mean: 0; variance: 0.1 pA²). Cutting experiments were modeled by simply reducing the length of the considered neurite to 0.01 μm .

References

- Debanne, D., Campanac, E., Bialowas, A., Carlier, E. & Alcaraz, G. Axon physiology. *Physiol Rev* **91**, 555–602 (2011).
- Alle, H. & Geiger, J. R. Combined analog and action potential coding in hippocampal mossy fibers. *Science* **311**, 1290–3 (2006).
- Shu, Y., Hasenstaub, A., Duque, A., Yu, Y. & McCormick, D. A. Modulation of intracortical synaptic potentials by presynaptic somatic membrane potential. *Nature* **441**, 761–5 (2006).
- Kole, M. H., Letzkus, J. J. & Stuart, G. J. Axon initial segment Kv1 channels control axonal action potential waveform and synaptic efficacy. *Neuron* **55**, 633–47 (2007).
- Rama, S. *et al.* Presynaptic hyperpolarization induces a fast analogue modulation of spike-evoked transmission mediated by axonal sodium channels. *Nat Commun* **6**, 10163 (2015).
- Debanne, D., Bialowas, A. & Rama, S. What are the mechanisms for analogue and digital signalling in the brain? *Nat Rev Neurosci* **14**, 63–9 (2013).
- Bouhours, B., Trigo, F. F. & Marty, A. Somatic depolarization enhances GABA release in cerebellar interneurons via a calcium/protein kinase C pathway. *J Neurosci* **31**, 5804–15 (2011).
- Bialowas, A. *et al.* Analog modulation of spike-evoked transmission in CA3 circuits is determined by axonal Kv1.1 channels in a time-dependent manner. *Eur J Neurosci* **41**, 293–304 (2015).
- Storm, J. F. Temporal integration by a slowly inactivating K^+ current in hippocampal neurons. *Nature* **336**, 379–81 (1988).
- Mitterdorfer, J. & Bean, B. P. Potassium currents during the action potential of hippocampal CA3 neurons. *J Neurosci* **22**, 10106–15 (2002).
- Bekkers, J. M. & Delaney, A. J. Modulation of excitability by alpha-dendrotoxin-sensitive potassium channels in neocortical pyramidal neurons. *J Neurosci* **21**, 6553–60 (2001).
- Guan, D., Lee, J. C., Higgs, M. H., Spain, W. J. & Foehring, R. C. Functional roles of Kv1 channels in neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol* **97**, 1931–40 (2007).
- Goldberg, E. M. *et al.* K^+ channels at the axon initial segment dampen near-threshold excitability of neocortical fast-spiking GABAergic interneurons. *Neuron* **58**, 387–400 (2008).
- Campanac, E. *et al.* Enhanced intrinsic excitability in basket cells maintains excitatory-inhibitory balance in hippocampal circuits. *Neuron* **77**, 712–22 (2013).
- Saviane, C., Mohajerani, M. H. & Cherubini, E. An ID-like current that is downregulated by Ca^{2+} modulates information coding at CA3-CA3 synapses in the rat hippocampus. *J Physiol* **552**, 513–24 (2003).
- Cudmore, R. H., Fronzaroli-Molinieres, L., Giraud, P. & Debanne, D. Spike-time precision and network synchrony are controlled by the homeostatic regulation of the D-type potassium current. *J Neurosci* **30**, 12885–95 (2010).
- Boudkazi, S., Fronzaroli-Molinieres, L. & Debanne, D. Presynaptic action potential waveform determines cortical synaptic latency. *J Physiol* **589**, 1117–31 (2011).
- Yang, Y. M. *et al.* Enhancing the fidelity of neurotransmission by activity-dependent facilitation of presynaptic potassium currents. *Nat Commun* **5**, 4564 (2014).
- Kuba, H., Yamada, R., Ishiguro, G. & Adachi, R. Redistribution of Kv1 and Kv7 enhances neuronal excitability during structural axon initial segment plasticity. *Nat Commun* **6**, 8815 (2015).
- Kirchheim, F., Tinnes, S., Haas, C. A., Stegen, M. & Wolfart, J. Regulation of action potential delays via voltage-gated potassium Kv1.1 channels in dentate granule cells during hippocampal epilepsy. *Front Cell Neurosci* **7**, 248 (2013).
- Hyun, J. H., Eom, K., Lee, K. H., Ho, W. K. & Lee, S. H. Activity-dependent downregulation of D-type K^+ channel subunit Kv1.2 in rat hippocampal CA3 pyramidal neurons. *J Physiol* **591**, 5525–40 (2013).
- Metz, A. E., Spruston, N. & Martina, M. Dendritic D-type potassium currents inhibit the spike afterdepolarization in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Physiol* **581**, 175–87 (2007).
- Shu, Y., Duque, A., Yu, Y., Haider, B. & McCormick, D. A. Properties of action-potential initiation in neocortical pyramidal cells: evidence from whole cell axon recordings. *J Neurophysiol* **97**, 746–60 (2007).
- Kirizis, T., Kerti-Szigeti, K., Lorincz, A. & Nusser, Z. Distinct axo-somato-dendritic distributions of three potassium channels in CA1 hippocampal pyramidal cells. *Eur J Neurosci* **39**, 1771–83 (2014).
- Meeks, J. P. & Mennerick, S. Action potential initiation and propagation in CA3 pyramidal axons. *J Neurophysiol* **97**, 3460–72 (2007).

26. Giglio, A. M. & Storm, J. F. Postnatal development of temporal integration, spike timing and spike threshold regulation by a dendrotoxin-sensitive K(+) current in rat CA1 hippocampal cells. *Eur J Neurosci* **39**, 12–23 (2014).
27. Grosse, G. *et al.* Expression of Kv1 potassium channels in mouse hippocampal primary cultures: development and activity-dependent regulation. *J Neurosci* **20**, 1869–82 (2000).
28. Bekkers, J. M. & Hausser, M. Targeted dendrotomy reveals active and passive contributions of the dendritic tree to synaptic integration and neuronal output. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 11447–52 (2007).
29. Kole, M. H. First node of Ranvier facilitates high-frequency burst encoding. *Neuron* **71**, 671–82 (2011).
30. Sasaki, T., Matsuki, N. & Ikegaya, Y. Effects of axonal topology on the somatic modulation of synaptic outputs. *J Neurosci* **32**, 2868–76 (2012).
31. Sourdet, V., Russier, M., Daoudal, G., Ankri, N. & Debanne, D. Long-term enhancement of neuronal excitability and temporal fidelity mediated by metabotropic glutamate receptor subtype 5. *J Neurosci* **23**, 10238–48 (2003).
32. Stuart, G., Spruston, N., Sakmann, B. & Hausser, M. Action potential initiation and backpropagation in neurons of the mammalian CNS. *Trends in Neurosciences* **20**, 125–131 (1997).
33. Debanne, D. *et al.* Paired-recordings from synaptically coupled cortical and hippocampal neurons in acute and cultured brain slices. *Nat Protoc* **3**, 1559–68 (2008).
34. Del Puerto, A. *et al.* ATP-P2X7 Receptor Modulates Axon Initial Segment Composition and Function in Physiological Conditions and Brain Injury. *Cereb Cortex* **25**, 2282–94 (2015).
35. Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of Loligo. *J Physiol* **116**, 497–506 (1952).
36. Lazarewicz, M. T., Migliore, M. & Ascoli, G. A. A new bursting model of CA3 pyramidal cell physiology suggests multiple locations for spike initiation. *Biosystems* **67**, 129–37 (2002).
37. Hu, W. *et al.* Distinct contributions of Na(v)1.6 and Na(v)1.2 in action potential initiation and backpropagation. *Nat Neurosci* **12**, 996–1002 (2009).
38. Shu, Y., Yu, Y., Yang, J. & McCormick, D. A. Selective control of cortical axonal spikes by a slowly inactivating K+ current. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 11453–8 (2007).

Acknowledgements

We thank Laure Fronzaroli-Molinieres for help with the cultures. Supported by Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Fondation pour la Recherche Médicale (grant FDT20150532147), Agence Nationale de la Recherche (grants ANR-11-BSV4-016-01 & ANR-14-CE13-003) & Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO, SAF2015-65315-R).

Author Contributions

S.R., M.Z. and D.D. conceived the project, S.R. and A.F. collected and analyzed the electrophysiological data. M.Z., M.T., M.J.B., N.B. and J.J.G. performed the immuno-histochemistry. M.Z. made computer simulation, N.B., M.T., M.J.B. and J.J.G. prepared the cultures and S.R. and D.D. wrote the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at doi:10.1038/s41598-017-00388-1

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2017

B. Annexe 2, Perspectives : Somatic modulation of ectopic action potential initiation in distal axons

Somatic modulation of ectopic action potential initiation in distal axons

Aurélie Fékété & Dominique Debanne¹

UNIS, UMR-1072, INSERM, Aix-Marseille University, Marseille, France

¹corresponding author: dominique.debanne@inserm.fr

Key words: neuron; axon; action potential initiation; hippocampus

4 pages, 6 references, 877 words

Classically, action potentials are initiated at the axon initial segment (AIS) when the summed depolarizing events arising from the dendrites exceed a threshold value. Then, action potentials propagate along the axon before reaching presynaptic terminals where they cause local calcium influx and transmitter release. According to this scheme, the AIS is a major player since all propagated excitation is precisely initiated at this hot spot endowed with a high concentration of sodium channels. However, sodium action potentials may be generated at regions remote from the AIS, that is, at ectopic sites located in the axon.

Ectopic action potentials (EAPs) can be initiated in distal parts of the axon and travel antidromically along the fiber to invade the soma. Such ectopic spikes have been recorded during fast hippocampal oscillations *in vitro* (Dugladze et al., 2012) or during spatial exploration *in vivo* (Epsztein et al., 2010), but they also occur in several neuronal pathologies such as epilepsies or demyelinating diseases. The precise way EAPs can be initiated is not yet properly defined but it is thought that local depolarization mediated by spiking activity in adjacent axons through gap junctions (Schmitz et al., 2001) or stochastic activation of sodium channels in demyelinated segments of the axon (Hamada & Kole, 2015) might initiate EAPs. Compared to AIS-evoked action potentials that are classically initiated on the top of a slow subthreshold depolarization such as an excitatory post-synaptic potential, EAPs recorded in the cell body display a much lower threshold (~ -20 mV) (Hamada & Kole, 2015). This lower threshold is thought to result from the axial current flow initiated distally in the axon that propagates back to the soma. In this case, the spike is initiated without subthreshold depolarization generated in the soma, thus avoiding inactivation of sodium channels in the axon. The backpropagation of EAPs is controlled by synaptic inhibition mediated by axo-axonic interneurons that target the AIS (Dugladze et al., 2012). As a result, most of EAPs do not propagate to the soma during hippocampal gamma oscillations. While the control of EAP backpropagation was characterized, it was yet unknown to what extent synaptic potentials arising from the somato-dendritic pole can control their initiation in the axon.

In this issue of *The Journal of Physiology*, Thome and coworkers have solved this question by showing that spontaneous or evoked synaptic activity generated in the somato-dendritic compartment is transmitted with little attenuation ($\sim 20\%$) and over long distances (>300 μm) in axons of CA1 pyramidal cells. Voltage transients were even amplified in the proximal region of the axon. For this, the authors obtained simultaneous whole-cell patch-clamp recordings from the soma and the axon of individual CA1 pyramidal neurons and they compared amplitudes of excitatory post-synaptic potentials (EPSPs) measured in the somatic and axonal compartments. While synaptic responses displayed little attenuation when recorded in the axon, the opposite was not verified since subthreshold potentials generated in the axon were found to be strongly attenuated in the somatic compartment ($\sim 85\%$). Next, Thome et al.

examined the role of evoked excitatory and inhibitory synaptic potentials on the generation of EAPs. The probability to evoke an EAP by extracellular stimulation of the alveus was greatly enhanced when EPSPs were evoked simultaneously. In contrast, EAPs were less successful when inhibitory postsynaptic potentials (IPSPs) were evoked with an extracellular stimulating electrode located near the soma. The relative timing between synaptic responses and EAP was found to be critical, suggesting the possible contribution of such mechanism in fast network oscillations. Thus, the findings of Thome and coworkers strongly suggest that modulation of ectopic excitability depends on propagation of somatic voltage deflections to the axonal site of EAP initiation in a time-dependent manner.

This paper is important because it opens several interesting perspectives. First, the fact that synaptic inputs arising from the somato-dendritic region modulate EAP initiation challenges the view that the distal axon is electrically independent from the soma. In fact, recent estimations of the space constant in axons give values ranging between ~200 and ~1000 μm , depending of the cell type. The originality of the findings of Thome et al. resides in the fact that space constant in the axon of CA1 pyramidal neurons was found to be highly polarized towards the axonal pole, due to the difference in somatic and axonal capacitance. Second, the facilitation of EAP induction caused by synaptic excitation may prove to be a factor aggravating cellular hyper-excitability and epileptic network discharges under pathological conditions. In addition, the time-dependence of ectopic firing modulation by synaptic inputs suggests that this process may contribute to the high precision of action potential timing during fast network oscillations. Most of previous studies devoted to the coupling between somatic and axonal compartments focused on describing the impact of axonal ion channels on firing properties measured in the cell body (Kole, 2011; Rama *et al.*, 2017). The original contribution of Thome et al. findings resides in showing that electrical activity at the input side is detected by the axon over long distances to determine whether an EAP can be triggered or not. In this study, EAPs were evoked by electrical stimulation of distal axons. Future studies will have to identify precisely the trigger and the site of EAPs initiation in axons. There is no doubt that these questions will be quickly resolved.

References:

- Dugladze T, Schmitz D, Whittington MA, Vida I & Gloveli T. (2012). Segregation of axonal and somatic activity during fast network oscillations. *Science* **336**, 1458-1461.
- Epszstein J, Lee AK, Chorev E & Brecht M. (2010). Impact of spikelets on hippocampal CA1 pyramidal cell activity during spatial exploration. *Science* **327**, 474-477.

Hamada MS & Kole MH. (2015). Myelin loss and axonal ion channel adaptations associated with gray matter neuronal hyperexcitability. *J Neurosci* **35**, 7272-7286.

Kole MH. (2011). First node of Ranvier facilitates high-frequency burst encoding. *Neuron* **71**, 671-682.

Rama S, Zbili M, Fekete A, Tapia M, Benitez MJ, Boumedine N, Garrido JJ & Debanne D. (2017). The role of axonal Kv1 channels in CA3 pyramidal cell excitability. *Sci Rep* **7**, 315.

Schmitz D, Schuchmann S, Fisahn A, Draguhn A, Buhl EH, Petrasch-Parwez E, Dermietzel R, Heinemann U & Traub RD. (2001). Axo-axonal coupling. a novel mechanism for ultrafast neuronal communication. *Neuron* **31**, 831-840.

Thome C, Roth F, Obermayer J, Yanez A, Draguhn A & Egorov AI. (2018) Synaptic enhancement of ectopic action potential generation in hippocampal pyramidal neurons. *J Physiol (this issue)*

Additional information

Competing interests

None declared.

Author contributions

Both authors have approved the final version of the manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work. All persons designated as authors qualify for authorship, and all those who qualify for authorship are listed.