

NNNT/NL : 0000AIXM0000/000ED000

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université

Le 11 Février 2022 par

Johanna Extrémet

**Rôle de LGI1 dans la régulation de
l'excitabilité intrinsèque des neurones
de CA3 :**

Implication des canaux potassiques Kv1.1

Discipline

Biologie Santé

Spécialité

Neurosciences

École doctorale

ED62 Sciences de la vie et de la
santé

**Laboratoire/Partenaires de
recherche**

Unité de neurobiologie des canaux
ioniques et de la synapse

Composition du jury

Pr Stéphane Charpier Rapporteur
UMR 7225- U1127

Dr Guillaume Sandoz Rapporteur
Affiliation

Dr Nathalie Rouach Examinatrice
UMR 7241- U1050 - Collège de France

Dr Pierre Szeppetowski Président du jury
U 1249- Université Aix-Marseille

Dr Dominique Debanne Directeur de thèse
UMR 1072- Université Aix-Marseille

Dr Michaël Russier Co-directeur de
thèse

UMR 1072- Université Aix-Marseille

Affidavit

Je soussigné, Johanna Extrémet, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Dr Dominique Debanne et Dr Michaël Russier, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille, le 9 décembre 2021



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la [Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Affidavit

I, undersigned, Johanna Extrémet, hereby declare that the work presented in this manuscript is my own work, carried out under the scientific direction of Dr Dominique Debanne and Michaël Russier, in accordance with the principles of honesty, integrity and responsibility inherent to the research mission. The research work and the writing of this manuscript have been carried out in compliance with both the French national charter for Research Integrity and the Aix-Marseille University charter on the fight against plagiarism.

This work has not been submitted previously either in this country or in another country in the same or in a similar version to any other examination body.

Place Marseille, date 9 décembre 2021



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la [Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Liste de publications et participation aux conférences

1) Liste des publications¹ réalisées dans le cadre du projet de thèse :

1. Johanna Extrémet, Laure Molinieres, Norah Guignon, Norbert Ankri, Oussama El Far, Dominique Debanne & Michaël Russier. **Rescue of intrinsic excitability in CA3 neurons from LGII-deficient mice.**

En préparation

2. Johanna Extrémet, Oussama El Far, Sarosh R Irani, Dominique Debanne & Michael Russier. **An epitope specific patient-derived LGII-autoantibody enhances neuronal excitability by modulating the Kv1.1 channel.**

Soumis bioRxiv ID#: BIORXIV/2021/471894

3. Jorge Ramirez-Franco, Kévin Debreux, Johanna Extrémet, Yves Maulet, Maya Belghazi, Claude Villard, Marion Sangiardi, Fahamoe Youssouf, Lara EL FAR, Christian Lévêque, Claire Debarnot, Pascale Marchot, Dominique Debanne, Michael Russier, Jacques Fantini, Michael Seagar, Sarosh R Irani & Oussama EL FAR **Patient-derived LGII-autoantibodies reveal the subcellular neuroglial distribution and heterogeneous interactome of LGII**

En préparation

2) Participation aux conférences² et écoles d'été au cours de la période de thèse :

1. NeuroFrance 2019 – Société des Neurosciences, Marseille, France
Présentation de poster
2. NeuroDays 2019, Marseille, France
Présentation de poster
3. Neurobinar 2 (2020)
Présentation orale
4. 28th Annual Meeting of Doctoral School (2021)
Présentation de poster

¹ Cette liste comprend les articles publiés, les articles soumis à publication et les articles en préparation ainsi que les livres, chapitres de livre et/ou toutes formes de valorisation des résultats des travaux propres à la discipline du projet de thèse. La référence aux publications doit suivre les règles standards de bibliographie et doit être conforme à la charte des publications d'AMU.

² Le terme « conférence » est générique. Il désigne à la fois « conférence », « congrès », « workshop », « colloques », « rencontres nationales et/ou internationales » ... etc.

Indiquer si vous avez fait une présentation orale ou sous forme de poster.

Résumé

LGII (Leucine-rich Glioma Inactivated 1) est une glycoprotéine sécrétée dans le système nerveux central. Sa perte de fonction génétique ou son ciblage par des auto-anticorps entraînent des phénotypes pathologiques tels que l'épilepsie autosomique dominante du lobe temporal latéral ou l'encéphalite limbique (LE) avec des crises focales fréquentes, respectivement. En conséquence, une activité épileptiforme est observée chez des souris knock-out pour LGII et dans une tranche d'hippocampe traitée avec des auto-anticorps LGII. Composé d'un domaine "Leucine Rich Repeat" (LRR) et "Epitempin" (EPTP), LGII forme un complexe transsynaptique au niveau des synapses excitatrices, qui comprend des canaux présynaptiques Kv1.1, une sous-unité de canal potassique dépendant du voltage portant un courant I_D atténuant l'excitabilité intrinsèque (IE) et la libération de glutamate. Il a été montré que la perturbation de LGII modifie l'IE et I_D .

Le but de mon travail était de vérifier si LGII pouvait contrôler l'IE via la régulation du courant porté par les Kv1.1. L'expression de LGII a été restaurée dans les neurones CA3 de souris KO (neurones KO/LGII). L'IE de type sauvage a été retrouvée par la restauration des Kv1.1 fonctionnels au niveau du segment initial de l'axone. La sécrétion de LGII par les neurones KO/LGII a été corrélée à la restauration partielle de l'IE et I_D dans les neurones adjacents.

Dans la LE, les mécanismes induits par les anticorps anti-LGII doivent être clarifiés. J'ai essayé de comprendre comment le ciblage de domaines spécifiques de LGII pouvaient induire de l'activité épileptiforme. J'ai trouvé une augmentation de l'IE corrélée à un changement des Kv1.1 fonctionnels dans les neurones de CA3 traités avec un anticorps monoclonal anti-LRR (mAb), mais pas avec un mAb anti-EPTP, par rapport au contrôle.

Dans l'ensemble, mon travail a apporté de nouvelles connaissances dans la compréhension des mécanismes par lesquels LGII contrôle l'excitabilité neuronale et comment leur perturbation pourrait expliquer l'activité épileptiforme chez les patients ADLTE et LE.

Mots clés : LGII, Excitabilité intrinsèque, Canaux potassiques Kv1.1, Épilepsie

Abstract

Leucine-rich Glioma Inactivated 1 (LGII) is a secreted glycoprotein in the central nervous system. Its genetic loss of function or its targeting by autoantibodies results in pathological phenotypes such as Autosomal Dominant Lateral Temporal Lobe Epilepsy or Limbic Encephalitis (LE) with frequent focal seizures, respectively. Accordingly, epileptiform activity is observed in LGII knock-out mice and in hippocampal slice treated with LGII autoantibodies. Composed of a Leucine Rich Repeat (LRR) and an Epitempin (EPTP) domain, LGII form a transsynaptic complex at excitatory synapses, that include presynaptic Kv1.1 channels, a voltage-gated potassium channel subunit carrying ID current that dampens intrinsic excitability (IE) and glutamate release. It was shown that LGII disruption alter IE and ID.

The aim of my work was to check whether LGII could control IE through the regulation of Kv1 channel-mediated ID current. LGII expression was restored in CA3 neurons of KO mice (KO/LGII neurons). This rescued IE by a recovery of Kv1.1-containing channel expression at the axon initial segment. As LGII is released extracellularly, a partial rescue was also observed in neurons adjacent to the KO/LGII neurons.

In LE, mechanisms induced by LGII antibodies need to be clarified. I tried to understand how domain-specific LGII-autoantibodies could induce epileptiform activities. I found an increase of IE correlated with a change in Kv1.1-containing channels in CA3 hippocampal neurons treated with a LRR-monoclonal Antibody (mAb), but not with a EPTP-mAb, compared to the control.

Overall, my work brought new insight in the understanding of mechanisms by which LGII control neuronal excitability and how their disruption could explain epileptiform activities in ADLTE and LE patients.

Mots clés : LGII, Intrinsic Excitability, Kv1.1-containing potassium channels, Epilepsy

Remerciements

Je remercie le Professeur Stéphane Charprier et le Docteur Guillaume Sandoz d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse en tant que rapporteurs, le Docteur Pierre Szepetowki d'avoir accepté d'en être le président et le Docteur Nathalie Rouach d'en être l'examinatrice.

J'aimerais tout d'abord remercier Dominique Debanne de m'avoir offert cette opportunité que je n'attendais pas. Une chance tombée du ciel qui m'a permis d'évoluer dans ce monde tout particulier qu'est la recherche. Il m'a beaucoup appris et a forgé mon expérience dans le domaine de l'écriture scientifique. Je tiens particulièrement à remercier Michaël Russier qui a fait bien plus que codiriger ma thèse. Il m'a non seulement formé à la technique de patch-clamp, mais aussi appris avec la capacité de meubler nos échanges scientifiques de multiples plaisanteries. Il m'a soutenu dans les moments difficiles et aidé pour le moindre problème. Il m'est souvent arrivé de dire « merci Papa Mika et Maman Laure » qui se sont montrés très présents pour mon initiation au patch-clamp. Laure Fronzaroli-Molinières et sa gentillesse n'ont jamais fait défaut. Une pensée pour les membres de l'équipe, Norah Boumedine qui m'a formé pour les cultures avec de la bonne humeur, Norbert Ankri à qui j'ai demandé des conseils répétés en statistiques, Béatrice Marquèze et Paikan Marcaggi pour leurs caractères spéciaux. Je remercie Maël Dumenieu pour nos échanges scientifiques, ses encouragements et son esprit de grand enfant. Un grand merci à Salvatore Incontro pour sa logorrhée verbale qui fait de lui une personne passionnante et passionnée, toujours présente pour apporter de l'espoir. Evidemment, je remercie Malika Sammari d'avoir été ma sœur de thèse, en renchérissant ou étant la cible de mes bêtises, mais toujours là pour me motiver, me soutenir, et remplir mes journées de gaieté. Je n'oublierai jamais nos moments de rigolades et nos petites séances d'escalade avec elle et les petites dernières Maria-Laura Musella, Gilliane Thésée (qui doit m'inviter en Martinique) et Konstantina Mylonaki. Merci à Kévin Paix-Dieu d'avoir été le salle-gosse du labo qui sait passer de moments scientifiques intenses à l'oligophrénie subtile. Je suis ravie d'avoir partagé un projet avec quelqu'un d'aussi éclairé. J'aurai toujours en tête, tous les apéros et les pâtisseries partagées

dans la cuisine avec tout ce petit monde. J'ai une petite pensée pour Alessandra Flores, qui n'a malheureusement pas pu être là pour la fin de ma thèse. Je remercie également Marion Sangiardi pour ses conseils jardinage/cuisine et sa jovialité et Cécile Iborra et Jennifer Bedigian pour les moments de bonne humeur passés le midi.

Un grand merci à tous ceux qui m'ont aidée tout au long de ma thèse. En particulier, Jorge Ramirez-Franco qui m'a partagé énormément de connaissances techniques et théoriques. Mes sincères remerciements pour sa patience. Je remercie également Oussama El Far pour ses conseils. Merci à Chantal Vaffides et Karine Milton pour leur aide précieuse et leur bonne humeur. Je remercie Christine Formisano d'avoir géré la plateforme génotypage pour une organisation carrée avec le sourire et Jean-marc Goillard pour sa bonne humeur et une ambiance un peu plus vivante pendant ces temps difficiles qui rendait le labo sinistre.

Je voudrais également remercier mes amies qui me soutiennent et me donnent du courage Marine Echternach et Mariama Diallo. Je remercie ma famille, tout particulièrement ma grand-mère, ma tante Laetitia, et ma mère qui sont derrière moi depuis toujours et s'assurent que j'ai une vie remplie de joie, d'amour et de réussite. Je remercie mon compagnon de vie Alexis Petit qui a toujours été là pour me soutenir que tout est possible et qu'il faut voir grand. Il a cru en moi et m'a poussé à avancer. J'ai une douce pensée pour mon père et la phrase qu'il me disait souvent sans que j'ai à faire tant d'effort.

Abréviations

ACSF : Artificial Cerebrospinal Fluid

ADAM : A Desintegrin And Metalloprotease

ADLTE : « Autosomal Dominant Lateral and Temporal lobe Epilepsy » (Epilepsie autosomique dominante du lobe temporal et latéral)

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AIS : Axon Initial Segment (Segment Initial de l'Axone)

AMPA : α -Amino-3-hydroxy-5-Méthylisoazol-4-Propionate

ARNm : Acide Ribonucléique messenger

ARNsh : Acide Ribonucléique short hairpin

Ca²⁺ : Calcium

Cd²⁺ : Cadmium

Caspr 2 : Contactin-associated protein-like 2

d-ADF : dépolarisation induced analog-digital facilitation (plasticité analogue-digitale induite par la dépolarisation)

DG : Dentate Gyrus (Gyrus Denté)

DIV : Day In Vitro

DTx-K : Dendrotoxine-K (bloqueur spécifique des Kv1.1)

EEG : Electroencéphalogramme

EPSC : Excitatory Post-Synaptic Current (Courant postsynaptique exciteur)

EPTP : Epitempin (domaine Epitempin)

FBDS : faciobrachial dystonic seizure (crises dystoniques faciobrachiale)

GABA : Acide γ -aminobutyrique

HC : Healthy Control antibodies (anticorps de patient sain)

I_D : Courant de type D porté par les canaux Kv1.1, Kv1.2 et Kv1.6

IgG : Immunoglobuline

ILAE : International League Against Epilepsy (Ligue internationale contre l'épilepsie)

IPSC : Courant postsynaptique inhibiteur

KO : Knock-Out

KO-Lgi1 : souris ou neurones Knock-Out du gène Lgi1

KO/Lgi1 : neurones Knock-Out électroporés avec un gène codant pour LGI1

KO/GFP : neurones Knock-Out électroporés avec un gène codant pour GFP

KO/D₂-Lgi1 : neurones Knock-Out électroporés avec un gène codant pour D₂-LGI1

Kv1.1 : Sous-unité des canaux potassiques voltage-dépendants (KCNA1)

LCR : Liquide CéphaloRachidien

LGII : Leucine-rich Glioma Inactivated 1 (LGII = protéine ; LgiI = gène)

LE : « Limbic Encephalitis » (Encéphalite Limbique)

LRR : Leucine Rich Repeat (domaine riche en répétition leucine)

LTP : Long Term Potentiation (Potentialisation à Long Terme)

mAb : monoclonal Antibody (Anticorps monoclonal)

Na⁺ : Sodium

Ni²⁺ : Nickel

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

PA : Potentiel d'action

PDZ : PSD-95/Disc large/zona occludens-1

PSD : Post-Synaptic Density (Densité postsynaptique)

RE : Réticulum Endoplasmique

RT : Room Temperature

SCE : Single Cell Electroporation (Electroporation sur Cellule Unique)

SNC : Système nerveux central

Tag-1 : Transiently expressed Axonal Glycoprotein 1

TLE : Temporal Lobe Epilepsy (Epilepsie du Lobe Temporal)

TTX : Tetrodotoxine

VGIC : Voltage Gated Ionic Channel

WT : Wild-Type (Type-Sauvage)

Table des matières

Introduction.....	14
1. L'hippocampe	15
1.1 Structure anatomique	15
1.2 Mécanismes de plasticité	18
1.2.2 Plasticité synaptique.....	19
1.2.3 Plasticité de l'excitabilité intrinsèque	19
2. Les épilepsies.....	21
2.1 Définitions	21
2.2 Les épilepsies.....	22
2.3 Activité épileptiforme.....	23
2.4 L'hippocampe, un foyer épileptogène	25
3. LGI1 dans le SNC.....	27
3.1 Structure de LGI1.....	27
3.2 Famille LGI	28
3.3 Partenaires d'interaction de LGI1.....	29
4. Les canaux potassiques Kv1, membre des complexes trans-synaptiques et axonaux avec LGI1 .	32
4.1 Structure.....	32
4.2 Profil d'expression	33
4.3 Régulation de l'activation et de l'expression membranaire des Kv1	34
4.4 Les canaux Kv1 dans l'excitabilité.....	36
4.4.1 Courant I_b	36
4.4.2 Rôle des canaux Kv1 dans l'excitabilité	37
4.5 Pathologies associée aux Kv1.1	38
5. Auto-anticorps anti-LGI1	39
5.1 LGI1 dans les encéphalopathies	39
5.2 Encéphalite Limbique associée à LGI1.....	40
5.3 Mode d'action des auto-anticorps anti-LGI1.....	41
5.3.1 Conséquences électrophysiologiques et acteurs moléculaires.....	41
5.3.2 Mécanismes dépendant du ciblage de l'épitope	42
6. ADLTE.....	45
6.1 Modèle murins KO-Lgi1	45
6.2 Types de mutation.....	46
6.3 Conséquence dans le développement	47
6.4 Effet dans la synapse	50
6.5 Modulation de l'excitabilité	52

7. Problématique :	53
Matériels et Méthodes	55
1. Modèle d'étude	56
1.1 Production de souris KO LGI1	56
1.2 Caractérisation du modèle KO-Lgi1	56
1.3 Cultures organotypique d'hippocampe	57
2. Traitements	57
2.1 Electroporation sur cellule unique	57
2.2 Application des mAbs	59
3. Electrophysiologie	60
3.1 Enregistrement de l'excitabilité intrinsèque	60
3.1.1 Neurones électroporés dans cultures organotypiques de souris KO-Lgi1	60
3.1.2 Cultures de rats traités avec les IgGs	61
3.2 Induction de la plasticité à court terme (d-ADF)	62
4. Immunohistochimie	62
4.1 Protocole d'immunomarquage des Kv1.1 et de la D ₂ -LGI1	62
4.2 Traitement d'images et quantification	63
Résultat	65
1. Rescue of intrinsic neuronal excitability in LGI1-deficient neurons	66
2. An epitope specific patient-derived LGI1-autoantibody enhances neuronal excitability by modulating the Kv1.1 channel	91
3. Analyse spatiale des mécanismes liés à la régulation des canaux Kv1.1 par LGI1	103
Discussion	110
1. Restauration du phénotype électrophysiologique de type sauvage	111
2. Effet paracrine	113
3. Anticorps de patients atteints de LE	114
4. Analyse spatiale des mécanismes liés à la régulation des canaux Kv1.1 par LGI1	115
Perspectives	117
1. Anticorps monoclonaux anti-EPTP	118
2. Régulation des canaux Kv1.1 indépendante de LGI1	119
3. Rôle de LGI1 dans la synapse	120
Conclusion	122
Bibliographie	124

Introduction

1. L'hippocampe

1.1 Structure anatomique

L'hippocampe est une structure limbique du système nerveux central (SNC) impliquée dans l'apprentissage, la mémorisation et les processus de navigation dans l'environnement. Selon l'hémisphère, il contrôlerait le stockage des informations spatiales et visuelles ou linguistiques. En interaction perpétuelle avec les autres structures cérébrales, l'hippocampe permet de traiter des informations provenant d'aires associatives des cortex visuel, auditif, préfrontal, pariétal et temporal. Il reçoit spécifiquement des afférences du cortex entorhinal médial et latéral et envoie des projections dans le subiculum, le cortex entorhinal et les structures parahippocampiques (Figure 1 ; Rolls, 2013).

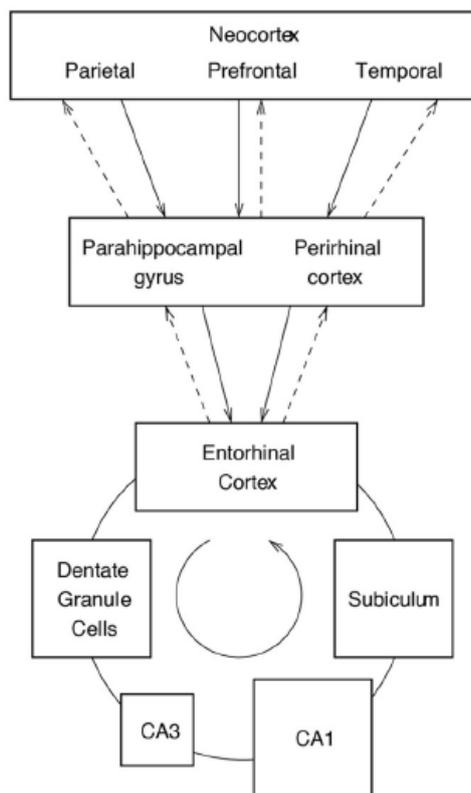


Figure 1. Schéma des connexions de l'hippocampe avec les aires associatives du néocortex et de la boucle multi-synaptique intra-hippocampique (Rolls, 2013)

Le transfert des informations au sein de l'hippocampe repose sur la boucle multi-synaptique dont il est composé : le gyrus-denté (DG : Dentate Gyrus) est la structure d'entrée

composée de cellules granulaires qui envoient des afférences à l'aire CA3 par les fibres moussues. Ces fibres moussues forment des boutons « en passant » préférentiellement dans les structures post-synaptiques complexes appelées « thorny excrescences » des neurones pyramidaux présents principalement dans CA3 dorsal (Witter, 2007) ; l'aire CA3 où se trouvent les neurones pyramidaux de la couche moléculaire envoie des projections dans l'aire CA1 par les collatérales de Schaffer ; l'aire CA1 assure la sortie de l'axe tri-synaptique en projetant dans le subiculum ou le cortex entorhinal (**Figure 1** ; Rolls, 2013). Des études récentes soulignent des différences morphologiques des cellules de l'hippocampe selon l'axe dorso-ventral (**Figure 2**), de sorte que la longueur transverse de la couche pyramidale augmente du côté dorsal au côté ventral, ou que l'arborisation dendritique soit plus complexe dans le côté ventral par rapport au côté dorsal dans CA3. Ce phénomène est également observé dans CA1, mais de façon opposé dans l'axe dorso-ventral. L'hétérogénéité morphologique et fonctionnelle reste relativement peu explorée dans CA3 comparé à CA1 (Sun et al., 2020; Witter, 2007).

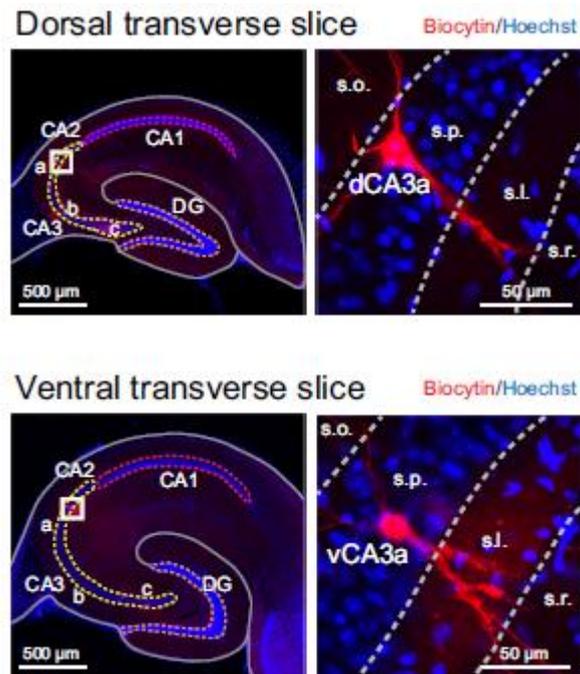


Figure 2. Image représentative d'une coupe transversale de l'hippocampe (gauche) et des cellules pyramidale de CA3 à fort grossissement (droite), dans la partie dorsale et ventrale (Sun et al., 2020).

Au centre de ce circuit, l'aire CA3 compte de nombreuses interconnexions parmi les cellules principales, à partir d'un système de collatérales récurrentes (**Figure 3**). Elle forme à elle seule un réseau avec 2% de connectivité entre les différents neurones de CA3, avec connexions bilatérales (Rolls, 2013). Elle reçoit également des afférences directes du cortex entorhinal par la voie perforante, permet la transmission de l'information à la suite du circuit et assure un contrôle « feedback » en projetant des voies excitatrices sur les cellules granulaires du gyrus denté (Kesner, 2007).

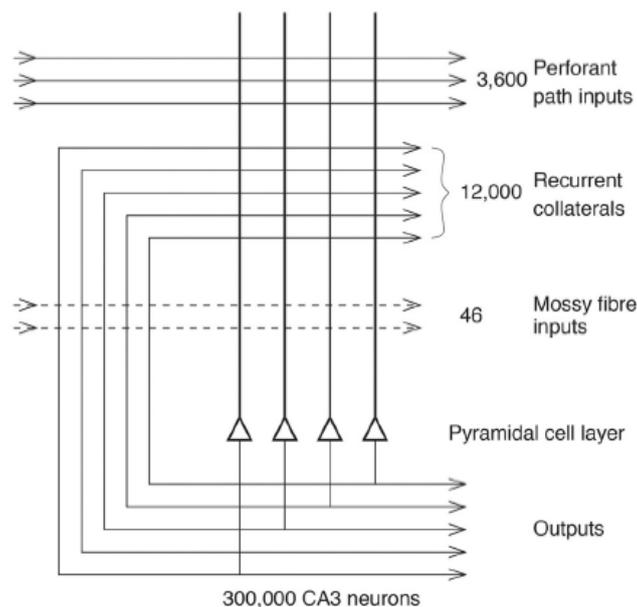


Figure 3. Schéma du système de collatérales récurrentes dans CA3 (Rolls, 2013)

Le système de collatérales récurrentes spécifique à l'aire CA3 est surnommé réseau auto-associatif. Les interconnexions CA3-CA3 sous-jacentes confèrent à cette structure, un rôle dans le codage des nouvelles informations spatiales temporaires. Elle est ainsi sollicitée lorsque l'animal fait appel à la mémoire de travail, pour maintenir des informations pendant une courte période durant laquelle l'information est traitée ou mise en relation avec une autre. Le système de collatérales récurrentes permettrait ainsi l'association bidirectionnelle entre 2 stimuli (Kesner, 2007).

1.2 Mécanismes de plasticité

Le potentiel d'action (PA) est une brusque variation du potentiel de membrane d'une cellule caractérisée par une dépolarisation suivie d'une repolarisation et d'une hyperpolarisation dus à une entrée d'ions sodium suivie d'une sortie d'ions potassiums. Lorsque le PA arrive dans la terminaison synaptique, la libération de neurotransmetteur dans la synapse conduit à une réponse de l'élément post-synaptique sous forme de potentiel/courant post-synaptique excitateur (EPSP/C) ou inhibiteur (IPSP/C).

Dans le SNC, l'information transmise d'un neurone présynaptique à un neurone post-synaptique n'est pas uniquement portée par un signal « tout ou rien » que représente le PA (Beck and Yaari, 2008). Le message nerveux peut être codé par la fréquence ou le temps d'occurrence des PA, par leur forme, leur capacité de propagation le long de l'axone, mais également par le potentiel sous-seuil et la résistance intracellulaire (Debanne, 2004). Ces caractéristiques façonnent le profil de décharge des neurones et dépendent de leurs propriétés moléculaires et morphologiques. La pluralité des patterns électrophysiologiques présents dans l'hippocampe permet de coder le stockage d'informations. Ces derniers font intervenir des processus de plasticité hautement retrouvés dans l'hippocampe, permettant la sélection d'informations au détriment d'autres (Rolls, 2013; Zhang and Linden, 2003).

La plasticité cérébrale désigne la faculté des neurones à induire des modifications en réponse à l'adaptation de son environnement ou de changements internes (Daoudal and Debanne, 2003). Du fait de sa capacité à traiter les informations en fonctions de modifications environnementales, l'hippocampe est une structure sujette à de nombreuses modifications à l'échelle neuronale et du réseau formé par les interconnexions neuronales.

La plasticité peut être d'origine neurodéveloppementale, homéostatique ou intégrative face à des variations d'activité. Au cours du développement surviennent des modifications morphologiques dans un objectif de maturation du réseau neuronal. Le nombre de synapse est diminué par un processus appelé « l'élagage synaptique » et la croissance axonale est modulée

pour établir des connexions sélectives et persistantes (Homma et al., 2018). La plasticité homéostatique est responsable d'un maintien de l'état stable des fonctions et du réseau neuronal lors d'activités excessives anormales (Beck and Yaari, 2008). Dans l'hippocampe, les composantes intégratives sont médiées par des modifications de la force synaptique ou de l'excitabilité intrinsèque des neurones.

1.2.2 Plasticité synaptique

La transmission synaptique peut être modulée dépendamment de l'expérience. Selon les stimuli, l'efficacité synaptique est amplifiée (long term potentiation : LTP) ou diminuée (long term depression : LTD) sur du long terme. Ces changements synaptiques dans l'hippocampe dureraient le temps de l'intégration et la consolidation des informations dans l'hippocampe et le cortex. La régulation de la LTP et la LTD en association est essentielle pour permettre un apprentissage efficace (Martin and Morris, 2002). Les changements synaptiques fréquemment évalués dans l'hippocampe comprennent les modifications d'expression post-synaptique des récepteurs AMPA (α -Amino-3-hydroxy-5-Méthylisozazol-4-Propionate) et NMDA (N-méthyl-D-aspartate) et la régulation de la libération de neurotransmetteurs au niveau présynaptique (Foster et al., 2000; Nakazawa et al., 2003). Il est souvent souligné que même si le blocage de la plasticité synaptique est fortement susceptible d'empêcher l'apprentissage, des perturbations de l'apprentissage ne sont pas toujours causées par un défaut de plasticité synaptique (Martin and Morris, 2002). Cela peut s'expliquer par l'interaction de différentes formes de plasticité dans l'hippocampe (Daoudal and Debanne, 2003).

1.2.3 Plasticité de l'excitabilité intrinsèque

L'excitabilité intrinsèque se définit par la capacité du potentiel de membrane d'un neurone à émettre un PA en réponse à une entrée excitatrice. Ce paramètre dépend uniquement de l'équipement du neurone en canaux dépendants du voltage (VGIC : Voltage Gated Ionic Channels). La nature de la composition en VGIC détermine la transduction du signal PSP/PA :

d'un signal entrant à un signal sortant. Les changements de l'excitabilité intrinsèque jouent un rôle important dans le stockage de la mémoire, mais sont également cruciaux pour stabiliser l'excitabilité du réseau en réponse à de l'activité persistante prolongée (Beck and Yaari, 2008; Desai et al., 1999).

L'excitabilité du neurone peut être modifiée par la régulation des propriétés cinétiques des VGIC ou leur densité d'expression répartie dans un compartiment spécifique du neurone. La régulation transcriptionnelle et post-traductionnelle sont donc mis en jeu lors de modification de l'activité du réseau. Dans les dendrites et le soma, ils permettent de potentialiser ou d'atténuer le signal porté par l'EPSP alors que dans le segment initial de l'axone (AIS), ils participent à l'initiation du PA et à l'ajustement du couplage soma/AIS (Daoudal and Debanne, 2003; Ovsepien et al., 2016). Dans la synapse, ils affectent l'exocytose des vésicules contenant les neurotransmetteurs (Bialowas et al., 2015).

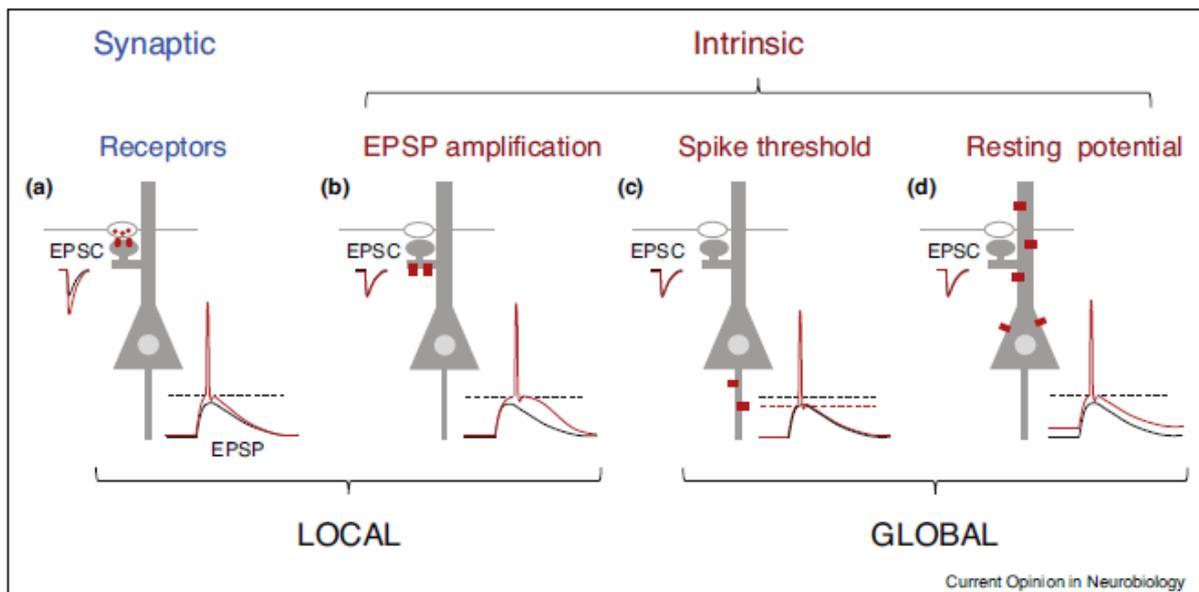


Figure 4. Schéma représentant différents mécanismes qui modulent la fonction entrée-sortie d'un signal (Debanne et al., 2019)

Les paramètres pouvant être modifiés par les VGIC peuvent être associés à :

- La régulation de propriétés actives tels qu'une modulation de la forme de l'EPSP (Figure 4b), du seuil de déclenchement du PA (Figure 4c) ou la forme du PA (l'amplitude, la largeur).

- La régulation des propriétés passives du neurone tel que le potentiel de repos (Figure 4d)
- Le profil de décharge tels que la pente précédant le PA, l'after-dépolarisation (cellules burstantes), ou l'after-hyperpolarisation (Beck and Yaari, 2008; Daoudal and Debanne, 2003; Morgan et al., 2019).

Les modifications de l'excitabilité à partir de l'activité du réseau peuvent compléter la plasticité synaptique de façon synergique dans le site post-synaptique des neurones glutamatergiques de l'hippocampe. Dans ce sens, il a été suggéré que l'excitabilité intrinsèque permettrait de faciliter les modifications de la force synaptique lors d'un processus d'apprentissage. Par exemple, l'excitabilité intrinsèque participerait localement à la sélection d'entrées synaptiques lors du processus de plasticité qui implique le couplage EPSP/PA (Daoudal and Debanne, 2003). Une modification de l'excitabilité intrinsèque à partir de la modulation des canaux potassiques dépendant du voltage Kv1.1 dans les « place cells » ou cellules de lieu a été associée à des modifications de la force synaptique et de modifications homéostatiques lors de l'exploration d'un nouvel environnement (Morgan et al., 2019). Par ailleurs, une diminution de l'atténuation du PA dépendant des récepteurs NMDA associée à l'exploration de l'environnement a été observée (Quirk et al., 2001). Ainsi, toutes ces formes de plasticité sont interdépendantes.

Dans l'hippocampe, le contrôle de ces formes de plasticité est critique pour éviter la synchronisation de décharges des populations neuronales observée dans des conditions pathologiques telle que l'épilepsie (Wellmer et al., 2002).

2. Les épilepsies

2.1 Définitions

L'établissement clair d'un diagnostic nécessite une définition précise de la pathologie.

En 2005, la Ligue internationale contre l'épilepsie (ILAE) a formulé des définitions conceptuelles de « épilepsie » et de « crise ». L'épilepsie se définit comme un trouble du cerveau caractérisé par une prédisposition durable à générer des crises d'épilepsie et par les conséquences neurobiologiques, cognitives, psychologiques et sociales de cette maladie. Une crise d'épilepsie est une apparition transitoire de signes et/ou de symptômes dus à une activité neuronale anormale excessive ou synchrone dans le cerveau. La définition de l'épilepsie nécessite la survenue d'au moins une crise d'épilepsie. Le nombre de crises induites chez un patient, multiplie les chances d'en provoquer une suivante. C'est pourquoi la définition de l'épilepsie a été mise à jour en 2014.

Dès lors, 3 conditions s'appliquent pour définir l'épilepsie :

(1) Au moins deux crises non provoquées se produisant à plus de 24 h d'intervalle ; (2) une crise non provoquée et une probabilité de nouvelles crises similaire au risque général de récurrence (au moins 60 %) après deux crises non provoquées, survenant au cours des 10 prochaines années ; (3) diagnostic d'un syndrome épileptique (Fisher et al., 2014).

2.2 Les épilepsies

La description et classification des pathologies associées à l'épilepsie dépend de plusieurs caractéristiques. Celles-ci contribuent à la diversité des phénotypes observés, d'où l'utilisation du pluriel dans le terme « épilepsies ».

A la différence des crises généralisées qui sont initiées et propagées dans des réseaux distribués bilatéralement, les crises focales restent limitées à des réseaux d'un hémisphère de façon localisée ou plus largement distribuée. Selon la localisation et l'état de propagation de la crise, une rupture de la conscience ou des troubles cognitifs seront observés (Berg et al., 2010).

Des facteurs transitoires provoquent des crises dites « réactives », lorsqu'ils abaissent le seuil de crise de façon temporaire. Au contraire, selon l'étiologie des crises, la susceptibilité à la

survenue des crises peut perdurer (Fisher et al., 2014). Un individu peut être atteint d'épilepsie selon les causalités suivantes :

- Une mutation génétique, bien qu'un facteur environnemental soit à prendre en compte.
- Des lésions structurales ou des perturbations métaboliques telles que des attaques cérébrales, traumatismes, infections, réactions auto-immunes ou malformations génétiques.
- Inconnue

La combinaison de symptômes épileptiques reconnaissables forme un groupe d'entité clinique appelée « syndrome épileptique » qui peut être complété selon la spécificité de la lésion de l'individu par exemple. L'âge d'apparition des crises, la présence de perturbations cognitives, développementales, motrices, sensorielles, le profil EEG et d'occurrence des crises discriminent les syndromes épileptiques. L'activité épileptique elle-même et non la pathologie sous-jacente peut également provoquer ces dysfonctionnements (Berg et al., 2010).

2.3 Activité épileptiforme

L'activité ictale est l'activité neuronale enregistrée par électroencéphalogramme (EEG) dans la structure concernée lors d'une crise épileptique (Chabrol et al., 2010). Elle prend en compte l'activité épileptiforme qui se caractérise par des décharges synchronisées spontanées dans les populations neuronales (**Figure 5**).

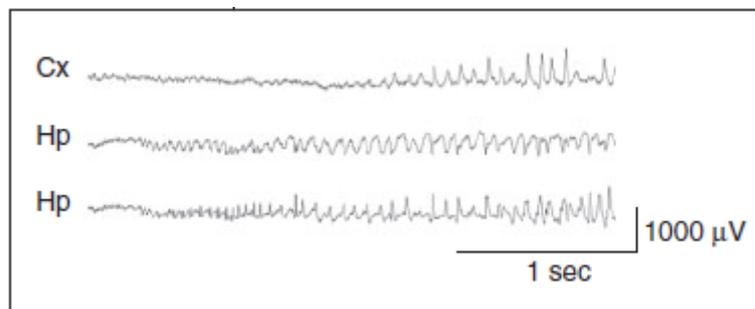


Figure 5. Activité EEG ictale dans le cortex et l'hippocampe (Chabrol et al., 2010)

La génération et le maintien de cette activité est le reflet de l'hyperexcitabilité neuronale. Ces décharges spontanées peuvent également être observées *in vitro*, dans l'hippocampe de modèles murins épileptiques (**Figure 6** ; Hochman et al., 1999).

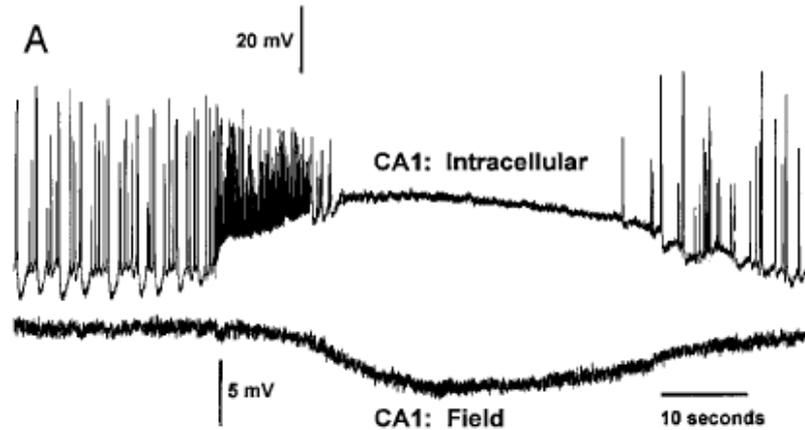


Figure 6. Enregistrement intracellulaire (en haut) et de champ (en bas) de neurones pyramidaux de CA1 (Hochman et al., 1999)

Des manifestations comportementales correspondent au profil d'activité neuronal déclenché par l'initiation de la crise. Il peut s'agir d'hyperextension des membres (crise tonique) ou de mouvements incontrôlés par secousses rythmiques (crise clonique), d'une combinaison des deux ou de rupture de conscience sans caractéristique observable (absence) chez l'homme (Berg et al., 2010). Les modèles murins épileptiques présentent également des mouvements toniques et cloniques, en plus de courses rapides, et d'automatismes oro-alimentaires.

Après la crise, l'activité ictale prend fin avec une longue dépression de l'activité EEG jusqu'à l'expression d'activité interictale qui diffère d'un sujet sain par la présence de PA de forte amplitude ou d'ondes de multi-PA (« polyspike waves ») sans manifestations comportementales (**Figure 7** ; Chabrol et al., 2010).

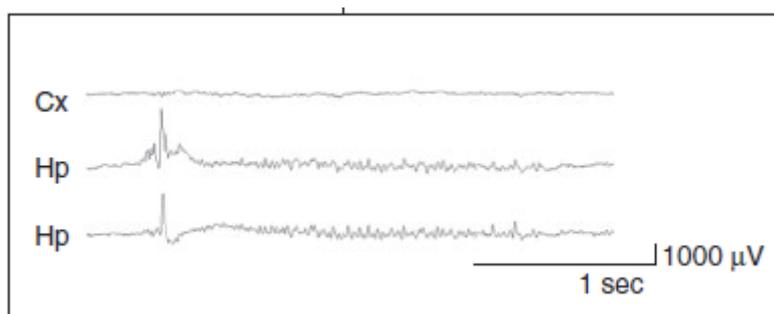


Figure 7. Activité EEG interictale dans le cortex et l'hippocampe (Chabrol et al., 2010)

2.4 L'hippocampe, un foyer épileptogène

L'hippocampe est une structure particulièrement sujette aux crises d'épilepsie induisant des changements fonctionnels et structuraux durables (Khrestchatisky et al., 1995). L'épilepsie du lobe temporal (TLE : temporal lobe epilepsy) est l'épilepsie à crises focales observée à l'âge adulte la plus connue. Toute perturbation de l'équilibre excitation/inhibition dans un réseau neuronal résulte d'une hyperexcitabilité synchrone incontrôlée causée soit par une potentialisation des stimuli excitateurs, soit un affaiblissement des stimuli inhibiteurs (Steinlein, 2004). Cet équilibre peut facilement vaciller dans l'hippocampe, non seulement par une perturbation des systèmes de plasticité, mais surtout du fait de sa particularité structurale.

Lorsque l'équilibre du réseau CA3 tend vers de l'excitabilité excessive, un renforcement persistant des synapses actives à feedback positif peut entraîner la synchronisation des populations de neurones du réseau. La structure en boucles neuronales CA3-CA3 formées par les synapses des collatérales récurrentes des neurones principaux serait responsable d'un passage totalement actif en un passage totalement quiescent du réseau dans le cas d'un tel déséquilibre, concordant à la transition de l'activité ictale en activité post-ictale (Bains et al., 1999). Cette organisation de type feedback récurrent, cruciale pour les fonctions comportementales, serait donc fortement sensible à l'initiation ou la propagation d'une activité épileptiforme. En accord avec ces observations, le développement de contacts aberrants par les fibres moussues concomitant avec de la mort neuronale a été noté après un « status epilepticus » caractéristique dans la TLE (Khrestchatisky et al., 1995). Les fibres moussues projetant majoritairement sur les interneurons inhibiteurs GABA dans CA3, la lésion induite par l'épilepsie conduirait à la perte d'innervation de leur cible et la formation de connexions récurrentes excitatrice anormale avec les cellules granulaires, caractéristique de futures crises d'épilepsies (Frotscher et al., 2006).

Ainsi, l'apprentissage n'est pas le seul processus géré par des formes de plasticité dépendante de l'expérience dans l'hippocampe. Des facteurs génétiques et métaboliques produisent des modifications de l'excitabilité et de la synapse à la base d'un phénotype

épileptique (Steinlein, 2004). De plus, les modifications persistantes de la fonction synaptique, de l'excitabilité intrinsèque ou structurales après un « status epilepticus » conduisent à des conditions permanentes épileptiques. Cette plasticité dite « réactive » est la conséquence de crises d'épilepsie. (Khrestchatsky et al., 1995; Wellmer et al., 2002).

Les canalopathies sont des pathologies résultantes d'une mutation du gène codant pour un canal ionique ou un récepteur canal (Steinlein, 2004), de la perturbation de sa régulation transcriptionnelle, traductionnelle ou post-traductionnelle (Bernard et al., 2004; Jung et al., 2007) ou du blocage de sa fonction par auto-immunité (Haselmann et al., 2018). Des changements des propriétés intrinsèques et synaptiques en découlent, modifiant l'activité des neurones touchés selon l'expression du canal ionique perturbé et déséquilibrant la stabilité excitation/inhibition. Ces patients présentent des crises d'épilepsie, dont le traitement a pour cibles pharmacologiques les canaux ioniques ou récepteurs canal, mais présentent le plus souvent une résistance à ces antiepileptiques (Yokoi et al., 2015).

Bien que la plupart des formes familiales de l'épilepsie soit générées par des mutations de canal ionique, la mutation de la Leucine-rich Glioma Inactivated 1 (LGI1), une protéine sécrétée dans le SNC (Senechal et al., 2005), est connue pour causer l'épilepsie du lobe temporal latérale autosomique dominante (ADLTE : Autosomal Dominant Lateral and Temporal lobe Epilepsy) (Kalachikov et al., 2002). Elle a également été montrée comme étant la cible d'auto-anticorps chez les patients atteints d'encéphalite limbique (Lai et al., 2010).

Au cours de ma thèse, j'ai étudié les modifications des propriétés intrinsèques associées à ces pathologies afin d'en apprendre davantage sur les mécanismes contribuant au phénotype épileptique.

3. LGI1 dans le SNC

3.1 Structure de LGI1

La LGI1 est une glycoprotéine exprimée dans le SNC (Head et al., 2007) premièrement identifiée comme suppresseur de métastases dans les glioblastomes (Kunapuli et al., 2003), jouant également un rôle dans la migration et la maturation neuronale (Feng et al., 2019; Kalachikov et al., 2002; Zhou et al., 2009) et impliquée dans les pathologies associées à des troubles épileptiques (Chabrol et al., 2010; Lalic et al., 2011; Staub et al., 2002). Elle est composée d'un domaine riche en leucine (LRR : Leucine-rich repeats) et d'un domaine Epitempin (EPTP) (**Figure 8**). Le gène *Lgi1* localisé sur le chromosome 10q24 code pour une protéine de 63KDa comptant un peptide signal dans les 35 premiers résidus en N-terminal responsable de sa sécrétion (Leonardi et al., 2011). De nombreux sites de N-glycosylations sont essentiels pour sa sécrétion (Sirerol-Piquer et al., 2006). Cinq répétitions riches en leucines sont flanquées par 2 régions riches en cystéines dans la région N-terminale (**Figure 8**). Des ponts disulfures prodiguent une stabilité de la structure aux extrémités N- et C- terminales du domaine LRR également maintenus par des résidus chargés négativement exposés aux solvants. Le domaine EPTP se trouve dans la partie C-terminal et se compose de 7 répétitions en tandem de 50 acides aminés (**Figure 8**). Ces répétitions se replient en feuillets β formant une hélice (Leonardi et al., 2011; Staub et al., 2002; Yamagata and Fukai, 2020). Le domaine EPTP possède une zone de résidus hydrophobes au centre de l'hélice β formée par les pales de feuillets β et des résidus qui confèrent une charge positive à l'extérieur de l'hélice. L'opposition de charge des deux domaines permet de stabiliser sa structure (Leonardi et al., 2011).

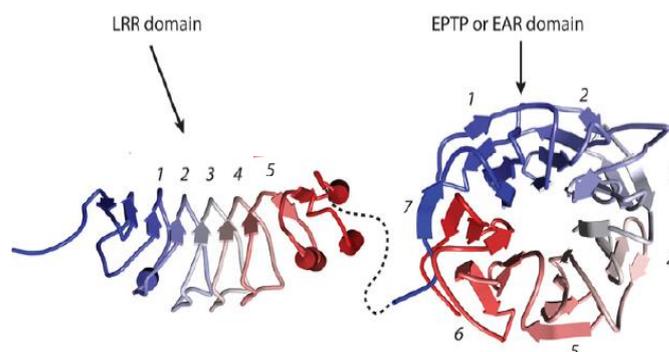


Figure 8. Représentation prédictive de la protéine LGI1 (Kegel et al., 2013)

3.2 Famille LGI

Lgi1 partage 97% de similitude entre le gène murin et son homologue humain. LGI1 fait partie d'une famille de protéines dont les gènes paralogues ont un haut degré de similarité de séquence, appelés Lgi2, Lgi3 et Lgi4. De façon intéressante, ces 4 protéines sont issues de gènes paralogues situés sur 4 chromosomes différents chez la souris comme chez l'homme (Gu et al., 2002). Elles sont chacune également composées de domaines LRR et EPTP. Une région plus spécialisée dans la partie N-terminal de LRR et des substitutions d'acides aminés dans le domaine EPTP différencient les membres de la famille Lgi. Par exemple, une mutation de type insertion dans une boucle située dans la 4^{ème} répétition EPTP chez Lgi1 se trouve absente chez les autres membres de la famille Lgi, qui dépasse du côté hydrophobe et confère une spécificité fonctionnelle à LGI1. (Leonardi et al., 2011).

Ces protéines ont toutes une implication dans le développement neuronal, c'est pourquoi l'expression de leur transcrits prédomine dans le cerveau à des stades critiques des processus de maturation (Zhou et al., 2009). Ceux de Lgi2 sont également retrouvés dans le cœur et le placenta et ceux de Lgi3 dans tous les tissus (Gu et al., 2002; Kalachikov et al., 2002). Dans le cerveau, l'ARNm de Lgi1 est retrouvé dans les structures néocorticales et limbiques et très rarement dans le système périphérique, avec une prédominance dans le cortex ventral par rapport au cortex dorsal (Kalachikov et al., 2002). L'expression de son transcrit augmente pendant la 1^{ère} semaine post-natale dans l'aire CA3 et pendant la 2^{ème} semaine post-natale dans le gyrus denté de l'hippocampe suggérant un rôle de la LGI1 dans la maturation neuronale (Smedfors et al., 2018).

En effet, il a été montré que LGI1 est impliquée dans la croissance neuritique dans l'hippocampe et la migration neuronale dans le cortex et sa perte de fonction dans ces processus causerait des crises épileptiques (Feng et al., 2019; Owuor et al., 2009). La perte de fonction de LGI2 est associée à des troubles épileptiques survenant durant l'enfance et disparaissant spontanément aux alentours de 10 ans. Un rôle de LGI2 dans la protection du cerveau au cours

de la mise en place des réseaux neuronaux et de l'élagage synaptique serait initié à un stade développemental précoce. Cette hypothèse suggère également que LGI1 participerait en aval de LGI2, au remodelage du réseau dans des conditions protectrices d'un déséquilibre excitation/inhibition (Seppälä et al., 2011). LGI3 est également exprimée au début de la phase d'élagage synaptique et intervient dans la croissance neuritique (Park et al., 2010). Malgré un croisement des fonctions de ces 3 protéines dans la maturation du réseau neuronal, il a été montré que LGI3 ne peut pas compenser la perte de LGI1 (Fukata et al., 2010). Concernant LGI4, davantage de similitudes seraient partagées avec LGI3 qu'avec LGI1 du point de vue évolutif (Leonardi et al., 2011). Par ailleurs, LGI4 semble présenter un rôle focalisé dans le système nerveux périphérique en régulant l'activité des cellules de Schwann pour la myélinisation des nerfs périphériques en développement (Ozkaynak et al., 2010) ou dans la gliogénèse du système nerveux entérique (Nishino et al., 2010).

3.3 Partenaires d'interaction de LGI1

L'interaction de LGI1 avec ses récepteurs transmembranaires A Disintegrin And Metalloprotease 22, 23 et 11 (ADAM22 ADAM23 et ADAM11) à partir de l'hélice β du domaine EPTP a fréquemment été mis en évidence dans la littérature (Fukata et al., 2006, 2010; Owuor et al., 2009; Sagane et al., 2008; Yamagata and Fukai, 2020). Les ADAM contiennent une partie métalloprotéase inactive et sont enrichies dans le cerveau (Owuor et al., 2009). L'expression de l'ARNm de ADAM22 suit le profil d'expression de Lgi1 dans l'hippocampe (Smedfors et al., 2018). L'interaction du complexe LGI1/ADAM22 a été confirmée par cristallographie et le type de liaisons a été caractérisé, menant à la conclusion que LGI1 interagit de la même manière avec ADAM23. Une poche hydrophobe se formerait dans l'hélice du domaine EPTP de LGI1 pour se lier à son récepteur ADAM22 ou ADAM23 (Yamagata et al., 2018). Ainsi, de nombreuses études soutiennent l'hypothèse d'un rôle de LGI1 dans le maintien d'un complexe trans-synaptique tripartite avec ADAM23 sur le versant présynaptique et ADAM22 sur le versant post-synaptique (**Figure 9** ; Fukata et al., 2021, 2010; Yamagata and Fukai, 2020). La longueur de ce complexe

peut atteindre la taille d'une fente synaptique. Il s'agirait d'un assemblage hétéro-tétramérique qui serait assurée par la dimérisation de 2 LGI1 par le domaine LRR de l'une et le domaine EPTP de l'autre : ADAM22-LGI1-LGI1-ADAM22/23 (Y Fukata et al., 2021; Yamagata et al., 2018).

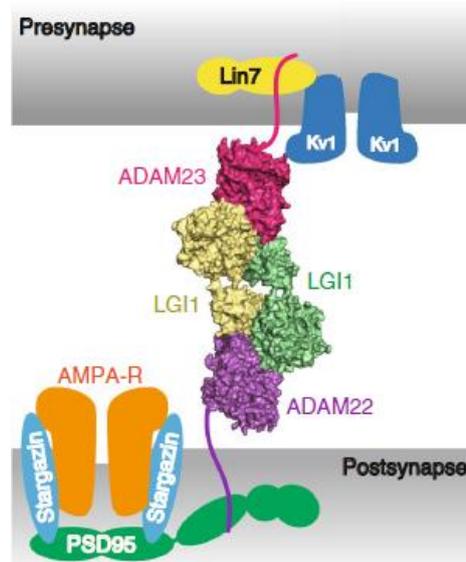


Figure 9. Modèle du complexe transsynaptique tripartite ADAM22-LGI1₂-ADAM22/23 dans la synapse excitatrice (Yamagata and Fukai, 2020)

Au niveau post-synaptique, ADAM22 selon son épissage, est capable de lier la protéine PSD-95 (Post-Synaptic Density 95) dans sa partie intracellulaire par son motif de liaison au PDZ (PSD-95/Disc large/zona occludens-1) présent au niveau C-terminal. Ainsi, ADAM22, LGI1, et PSD-95 ont été trouvés colocalisées dans les synapses de l'hippocampe (Fukata et al., 2006). Il a été montré que la présence de LGI1 et son interaction avec ADAM22 sont cruciales pour maintenir une transmission synaptique fonctionnelle médiée par les récepteurs AMPA et NMDA. Cela dépendrait de la stabilisation des protéines MAGUK telle que PSD-95 (Fukata et al., 2010; Y Fukata et al., 2021; Lovero et al., 2015). Au contraire, ADAM23 ne possède pas de motif de liaison au PDZ mais son interaction avec LGI1 contribue tout de même au maintien de la stabilité morphologique et fonctionnelle des neurones dont la perturbation peut conduire à un phénotype épileptique (Owuor et al., 2009).

L'analyse protéomique de LGI1 a également révélé la présence des canaux potassiques de type Kv1 dans un complexe avec ADAM22, ADAM23, PSD-93 et PSD-95 (Fukata et al., 2010).

Ainsi, il a été suggéré que LGI1 lie les canaux Kv1 indirectement par ADAM22 ou ADAM23 (Fukata et al., 2021, 2010). Le consensus décrivant le complexe trans-synaptique tripartite comptant les canaux Kv1 dans la terminaison pré-synaptique, LGI1 dans la synapse et ADAM22 et PSD-95 dans le versant post-synaptique est très fréquemment proposé. Cependant, les études discutent plus rarement de la présence d'un complexe formé par LGI1, ses partenaires d'interaction et les canaux Kv1 dans l'axone. Pourtant, ADAM22 et ADAM23 sont enrichis dans l'AIS (Figure 10). Un rôle de chaperone a été suggéré par ADAM22 et ADAM23, favorisant la sortie de LGI1 du Réticulum Endoplasmique (RE) et contrôlant son trafic intracellulaire. En culture primaire d'hippocampe, il semble que ADAM23 favoriserait le transport de LGI1 vers la terminaison présynaptique alors que ADAM22 permettrait davantage un transport bidirectionnel. ADAM22, nécessaire à l'adressage de LGI1 à l'AIS contrairement à ADAM23, se trouve également colocalisé avec les canaux Kv1 dans ce compartiment des neurones de l'hippocampe (Figure 10 ; Hivert et al., 2018). Les molécules d'adhésion cellulaire CASPR2 et Tag-1 sont également retrouvées dans le complexe axonal avec les Kv1. Tag-1 est co-immunoprécipité avec ADAM22 et LGI1 et enrichi avec les Kv1 dans l'AIS en culture primaire d'hippocampe (Figure 10 ; Hivert et al., 2018; Ogawa et al., 2008).

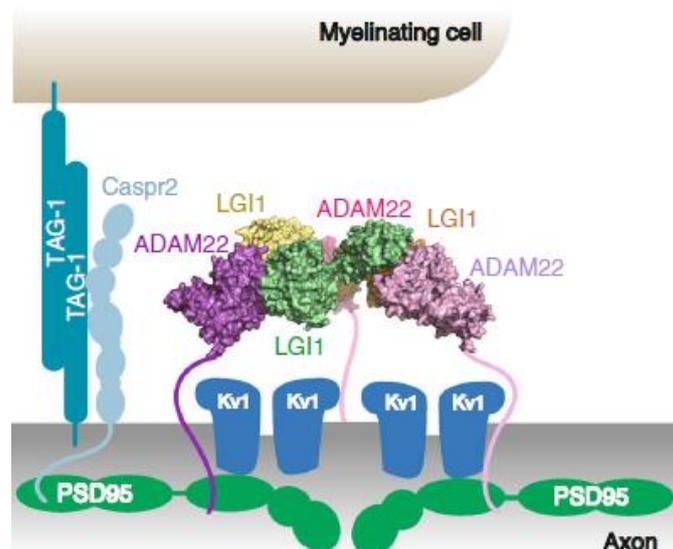


Figure 10. Modèle du complexe 3:3LGI1/ADAM22 dans l'AIS (Yamagata and Fukai, 2020)

LGI1 contrôlerait l'expression ou la cinétique d'activation des Kv1 dans ces complexes (Schulte et al., 2006; Seagar et al., 2017), mais les mécanismes liés à ce processus restent peu clairs. La régulation des Kv1 dépend d'une multitude de mécanismes dans lesquels pourrait intervenir LGI1, que je décrirai ultérieurement.

4. Les canaux potassiques Kv1, membre des complexes trans-synaptiques et axonaux avec LGI1

Les canaux potassium dépendant du voltage Kv1 contribuent à la régulation de l'excitabilité des neurones dans le SNC selon leur composition en sous-unités, leur profil d'expression spatial et temporel et leur cinétique d'activation. Il est à présent connu que LGI1 intervient dans ce processus de régulation en modulant les propriétés d'activation ou d'expression des Kv1 (Schulte et al., 2006; Seagar et al., 2017). Cependant, LGI1 est sécrétée dans la matrice extracellulaire alors que les processus de régulation des Kv1 se produisent dans le cytosol de la cellule. Les mécanismes qui sous-tendent un rôle dans une fonction commune de ces deux protéines qui subsiste malgré leur compartimentation restent à déterminer.

4.1 Structure

Les canaux Kv1 sont codés par les gènes de la famille Shaker ou KCNA. Ils sont exprimés à la membrane majoritairement sous forme hétéro-tétramérique, ou parfois homo-tétramérique, et peuvent être composés des sous-unités $\alpha 1$ à $\alpha 8$. Chaque sous-unité α possède 6 segments transmembranaires liés par des boucles hydrophiles intra et extracellulaires (**Figure 11**). Les 4 premiers segments de la partie N-terminale, S1-S4, participent à la sensibilité aux variations du potentiel de membrane.

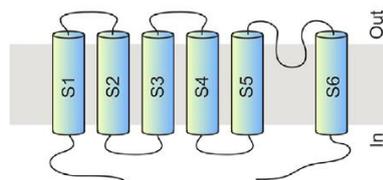


Figure 11. Schéma d'une sous-unité α (selon Ovsepian et al., 2016)

L'assemblage sélectif des sous-unités α en hétéro- ou homo-tétramères forme le pore du canal à partir des segments transmembranaires S5 et S6 dans la partie C-terminale (**Figure 11 et 12**).

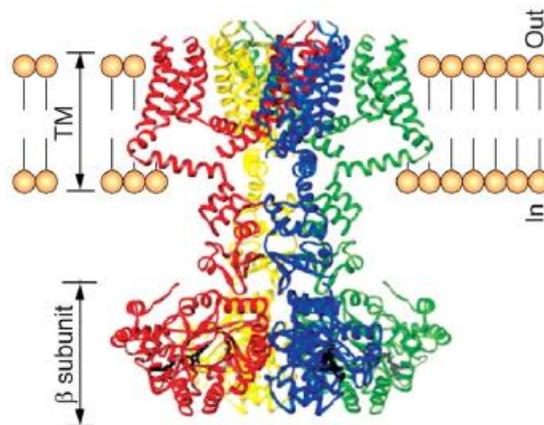


Figure 12. Représentation cristallographique de 4 sous-unités α Kv1 et $\text{Kv}\beta$ (selon Ovsepian et al., 2016)

Les sous-unités majoritairement représentées dans le SNC sont les $\text{Kv}1.2$, puis les $\text{Kv}1.1$, les $\text{Kv}1.6$ et les $\text{Kv}1.4$ (Scott et al., 1994). L'ouverture du pore peut être régulée par les quatre sous-unités β présentes sur la face intracellulaire (Ovsepian et al., 2016).

4.2 Profil d'expression

Dans l'hippocampe, les sous-unités $\text{Kv}1.1$, $\text{Kv}1.2$ et $\text{Kv}1.4$ sont retrouvés en importante quantité dans les terminaisons axonales de la voie perforante, des fibres moussues et des collatérales de Schaffer, des entrées axonales provenant du cortex enthorinal, du gyrus denté et de CA3 respectivement (Trimmer and Rhodes, 2004). Les $\text{Kv}1$ ont un pattern d'expression spécifique dans le SNC, principalement localisée dans l' AIS, l'axone, et les terminaisons synaptiques (Ogawa et al., 2008; Ovsepian et al., 2016 ; Trimmer and Rhodes, 2004). Dans les axones myélinisés de l'hippocampe, les $\text{Kv}1$ sont regroupés dans les régions juxtaparanodales (Gu and Barry, 2011). L'immunohistochimie des $\text{Kv}1.1$ dans l'hippocampe montre que la sous-unité est présente sous forme hétéro-tétramérique avec $\text{Kv}1.4$ ou $\text{Kv}1.2$ majoritairement dans CA3 (Trimmer and Rhodes, 2004). Les $\text{Kv}1.1$ sont exprimés dans l'aire CA3 à un stade précoce (6 jours post-natal : P6) contrairement à l'aire CA1 qui n'exprime des $\text{Kv}1.1$ fonctionnels qu'à un stade développemental plus avancé (P21) (Rama et al., 2017). Dans les cellules pyramidales de

l'hippocampe, l'immunomarquage des Kv1.1 se trouve dans le soma, à l'AIS et le long de l'axone (Rama et al., 2017). Les Kv1.1 sont particulièrement concentrés dans les zones d'accumulation de vésicules synaptiques dans la terminaison présynaptique (Smart et al., 1998).

4.3 Régulation de l'activation et de l'expression membranaire des Kv1

Le profil de distribution de LGI1 se superpose à celui des sous-unités α Kv1.1 et Kv1.4 et à celui de la sous-unité Kv β 1 dans l'hippocampe (Trimmer and Rhodes, 2004 ; Smedfors et al., 2018). Il a été montré que LGI1 prolonge l'activation des canaux Kv1.1/Kv1.4 en bloquant les Kv β 1 ayant pour fonction d'accélérer l'inactivation des sous-unités α (Schulte et al., 2006).

Le rôle des sous-unités auxiliaires β ne se limite pas à la régulation de l'activité du canal α Kv1. En particulier, elles entrent en jeu dans la régulation de leur trafic ou de leur adressage membranaire. Par exemple, la sous-unité β 2 potentialiserait l'expression membranaire des Kv1.2 (Shi et al., 1996). En outre, elle interagirait avec les protéines EB1 et KIF3A/kinésine II pour gérer le transport antérograde axonal des Kv1. Leur adressage dans l'axone dépendrait de l'interaction des Kv β avec le segment S1 des α Kv1 (Gu and Barry, 2011). La phosphorylation de Kv β 2 ou de Kv1.2 par des kinases telle que des tyrosine-kinases régulerait également l'adressage ou l'endocytose des Kv1 respectivement. Par ailleurs, l'adressage des Kv1.2 peut dépendre de la calnexine, une chaperone du RE ou de molécules d'adhésion dans les parties juxta-paranodale (Gu and Barry, 2011).

Contrairement à d'autres protéines dont l'assemblage multimérique doit être conforme pour l'export du RE et l'expression à la surface membranaire des cellules, l'adressage ou la mobilité intracellulaire des α Kv1 dépend de la composition en sous-unité. Parmi les sous-unités principales, les Kv1.1 portent un signal permettant la rétention au RE codé par les résidus de la boucle extracellulaire entre S1 et S2 du canal (Manganas and Trimmer, 2000). Le masquage du signal de rétention se produirait lors de l'assemblage des sous-unités pour assurer l'adressage du canal hétérotétramérique. Ce mécanisme pourrait expliquer l'absence de complexe homo-

tétramérique de type Kv1.1 dans le SNC des mammifères (Ovsepian et al., 2016; Trimmer and Rhodes, 2004). Il est intéressant de noter que la complexité du repliement et de l'assemblage des sous-unité Kv1 augmente le temps de transit dans le RE par rapport à d'autres protéines membranaires simples (Manganas and Trimmer, 2000). Ainsi, la capacité des canaux Kv1 à être correctement exprimés et fonctionnels serait propre aux sous-unités qui les composent. Afin de favoriser l'expression de canaux fonctionnels, la majorité des Kv1.1, Kv1.4 et Kv1.6 s'hétéromérise avec la sous-unité Kv1.2 dont le trafic cellulaire est plus malléable (Manganas and Trimmer, 2000; Ovsepian et al., 2016).

Bien que le motif de rétention au RE de la sous-unité Kv1.1 et les sous-unités Kv β ont un rôle important dans le contrôle de l'adressage des canaux Kv1 (Ovsepian et al., 2016), d'autres mécanismes entrent en ligne de compte dans l'établissement du pattern d'expression des Kv1.

La clusterisation des Kv1 dans leur lieu d'adressage peut dépendre de leur liaison à la famille protéique des membrane-associated guanylate kinases (MAGUK) à partir du domaine de liaison au PDZ dans leur partie C-terminale (Kim et al., 1995). Ce mécanisme implique la présence de PSD-95 sur le versant post-synaptique (Y Fukata et al., 2021; Tiffany et al., 2000) et PSD-93 au niveau de l'AIS (Ogawa et al., 2008). PSD-95 participerait à la clusterisation des sous-unités Kv1.4 et Kv1.2 mais pas Kv1.1 dans la membrane de cellules COS-1 sans avoir d'effet sur le trafic intracellulaire (Tiffany et al., 2000). D'autre part, la clusterisation des 3 sous-unités dans l'AIS reposerait sur PSD-93 indépendamment d'un autre membre MAGUK présent à l'AIS, Caspr2 (Ogawa et al., 2008; Rasband et al., 2002). Au contraire, les Kv1 seraient enrichis au niveau juxtaparanodal par Caspr2 même en absence de ADAM22 ou PSD-93 et PSD-95 (Faivre-Sarrailh and Devaux, 2013). Finalement, une étude récente a montré que les MAGUKS permettraient le maintien de la nano-organisation du complexe transsynaptique avec LGI1 et les canaux Kv1 pré-synaptique dans les neurones d'hippocampe (Yuko Fukata et al., 2021).

Ces mécanismes qui régulent l'expression des canaux Kv1 à la membrane des neurones de l'hippocampe sont nombreux. Il est possible que LGI1 intervienne de façon indirecte par ses

récepteurs transmembranaires tels que les ADAM ou de façon directe lors de sa sortie du RE avant sa libération extracellulaire, pour réguler l'expression, l'adressage, le recyclage, la clusterisation ou la régulation cinétique des canaux Kv1.

4.4 Les canaux Kv1 dans l'excitabilité

4.4.1 Courant I_D

Lors de l'activation des canaux potassiques dépendant du voltage, la partie senseur du canal chargée positivement pivote après l'accumulation de charges positives induite par la dépolarisation, conduisant à l'ouverture du canal (Grizel et al., 2014). Le flux d'ion potassique sortant porté par les Kv1 correspond à un courant qui présente une cinétique d'activation et d'inactivation différente selon la composition en sous-unités du canal. Le courant de type D (I_D) est porté par les sous-unités Kv1.1, Kv1.2 et Kv1.6 qui ont une haute affinité de liaison à la dendrotoxine-I (DTx-I), issue du venin de serpent (Owen et al., 1997), qui agit comme bloqueur du courant I_D . La dendrotoxine-K (DTx-K) permet le blocage du courant I_D en se fixant spécifiquement sur les sous-unités Kv1.1. Ce courant I_D est responsable du délai avant le déclenchement de la décharge de PA en réponse à un courant dépolarisant, absent dans les neurones n'exprimant pas les sous-unités Kv1.1, Kv1.2 et Kv1.6. Ce profil de décharge est appelé « Ramp & Delay » (Figure 13 ; Cudmore et al., 2010; Storm, 1988).

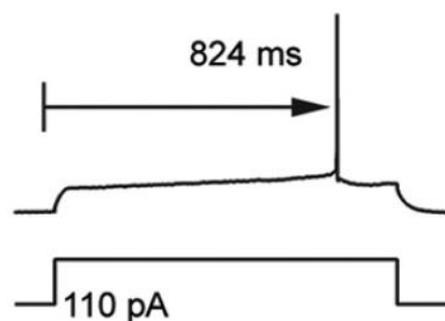


Figure 13. Profil de décharge « Ramp & Delay » (R. H. Cudmore et al., 2010)

Contrairement aux sous-unités Kv1.4 qui sont associées à un courant à inactivation rapide, les Kv1.1 et Kv1.2 confèrent au canal Kv1 un seuil d'activation bas (-45mV), une activation rapide

et une inactivation lente, ce qui contribue au délai observé avant le déclenchement du PA (Maarten H.P. Kole et al., 2007; Ovsepian et al., 2016). Dans l'hippocampe, lors d'une dépolarisation, les canaux Kv1 composés de Kv1.1 sont les premiers à s'activer, ce qui leur confère un rôle immédiat dans la temporisation de l'activité du réseau impliquant les cellules pyramidales (Gu and Barry, 2011; Ovsepian et al., 2016).

4.4.2 Rôle des canaux Kv1 dans l'excitabilité

Les canaux Kv1 contrôlent la forme, la force synaptique et la propagation du PA dans l'axone des neurones pyramidaux de l'hippocampe (Bialowas et al., 2015; Monaghan et al., n.d.; Rama et al., 2017). Concentrés dans l' AIS, ils permettent aussi de déterminer la fréquence de décharge, la précision et l'initiation du PA en régulant l'occurrence du PA (R. H. Cudmore et al., 2010; Storm, 1988) et en accélérant la phase de repolarisation (Foust et al., 2011; Maarten H.P. Kole et al., 2007). Ainsi, dans les axones myélinisés et non myélinisés ils empêchent les décharges répétitives et aberrantes en amenant le potentiel de repos vers des potentiels hyperpolarisés et évitent la synchronisation de réseaux neuronaux (Cudmore et al., 2010; Faivre-Sarrailh and Devaux, 2013 ; Gu and Barry, 2011).

Les mécanismes par lesquels les canaux Kv1 modulent la force synaptique sont à présent bien connus. Les Kv1 situés au niveau des terminaisons synaptiques, de l' AIS et de l'axone proximal accélèrent la repolarisation du PA, le rendant plus étroit. Cette caractéristique permet de réguler la libération des neurotransmetteurs dans la synapse à la baisse (Bialowas et al., 2015; Ovsepian et al., 2016; Shu et al., 2007; Trimmer and Rhodes, 2004). En effet, l'inactivation des Kv1 dans l' AIS ou l'axone proximal par une dépolarisation somatique induit l'élargissement du PA axonal facilitant la transmission synaptique (Maarten H.P. Kole et al., 2007). Cette facilitation à court terme de la transmission est dite analogue-digitale, puisqu'elle prend en compte le message digital qu'est le PA mais également sa forme, un signal analogique. Après dépolarisation dans le soma, les Kv1 s'inactivent jusqu'à des parties distales de l'axone (au-delà de 300 μm). L'inactivation des Kv1 ralentit la repolarisation du PA, se caractérisant par son

élargissement. Cette modulation potentialise l'influx intracellulaire transitoire de calcium de la terminaison synaptique entraînant la libération du contenu des vésicules. La transmission est ainsi facilitée à une constante de temps de dépolarisation de 3.7s qui correspond au temps d'inactivation du courant I_D (Bialowas et al., 2015).

L'inhibition localisée des Kv1.1 a démontré leur nécessité fonctionnelle dans l'axone et dans l' AIS pour réguler l'excitabilité des cellules pyramidales de CA3 (Rama et al., 2017). Le courant I_D affecterait l'excitabilité en modulant la pente et la trajectoire précédant le PA. Dans d'autres structures, les canaux Kv1.2 des terminaisons présynaptiques auraient pour rôle de diminuer l'hyperexcitabilité (Dodson et al., 2003). Le rôle des Kv1 dans la régulation de l'excitabilité peut être considéré dans un cadre pathologique puisque leur blocage pharmacologique favorise l'activité épileptiforme et la mort neuronale dans l'hippocampe (Bagetta et al., 1992; Smart et al., 1998).

4.5 Pathologies associée aux Kv1.1

La singularité caractéristique des sous-unités Kv1.1, toujours exprimées à la membrane sous forme hétérotétramérique, suggère une difficulté à assurer des compensations fonctionnelles rendant l'activité neuronale du réseau plus sensible à une dérégulation de cette sous-unité (Ovsepian et al., 2016). La mutation du gène KCNA1 codant pour les sous-unités Kv1.1 a été identifiée chez les patients souffrant d'ataxie épisodique (EA1 : episodic ataxia 1) avec des crises d'épilepsie (Browne et al., 1994). Les symptômes seraient causés par la perturbation des propriétés biophysiques du canal composé des Kv1.1 et/ou de leur expression membranaire dans les neurones du SNC (Ovsepian et al., 2016).

Le modèle de souris KO Kv1.1 est létal, si bien que 50% des animaux meurent entre la 3^{ème} et la 5^{ème} semaine post-natale à cause de crises d'épilepsie. Ces souris présentent un phénotype de crises limbiques similaire à celui de la TLE avec des crises récurrentes spontanées (Robbins and Tempel, 2012). L'excitabilité du réseau dans l'aire CA3 est potentialisée chez ces

animaux sans modification des propriétés passives de la membrane (Smart et al., 1998). Par ailleurs, la déplétion aigüe des Kv1.1 par injection intraventriculaire d'un oligodeoxyribonucleotide antisens ciblant leur ARN messager a montré une atteinte de la mémoire spatiale non associée à de la dérégulation de la LTP dans le DG ou dans CA1 (Meiri et al., 1997).

Le phénotype épileptique et cognitif que présente le modèle KO Kv1.1 et observé chez les patients EA1 ressemble également à celui observé dans les pathologies associées à la perte de fonction de LGI1. En effet, l'implication des Kv1.1 dans l'encéphalite limbique à auto-anticorps anti-LGI1 et dans l'ADLTE a récemment été investigué (Petit-Pedrol et al., 2018; Seagar et al., 2017a). Les patients présentent des défauts cognitifs, des pertes de mémoire et des crises d'épilepsie (Feng et al., 2019; Michael et al., 2020; Striano et al., 2011).

5. Auto-anticorps anti-LGI1

5.1 LGI1 dans les encéphalopathies

Des autoanticorps ciblant la protéine LGI1 sont exprimés chez des patients souffrant d'encéphalite limbique (LE : Limbic Encephalitis). Les premières études concernant ces auto-anticorps autrefois considéraient les canaux potassiques dépendant du voltage Kv1 comme épitopes cibles après qu'un dosage radioimmunologique d'auto-anticorps de patients ait montré une précipitation avec de la α -DTX iodée. Actuellement, il est connu que LGI1 retrouvé dans des complexes axonaux et synaptiques avec les Kv1 est ciblée par les auto-anticorps chez les patients atteints de LE (Lai et al., 2010; Michael et al., 2020) : des tests ELISA à partir de sérum de patients montrent une contribution majoritaire des autoanticorps anti-LGI1 à induire la LE (Kornau et al., 2020; Ohkawa et al., 2013). Au contraire, des auto-anticorps dirigés contre le domaine intracellulaire des canaux Kv1.1, Kv1.2 ou Kv1.6 chez des patients LE ne semblent pas avoir de potentiel pathogéniques (Michael et al., 2020). Chez les patients atteints de Neuromyotonie, les auto-anticorps anti CASPR2 induisent majoritairement les troubles causés par une

hyperexcitabilité des nerfs périphériques, mais des niveaux modérés d'auto-anticorps anti-LGI1 ont été trouvés chez ces patients. D'importants taux d'anticorps anti-LGI1 sont également trouvés dans le liquide céphalorachidien (LCR) des patients atteints du syndrome de Morvan (Michael et al., 2020).

La sémiologie de type épileptique est particulièrement exprimée par les patients produisant des auto-anticorps anti-LGI1, ainsi que de l'amnésie, des confusions, de l'hyponatrémie. Cependant ces symptômes peuvent être parfois retrouvés chez des patients exprimant des anticorps anti-CASPR2 (Irani et al., 2010). Il a été suggéré que certains anticorps seraient capables de bloquer le complexe comprenant ces deux protéines, expliquant le chevauchement des phénotypes exprimés (Irani et al., 2012).

5.2 Encéphalite Limbique associée à LGI1

Les patients atteints de LE causée par les auto-anticorps anti-LGI1 ont en général plus de 60 ans et 50% de ces individus présentent des crises dystoniques faciobrachiale (FBDS : faciobrachial dystonic seizure) précédant les troubles cognitifs. Les études suggèrent une production des auto-anticorps contre LGI1 de façon intrathécale (Gadoth et al., 2018; Kornau et al., 2020) ou périphérique (Ramberger et al., 2020). L'expression de LGI1 prédominant dans l'hippocampe augmente la susceptibilité des anticorps à se fixer dans cette structure (Lalic et al., 2011; Petit-Pedrol et al., 2018).

Les patients LE sont souvent résistants aux anti-épileptiques. Cependant, l'effet pathogénique des auto-anticorps anti-LGI1 est fortement atténué après immunothérapie (Lalic et al., 2011; Michael et al., 2020) et réversible chez des souris après injection intraventriculaire de ces anticorps (Petit-Pedrol et al., 2018). La concentration d'IgG retrouvée dans le LCR par rapport à celle retrouvée dans le sérum de patient LE est corrélée à la sévérité de l'effet pathogénique. Cet indice est plus élevé chez les patients LE présentant des troubles cognitifs par rapport à ceux dépourvus de ces symptômes (Gadoth et al., 2018; Thompson et al., 2018).

5.3 Mode d'action des auto-anticorps anti-LGI1

5.3.1 Conséquences électrophysiologiques et acteurs moléculaires

L'activité accrue du réseau neuronal de l'hippocampe après traitement avec des anticorps anti-LGI1 issus de patients LE est un sujet récurrent dans la littérature. Le traitement avec ces anticorps *in vitro* et *in vivo* induit une activité épileptiforme prononcée (Lalic et al., 2011; Romoli et al., 2019) ainsi qu'une hyperexcitabilité neuronale accompagnée d'une transmission glutamatergique potentialisée dans l'hippocampe (Petit-Pedrol et al., 2018; Romoli et al., 2019). Ce phénotype électrophysiologique pourrait expliquer l'occurrence de crises épileptiques associées à la LE (Lalic et al., 2011; Romoli et al., 2019). Cependant, les mécanismes par lesquels les auto-anticorps anti-LGI1 produit chez les patients LE induisent de l'activité épileptiforme reste encore à éclaircir.

Des hypothèses suggèrent un rôle de la perturbation des canaux potassiques Kv1 dans les phénotypes épileptiques observés chez les patients LE. En conséquence d'un défaut de Kv1 fonctionnels, une potentialisation de l'excitabilité neuronale et de la probabilité de libération du glutamate dans les synapses fibre moussues-CA3 et collatéral de schaffer-CA1 serait observé (Lalic et al., 2011; Petit-Pedrol et al., 2018). Une diminution de la densité des clusters de Kv1.1 précédant une diminution des clusters de récepteurs AMPA a été mesuré dans l'hippocampe après infusion d'IgGs de patient LE dans les ventricules latéraux de souris (Petit-Pedrol et al., 2018). La diminution des clusters de récepteurs AMPA comme conséquence directe de la diminution des clusters de Kv1 serait une hypothèse à explorer (Ohkawa et al., 2013; Petit-Pedrol et al., 2018; Seagar et al., 2017a). De sévères troubles de la mémoire concordent à un défaut d'induction de la LTP, conduisant à la conclusion que l'incorporation des récepteurs AMPA et leur clusterisation dans la synapse serait entravées par l'absence de LGI1 dans les synapses excitatrices de l'hippocampe perturbant les capacités mnésiques des souris (Petit-Pedrol et al., 2018; Yamagata and Fukai, 2020).

5.3.2 Mécanismes dépendant du ciblage de l'épitope

Pour décortiquer le rôle des anticorps anti-LGI1 de patient LE dans les changements d'expression des canaux Kv1 et des récepteurs AMPA, il faut prendre en considération qu'un seul et même patient LE peut produire des anticorps polyclonaux dirigés à la fois contre le domaine LRR et contre le domaine EPTP (Kornau et al., 2020; Ohkawa et al., 2013; Ramberger et al., 2020). Plus rarement, certains patients expriment des anticorps polyclonaux anti-LGI1 dirigés exclusivement contre le domaine LRR ou le domaine EPTP (Ramberger et al., 2020). Le nombre important d'hypermutations somatiques des chaînes lourdes et légères des anticorps anti-LGI1 observé chez les patients LE indique un stade de maturation avancé, justifiant la pluralité des épitopes ciblés (Kornau et al., 2020). La diversité des épitopes cibles et le chevauchement de liaison par les anticorps d'un même patient a également été mis en évidence par des expériences de compétition croisée (Ramberger et al., 2020). Les études précédemment décrites testent l'effet d'auto-anticorps purifiés à partir de sérum ou LCR de patients LE sans connaître leur épitope spécifique (Lalic et al., 2011; Ohkawa et al., 2013; Petit-Pedrol et al., 2018; Romoli et al., 2019). L'étude de ces anticorps polyclonaux limite la compréhension des mécanismes impliqués dans l'hyperexcitabilité et les changements synaptiques observés.

Ainsi, les dernières études se sont intéressées aux auto-anticorps monoclonaux exprimés chez les patients LE, ciblant chacun un domaine spécifique de LGI1. A la différence d'une application de sérum ou d'anticorps purifiés de LCR des patients LE, deux équipes de chercheurs ont isolé chaque clone d'anticorps produit chez les patients LE et identifié leur cible. A partir de l'ARN des cellules sécrétrices d'anticorps et des cellules B prélevés dans le LCR (Kornau et al., 2020) ou le sang périphérique (Ramberger et al., 2020) de patient LE, les IgGs recombinant monoclonaux ont été produit in vitro. Chaque anticorps monoclonal a été identifié comme étant dirigé contre LGI1 bloquant ou non l'interaction avec ADAM22, ciblant le domaine LRR ou le domaine EPTP (Kornau et al., 2020; Ramberger et al., 2020).

L'implication du domaine LRR en tant qu'épitope des auto-anticorps anti-LGI1 a suscité un grand intérêt puisque les anticorps anti-LRR se fixent à leur épitope *in vitro* et *in vivo*. En effet, le blocage spécifique du domaine LRR de LGI1 par les anticorps recombinants monoclonaux de patients LE a montré une internalisation de LGI1 avec ADAM22 et ADAM23 dans les cellules HEK293T, les coupes de cerveau et les cultures de neurones d'hippocampes (Ramberger et al., 2020). L'internalisation de LGI1 l'empêcherait d'assurer sa fonction physiologique, en impactant sur celle de ses partenaires d'interaction dans le milieu extracellulaire. Ainsi, il a été montré que le blocage du domaine LRR par les anticorps induit une augmentation de l'excitabilité des cellules de CA3 *in vitro* corrélées à une diminution du courant potassique porté par les canaux Kv1.1 et de leur nombre dans l'hippocampe, à plus forte échelle que le blocage du domaine EPTP (Kornau et al., 2020 ; Ramberger et al., 2020). Par ailleurs les anticorps anti-LRR et anti-EPTP augmenterait la transmission synaptique excitatrice conduisant à un échec de l'induction de la LTP dans la synapse collatérale de schaffer-CA1. Un test comportemental évaluant la mémorisation de l'animal a montré une faculté affaiblie de la reconnaissance du nouvel objet chez les souris ayant subi une injection stéréotaxique des anticorps anti-LRR dans CA3 (Ramberger et al., 2020).

A la différence des anticorps anti-LRR, les anticorps anti-EPTP induisent peu de changements fonctionnels *in vitro* et *in vivo*. Un grand questionnement s'est posé sur l'implication des anticorps anti-EPTP dans la pathologie. Il a pu être mis en évidence que l'interaction LGI1/ADAM22 ou LGI1/ADAM23 médiée par le domaine EPTP de LGI1 est perturbée par la pré-incubation avec des anticorps de patient LE (Kornau et al., 2020; Ohkawa et al., 2013; Petit-Pedrol et al., 2018; Ramberger et al., 2020a). En effet, l'hypothèse d'une compétition du site cible de LGI1 entre les anticorps anti-EPTP et les récepteurs ADAM 22 et ADAM 23 est souvent évoquée (Kornau et al., 2020; Ohkawa et al., 2013; Petit-Pedrol et al., 2018; Ramberger et al., 2020) en cohérence avec les observations suivantes :

- Les anticorps monoclonaux ciblant le domaine EPTP présentent une faible réactivité sur tissu natif *in vivo* et *in vitro* chez le rongeur contrairement aux anticorps anti-LRR, bien que l'efficacité de liaison avec LGI1 soit similaire (Kornau et al., 2020; Ramberger et al., 2020).
- Les anticorps anti-EPTP injectés dans CA3 chez la souris ne se fixent pas dans le cerveau et sont retrouvés dans le sang contrairement aux anticorps anti-LRR.

Les répercussions de ces découvertes sont indicatives des mécanismes liés aux anticorps anti-EPTP dans l'induction d'un phénotype pathogénique. Chez les patients LE, un encombrement stérique des anticorps anti-EPTP empêcherait la liaison de LGI1 à son récepteur ADAM22 ou ADAM23 déstabilisant l'expression normale des canaux Kv1 et/ou des récepteurs AMPA dans le complexe tripartite trans-synaptique, contribuant au phénotype épileptique (Yamagata et al., 2018). *In vitro* ou *in vivo*, le masquage du site cible de LGI1 déjà recrutée par son récepteur ADAM dans le tissu natif, empêcherait l'accès des anticorps anti-EPTP dépendamment de leur temps d'incubation (Kornau et al., 2020; Ramberger et al., 2020). La poursuite de cette théorie serait prometteuse et l'effet pathogénique de ces anticorps reste à confirmer sachant que l'injection d'anticorps anti-EPTP dans CA3 n'affecte pas les facultés cognitives de la souris (Ramberger et al., 2020).

Ensemble, ces résultats soutiennent un rôle dichotomique de chaque anticorps à domaine spécifique dans la LE, avec une implication importante des anticorps anti-LRR dans les défauts mnésiques observés chez les patients LE. Un effet cumulatif des anticorps anti-LRR et anti-EPTP sur la perte de fonction de LGI1 et la pathogénicité résultante a été suggéré (Ramberger et al., 2020). En plus d'un ratio élevé d'IgG dans le LCR par rapport au sérum de patient qui reflète la sévérité des symptômes, il se pourrait que l'effet pathogénique dépende aussi de la complémentarité d'action de plusieurs anticorps monoclonaux. Il est donc important de caractériser le mode d'action de chaque type d'anticorps.

Dans notre étude nous avons effectué un traitement de longue durée pour favoriser le turnover des protéines impliquées dans le complexe avec LGI1 et contrecarrer le masquage des épitopes par ADAM22 ou ADAM23 (Kornau et al., 2020). Nous avons mesuré l'excitabilité intrinsèque des cellules de CA3 et évalué l'implication des canaux Kv1 dans les changements induits par un anticorps anti-LRR et anti-EPTP respectivement.

6. ADLTE

6.1 Modèle murins KO-Lgi1

L'ADLTE (Autosomal Dominant Partial Epilepsy with Auditory Features) est une forme rare de la TLE caractérisée par des crises d'épilepsie partielles accompagnées d'hallucinations auditives (Chabrol et al., 2010; Kalachikov et al., 2002). Chez l'homme, les symptômes sont associés à l'haploinsuffisance de LGI1. Ils peuvent varier selon les individus : des auras visuelles et auditives (Feng et al., 2019), des confusions, des déficits aphasiques (Striano et al., 2011), mais dans la plupart des cas, des crises sont initiées à l'adolescence. Après les crises, un épaississement de la matière grise du lobe temporal latéral a pu être observé chez certains patients (Feng et al., 2019).

L'haploinsuffisance serait causée par des mutations non-sens ou mutations faux-sens diminuant la disponibilité de LGI1 dans le cerveau (Chabrol et al., 2010). Ainsi, selon les modèles de souris ADLTE, une mutation de LGI1 peut causer une perte de fonction ou une action de type dominant-négatif (Chabrol et al., 2010; Fukata et al., 2010; Yokoi et al., 2015; Zhou et al., 2009). Les modèles ADLTE de type Knock-out pour LGI1 (KO-Lgi1) présentent des crises d'épilepsie (Chabrol et al., 2010; Fukata et al., 2010; Yu et al., 2010).

Le foyer épileptique des souris KO-Lgi1 est l'hippocampe, et l'activité épileptiforme se propage ensuite dans le cortex. Après l'apparition des crises (dès P14), l'épaisseur de la couche granulaire est augmentée : les fibres moussues semblent créer des connexions aberrantes et une forte perte neuronale est détectée dans CA3 (Chabrol et al., 2010).

Un modèle de KO conditionnel embryonnaire (E10,5) a montré une pénétrance complète du phénotype épileptique, avec des crises sévères récurrentes entre P16 et P21. De façon surprenante, les KO conditionnels supprimant l'expression de la protéine à partir de 5 semaines post-natal n'induisent des crises qu'après 3 à 5 mois, sans posture hypertonique ou course hyperkynétique observées chez les souris dépourvues de l'expression de LGI1 dès le stade embryonnaire. Ces animaux KO conditionnels survivent 90 jours après les crises. Ce modèle permet de suspecter un rôle neurodéveloppemental crucial de LGI1 dans l'ADLTE. Contrairement au modèle KO conditionnel ciblant les cellules pyramidales qui présente de l'activité épileptiforme, le KO conditionnel supprimant l'expression protéique LGI1 uniquement dans les neurones GABAergiques exprimant la parvalbumine a permis d'écarter l'implication de ces neurones dans l'ADLTE (Boillot et al., 2014).

6.2 Types de mutation

Bien que 43 mutations différentes soient répertoriées (Yamagata and Fukai, 2020) aucune corrélation génotype/phénotype n'a été mise en évidence (Nobile et al., 2009). L'étude de ces mutations a révélé que certaines ne permettent pas la sécrétion de LGI1 (sécrétion-défectueuse) alors que d'autres LGI1 sécrétées (sécrétion-compétente) sont défectueuses dans leur interaction protéique (Striano et al., 2011).

Des modèles murins ont été créés pour analyser l'effet de mutations trouvées dans les formes familiales de l'ADLTE. L'équipe de M. Fukata a étudié 2 mutations représentatives de chaque catégorie dans des lignées de souris subissant toutes deux une létalité à partir de la 3^{ème} semaine. La LGI1 sécrétion-défectueuse serait recrutée au RE pour être dégradée et n'interagirait pas avec ses récepteurs ADAM22 et ADAM23. Par ailleurs, la LGI1 sécrétion-compétente aurait un défaut de conformation qui entraverait sa faculté à se dimériser et réduirait ses interactions primordiales avec ses partenaires directs et indirects tel que ADAM22, PSD-95 et Kv1 (Yokoi et al., 2015). L'effet de la perte de fonction de la LGI1 sécrétion-compétente rappelle celui du blocage de LGI1 par les auto-anticorps de patient anti-EPTP, soulignant de nouveau son rôle

important dans le maintien du complexe avec ses partenaires d'interaction. Récemment, une mutation empêchant la sécrétion de LGI1 a été identifiée chez des individus atteints d'ADLTE présentant des crises d'épilepsies évoquées chaque année (Feng et al., 2019). La mutation sécrétion-défectueuse de LGI1 serait la cause d'une perte de fonction de LGI1 dans le versant extracellulaire à l'origine des symptômes épileptiques.

6.3 Conséquence dans le développement

Après la découverte du gène *Lgi1*, il fallut de nombreuses années pour proposer des hypothèses valables concernant son rôle dans l'épilepsie. L'implication de LGI1 dans une canalopathie provoquant des crises d'épilepsie n'était pas la première idée évoquée sachant que *Lgi1* n'est pas homologue à un gène codant un canal ionique. Ainsi, un rôle dans la communication inter-neuronale dont la dysfonction perturbe l'organisation des réseaux neuronaux a premièrement été proposé (Kalachikov et al., 2002). Le motif LRR de LGI1 est également retrouvé dans la protéine SLIT, qui lui confère sa capacité de signalisation répulsive dans le guidage axonal (Battye et al., 2001). Ainsi, le groupe de T.C. Gilliam a émis l'hypothèse d'une conservation fonctionnelle du domaine LRR dans LGI1 pour le guidage du cône de croissance et la migration (Kalachikov et al., 2002). En l'absence de LGI1, ces processus développementaux seraient altérés, participant à l'apparition de crises épileptiques. En accord avec cette hypothèse, une désorganisation de la couche corticale associée à une polarité anormale des neurones la composant a été observée après électroporation *in utero* d'un mutant humain *Lgi1* chez les rats au cours du stade embryonnaire. Cette mutation *Lgi1* serait associée à des crises d'épilepsie (Feng et al., 2019).

Dans l'hippocampe, le rôle de LGI1 dans le guidage du cône de croissance et dans l'élagage synaptique a été proposé en lien avec son pic d'expression atteint lors de la maturation synaptique (Thomas et al., 2010, 2018; Zhou et al., 2009). LGI1 favoriserait le remodelage de l'arborisation dendritique en diminuant les ramifications, la longueur des dendrites apicales et la densité des épines dendritiques des cellules granulaires (Zhou et al., 2009). L'élimination

synaptique serait également dépendante de LGI1 dans le corps géniculé latéral ce qui pourrait expliquer la perception d'auras visuelles chez les patients ADLTE (Zhou et al., 2012). L'implication de LGI1 a également été mise en évidence dans la signalisation médiée par NgR1, un récepteur entravant la croissance axonale des neurones myélinisés (Thomas et al., 2010) et limitant le nombre de synapses excitatrices durant le développement dépendant de l'activité (Wills et al., 2012). LGI1 antagoniserait NgR1 et restreindrait l'activation de la protéine de signalisation RhoA GTPase contrôlant le cytosquelette. Cette signalisation peut susciter un certain intérêt pour comprendre les défauts mnésiques des patients LE et ADLTE puisqu'elle serait cruciale pour la plasticité permettant la mémorisation.

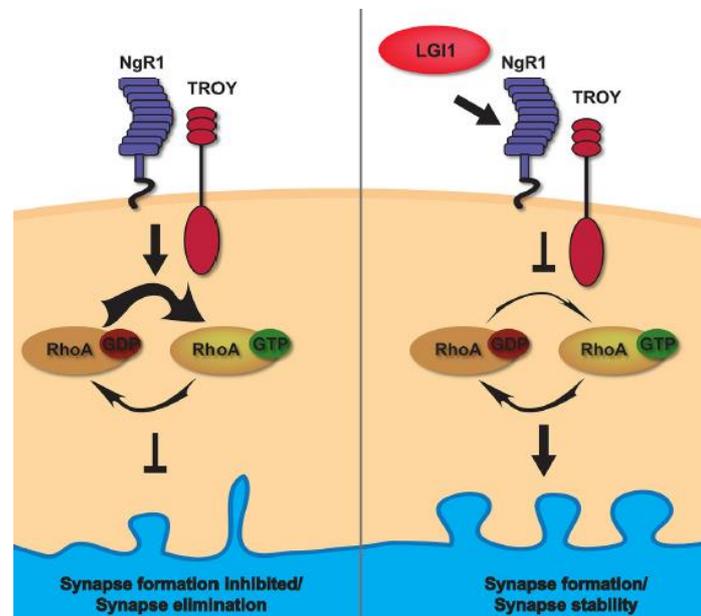


Figure 14. Schéma de la signalisation du récepteur NgR1 (Thomas et al., 2018).

La liaison LGI1-NgR1 favoriserait la maturation de synapses lors du pic d'activation en culture (15 jours *in vitro* : DIV15) et sa délétion causerait une diminution du nombre et de la longueur des épines dendritiques de type « mushroom » dans les cellules de CA1 (Figure 14 ; Thomas et al., 2018). De plus, l'homologue le plus proche de ADAM22, ADAM23 serait crucial pour la potentialisation de LGI1 dans la croissance axonale et l'arborisation dendritique des neurones pyramidaux de CA1 (Owuor et al., 2009). La fonction commune de LGI1/ADAMs et LGI1/NgR1 dans CA1 suggère que ces deux voies de signalisation s'entrecroisent. Ainsi, il a été

suggéré que NgR1 potentialise la fonction de ADAM22 dans le cerveau de rat en développement (Thomas et al., 2010).

Bien que l'effet de LGI1 sur l'élimination synaptique et la densité des épines dendritiques diffère de façon opposée entre le groupe de recherche de M.P. Anderson qui prône une régulation à la baisse et le groupe de P.A. Barker observant une régulation à la hausse, le rôle de maturation synaptique médié par LGI1 est l'idée principalement maintenue (Zhou et al., 2009 ; Thomas et al., 2018). Cette différence de régulation pourrait être associée à la variation du mode de maturation synaptique selon la structure et le neurone cible.

Dans ces études, le rôle de LGI1 dans la morphologie des neurones a été associé à la perturbation de l'activité du réseau neuronal de l'hippocampe. Cette hypothèse serait soutenue par une augmentation de la susceptibilité aux crises observée chez les souris mutantes pour LGI1 (Zhou et al., 2009), un état caractérisé de pré-épileptique chez les souris KO-Lgi1 (Thomas et al., 2018) et des crises épileptiques chez les KO ADAM23 (Owuor et al., 2009). Ces résultats, avec la viabilité d'un modèle KO conditionnel adulte (Boillot et al., 2014) confortent l'idée d'un défaut du développement neuronal à la base de l'induction des crises d'épilepsie chez les patients ADLTE.

En plus de modifications morphologiques, l'équipe de M.P. Anderson a montré que LGI1 coordonnait la maturation fonctionnelle post-natal pré- (via Kv1.1) et post- (via NMDA) synaptique dans la fibre perforante médiale projetant sur les cellules granulaires (Zhou et al., 2009). De plus, les changements morphologiques associés à un défaut de maturation synaptique en absence de LGI1 ne sont pas toujours observés dans d'autres études (Boillot et al., 2016; Petit-Pedrol et al., 2018). Les mécanismes à l'origine de ces modifications morphologiques restent encore à élucider pour découvrir s'ils sont réellement impliqués dans les phénotypes épileptiques létaux associés à LGI1.

6.4 Effet dans la synapse

Pour comprendre comment la délétion de *Lgi1* favoriserait une activité électrique accrue du réseau hippocampique conduisant aux crises d'épilepsie, l'hypothèse d'un défaut de la transmission synaptique a longtemps été explorée. En effet, lors de la phase développementale durant laquelle *LGII* est exprimée, la phosphorylation des tyrosines des protéines retrouvées dans la synapse diminue (Cudmore and Gurd, 1991) suggérant un rôle important de *LGII* dans la maturation des protéines synaptiques. De plus, l'interaction *ADAM22/LGII* serait nécessaire pour la maturation de la synapse en régulant la stabilité du complexe avec *PSD-95* (Lovero et al., 2015).

Pourtant souvent contradictoires, les hypothèses qui concernent un défaut de la fonction synaptique dans l'induction des crises épileptiques chez les patients *ADLTE* soutiennent majoritairement une modulation des EPSC médiés par AMPA et NMDA et/ou de la libération de glutamate par la terminaison présynaptique.

Comparant le profil épileptique spontané létale retrouvé chez les *KO ADAM22* (Fukata et al., 2017) et *KO ADAM23* (Owuor et al., 2009) à celui des *KO-Lgi1*, le groupe de M. Fukata place ces 3 protéines au centre d'un rôle crucial dans le maintien d'une transmission synaptique médié par les récepteurs AMPA, et dont la perturbation causerait les crises d'épilepsie (Fukata et al., 2010). *LGII* favoriserait l'expression des récepteurs AMPA dans la synapse et ces derniers diffuseraient hors de la synapses au dépend de la perte d'interaction *ADAM22/LGII* dans les souris *KO-Lgi1* (Lovero et al., 2015). Ainsi, la surexpression de *LGII* augmente le ratio des EPSC médié par AMPA/NMDA dans l'hippocampe de rat, sans changement de la fonction présynaptique (Fukata et al., 2006), et sa délétion chez les *KO-Lgi1* induit une réduction des EPSC médiés par AMPA et du ratio AMPA/NMDA dans l'aire CA1 et le DG *in vitro* (Fukata et al., 2010 ; Lovero et al., 2015). En 2021, ils suggèrent qu'un mauvais alignement du complexe trans-synaptique avec *ADAM22*, *LGII* et les protéines *MAGUK* est responsable de la réduction de la transmission synaptique dans les cultures organotypiques d'hippocampe (Y Fukata et al.,

2021). La réduction synaptique des récepteurs AMPA dans un contexte épileptique où l'activité des neurones est accrue est difficile à interpréter. De plus, une augmentation de la force synaptique est observée par la délétion génétique ou le blocage de LGI1 par des auto-anticorps de patient LE dans d'autres études (Petit-pedrol, Boillot et al., 2016, Yu E et al., 2010). L'équipe de M. Fukata a pourtant proposé l'hypothèse selon laquelle la perturbation de la transmission synaptique des interneurons inhibiteurs produirait une désinhibition du réseau. Cependant, nous avons vu précédemment que les neurones GABAergiques exprimant la Parvalbumine ne sont pas impliqués dans les processus conduisant au phénotype épileptique (Boillot et al., 2014). En outre, aucune différence des IPSP des neurones GABA entre les KO-Lgi1 et les WT dans CA1 n'a été observé (Yu et al., 2010). L'analyse du comportement électrophysiologique d'autres interneurons que ceux exprimant la parvalbumine n'as pas été davantage approfondie.

La diminution de l'expression des récepteurs AMPA dans les synapses de l'hippocampe des souris K-Lgi1, également observée lors du blocage de LGI1 par les auto-anticorps de patient LE pourrait correspondre à une réponse homéostatique à l'augmentation de l'activité des neurones (Ohkawa et al., 2013; Petit-Pedrol et al., 2018; Seagar et al., 2017). La modification des propriétés des neurones précédant la diminution des récepteurs AMPA dans la synapse pourrait être une modulation de l'excitabilité du neurone présynaptique induite par la dérégulation des Kv1, ou une augmentation de la libération de glutamate.

Ainsi, deux autres groupes de chercheurs ont plutôt observé qu'une modulation de la libération de glutamate des synapses excitatrices résulte d'une délétion de Lgi1 avec une augmentation de la taille des quanta de glutamate dans les synapses de l'aire CA1 (Boillot et al., 2016) et une augmentation des EPSC médié par AMPA et NMDA (Yu E et al., 2010).

Les résultats de toutes ces études suggèrent que l'augmentation de la libération de glutamate dans l'aire CA1 résulterait d'une modulation de l'excitabilité des neurones présynaptiques dans CA3 en amont de modification d'expression des récepteurs AMPA dans les neurones post-synaptiques.

La variabilité des résultats obtenus peut dépendre du modèle animal, du type de mutation, de la structure hippocampique et du stade développemental étudié. Aucun schéma temporel décrivant les mécanismes séquentiels conduisant au phénotype ADLTE n'a encore été établi dans un même modèle, en prenant en considération les conséquences post-crisés épileptiques.

6.5 Modulation de l'excitabilité

La modulation de l'excitabilité intrinsèque de neurones de souris KO-Lgi1 a récemment été étudiée (Seagar et al., 2017; Zhou et al., 2018). Il a été montré que les neurones de CA3 deviennent peu excitables après incubation avec une LGII recombinante et qu'ils sont plus excitables dans les souris KO-Lgi1 (Seagar et al., 2017). Les cellules pyramidales du cortex temporal sont également hyperexcitables dans les KO-Lgi1 (Zhou et al., 2018). Dans ces deux études, la délétion de Lgi1 augmenterait l'excitabilité neuronale par une diminution d'expression de Kv1.1 ou Kv1.2 fonctionnels.

En effet, l'implication des Kv1.1 dans l'ADLTE est concevable puisque leur délétion dans un modèle KO Kv1.1 induit une augmentation d'excitabilité des neurones pyramidaux de CA3 associée à un phénotype épileptique (Smart et al., 1998). Le lien biophysique entre LGII et les Kv1.1 a été mis en évidence par leur présence dans un même complexe. De plus, l'effet de LGII dans le ralentissement de l'inactivation des Kv1.1 par la sous-unité Kv β 1 (Schulte et al., 2006) démontre que l'appartenance de Kv1.1 à un complexe avec LGII a des conséquences fonctionnelles. D'autres indices soutiennent une action partenaire de LGII et des Kv1.1, tels que leur pattern d'expression spatial et temporel commun. Par exemple, dans la fibre perforante médiale projetant dans les cellules granulaires, la probabilité de libération de glutamate serait diminuée au cours du développement, en parallèle d'une augmentation de Kv1.1 fonctionnels et du pic d'expression de LGII (Zhou et al., 2009).

Plus récemment, un effet pathogénique due à la perte des Kv1 dans un modèle KO-Lgi1 a été démontré. La suppression de l'activité d'un facteur pro-inflammatoire permettrait de

recupérer les Kv1.2 fonctionnels et restaurer l'excitabilité des neurones pyramidaux de la couche 2/3 du cortex temporal des souris KO-Lgi1. Cependant, la récupération du phénotype de ces cellules ne serait pas suffisante pour atténuer les crises après P20, n'évitant pas la mort des souris (Zhou et al., 2018). La cible de la restauration du phénotype épileptique étant le facteur pro-inflammatoire induit par l'occurrence des crises, l'implication de LGI1 dans la perte de fonction des Kv1.2 n'est pas directement démontré.

Par contre, la perte de fonction des Kv1.1 à l' AIS corrélée à l'augmentation d'excitabilité des neurones de CA3 de souris KO-Lgi1 est davantage en faveur d'une implication de LGI1 dans la modulation de l'excitabilité par la régulation des Kv1.1 dans un cadre pathologique (Seagar et al., 2017). En accord avec ces résultats, LGI1/ADAM22 co-localisent dans l' AIS avec les Kv1 qui permettent la régulation de l'excitabilité intrinsèque des neurones de CA3 (Hivert et al., 2018 ; Rama et al., 2017).

La régulation des canaux Kv1.1 au niveau présynaptique par LGI1 est également une possibilité. Une augmentation de la facilitation à court terme occlue par la DTx-k a été mesurée dans les synapses fibres moussues-CA3 après délétion subaigüe de Lgi1 ciblée par un ARNsh (Lugarà et al., 2020). De même, l'application de DTx-k occlue l'effet de la délétion de Lgi1 sur l'amplitude d'EPSC évoqués dans les neurones de CA3 (Seagar et al., 2017).

7. Problématique :

Il est possible que la diminution des canaux Kv1.1 dans l' AIS et l'augmentation d'excitabilité résultante des neurones de CA3 de souris KO-Lgi1 soient une conséquence neurodéveloppementale due à l'absence de LGI1 dès le stade embryonnaire. J'ai donc vérifié si LGI1 était capable de contrôler l'excitabilité intrinsèque de façon aigüe par la régulation de l'expression des Kv1.1 portant le courant I_D , en restaurant l'expression de LGI1 dans des neurones de CA3 de souris KO-Lgi1. J'ai pour cela utilisé la technique d'électroporation sur cellule unique

afin de réintégrer un gène codant pour LGI1 dans les neurones KO-Lgi1 sélectionnés (neurones KO/Lgi1).

LGI1 est également impliquée dans la LE, une pathologie qui présente de nombreuses caractéristiques phénotypiques communes avec l'ADLTE. Pour comprendre les mécanismes par lesquels la perte de fonction de LGI1 induit de l'activité épileptiforme, j'ai évalué l'effet fonctionnel d'un auto-anticorps monoclonal de patients LE ciblant le domaine LRR et d'un autre ciblant le domaine EPTP. J'ai vérifié si ces deux anticorps à domaine spécifique altèrent l'excitabilité intrinsèque des cellules de CA3 par la régulation du courant porté par les Kv1.1.

Dans le modèle KO-Lgi1, j'ai utilisé la plasticité analogue-digitale induite par la dépolarisation (d-ADF) comme outil pour identifier la localisation de la perte de Kv1.1 fonctionnels. Cette technique m'a permis d'évaluer l'implication des canaux Kv1.1 axonaux dans l'excitabilité accrue observé dans les neurones de CA3 de souris KO-Lgi1.

Matériels et Méthodes

1. Modèle d'étude

Toutes les expériences ont été réalisées selon les directives européennes et institutionnelles pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire (Directive du Conseil 86/609/CEE et Conseil National de la Recherche) et approuvées par l'autorité sanitaire locale (D13055-08, Préfecture des Bouches du Rhône).

1.1 Production de souris KO-Lgi1

Des souris hétérozygotes $Lgi1^{+/-}$ ont été croisées pour générer des congénères $Lgi1^{-/-}$ (ou KO), $Lgi1^{+/-}$ et $Lgi1^{+/+}$ (WT). Les souris WT et KO ont été sélectionnées en analysant le profil d'amplification de la Polymerase Chain Reaction (PCR). Après prélèvement sur des souris âgées de 7 jours, l'ADN est dénaturé par variation thermique dans un mélange de 0,5 μ l de "DNA release" dilué dans 20 μ l de tampon de dilution (Master mix, ThermoFisher). 1 μ l d'ADN extrait de chaque échantillon est amplifié avec 0,25 μ l d'amorce (concentration finale de 0,3 μ M pour chaque amorce: les 2 amorces inverses WT et les 2 amorces inverses KO), 10 μ l de Phire contenant de l'ADN polymérase (Master mix, ThermoFisher) et 8,75 μ l d'eau dans le thermocycleur (système PCR ProFlex, life technologies). Les produits de PCR sont mis à migrer sur un gel d'agarose (2 %) et les bandes de migration résultantes sont visualisées à 120 pb (bande WT) et 200 pb (bande KO) avec une bande de biomarqueur comme référence de taille.

1.2 Caractérisation du modèle KO-Lgi1

Le modèle de souris KO-Lgi1 utilisé au cours de ma thèse cible la délétion totale de Lgi1 dès le stade embryonnaire. La perte homozygote de la protéine n'est pas létale dès la naissance bien que les souris aient un poids significativement diminué à P14 et un ralentissement du développement. Les souris KO présentent des crises d'épilepsie dès P10 avec un nouveau pic de pourcentage de souris touchés à P14 (Chabrol et al., 2010). Cette fenêtre de temps correspondrait au pic d'expression de LGI1 dans le cerveau (Ribeiro et al., 2008). Les crises sont caractérisées par des mouvements d'arrêt, des secousses des membres, un course hyperkinétique,

des mouvements cloniques, de la perte d'équilibre posturale, des postures hypertoniques asymétriques et de l'activité ictale et inter-ictale à l'EEG. La mort à P16 est déclenchée par les épisodes hypertoniques. Au contraire, les souris hétérozygotes ne présentent pas de crises ni de mort prématurée, mais ont un seuil de tolérance à l'induction des crises plus faible (Chabrol et al., 2010). Toutes ces caractéristiques sont communes à tous les modèles KO-Lgi1 étudiés (Fukata et al., 2010; Yu et al., 2010).

1.3 Cultures organotypique d'hippocampe

Des souris KO-Lgi1, WT ou rat Wistar (P7-P10) ont été sacrifiés par décapitation, le cerveau a été prélevé et chaque hippocampe disséqué. Des coupes d'hippocampe de 350 μm ont été obtenues à l'aide d'un Vibratome (Leica, VT1200S). Elles ont été placées sur des membranes en latex de 20 mm (Millicell) elles même introduites dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre contenant 1 ml de milieu de culture et maintenues jusqu'à 21 jours dans un incubateur à 34 °C, 95% O₂ – 5% CO₂. Le milieu de culture contenait 25ml de MEM, 12,5ml de HBSS, 12,5ml de sérum de cheval, 0,5ml de pénicilline/streptomycine, 0,8ml de glucose (1 M), 0,1 ml d'acide ascorbique (1 mg/ml), 0,4ml d'Hepes (1 M), 0,5ml de B27, et 8,95ml d'eau stérile.

Dans les cultures organotypiques de rat, 5 μM d'Ara-C était ajouté au milieu de culture à partir de DIV 4 pendant 24h pour limiter la prolifération gliale.

2. Traitements

2.1 Electroporation sur cellule unique

La transfection a été réalisée au moyen de la technique d'électroporation sur cellule unique dans les cultures organotypiques d'hippocampe de souris KO-Lgi1. Nous avons utilisé cette technique (Rathenberg et al., 2003) pour intégrer la construction d'expression d'ADN plasmidique de 9227 pb (pIND-LGI1-Tet-IRES-eGFP) qui permet aux neurones sélectionnés d'exprimer à la fois la protéine LGI1 et la protéine GFP (Green Fluorescent Protein). Le plasmide était composé d'un promoteur du cytomégalo virus dont le niveau d'activation dépend du

système opérateur Tet inducible par la tétracycline. En condition contrôle, nous avons utilisé une construction d'expression d'ADN plasmidique de 7556 pb (pIND-Tet-IRES-eGFP) pour exprimer uniquement la GFP dans les neurones électroporés. Pour vérifier l'étendue de la sécrétion de la protéine LGI1, nous avons utilisé un vecteur exprimant la protéine LGI1 taguée d'une séquence Dendra2 (D2-Lg1) (pIND-ΔIRES-Dendra-LGI1). L'attribution d'un tag Dendra2 à LGI1 nous a permis d'utiliser des anticorps ciblant le tag qui se fixe correctement sur les cultures organotypiques et n'induisent pas d'effet pathogène contrairement à des anticorps ciblant LGI1 directement. Nous avons également utilisé la construction plasmidique de 5442 pb (pTomato) exprimant la dtTomato pour identifier la morphologie du neurone électroporé.

Avant la procédure d'électroporation, la solution de plasmide était centrifugée à 10000 g pendant 5 minutes pour éviter l'obstruction de la micropipette par des débris provenant possiblement de contaminations bactériennes accumulés dans les aliquots d'ADN plasmidique. Dans les trois conditions, la doxycycline a été appliquée dans le milieu de culture cellulaire à une concentration finale de 0,3 $\mu\text{g/ml}$ pendant 3 jours immédiatement après la procédure d'électroporation sur cellule unique (Single Cell Electroporation, SCE).

La doxycycline est une tétracycline artificielle qui permet l'activation du promoteur du cytomégalo virus pour induire l'expression du gène *Lgi1*.

Pour la procédure de SCE, la chambre du microscope est constituée d'une boîte de Pétri stérile de 60 mm. Les constructions d'ADN plasmidique ont été diluées à une concentration finale de 33 $\text{ng}/\mu\text{l}$ dans la solution de patch, une solution électrolytique adaptée aux concentrations retrouvées dans le milieu intracellulaire contenant: du K-gluconate à 120mM, du KCl à 20 mM, de l'Hepes à 10 mM, de l'EGTA à 0,5 mM, du MgCl_2 à 2 mM, du Na_2ATP à 2 mM et du NaGTP à 0,3 mM (pH 7.4). Des micropipettes (7-10 M Ω) ont été remplies de cette préparation d'ADN après filtration avec un filtre Acrodisc pour seringue stérile (pores de 0,2 μm de diamètre).

Au cours de la procédure de SCE, la culture organotypique (DIV4-5) est positionnée dans une boîte de Pétri et recouverte d'une solution d'ACSF (Artificial Cerebro-Spinal Fluid) préchauffée à 34°C et filtrée contenant: du NaCl à 125 mM, du NaHCO₃ à 26 mM, du CaCl₂ à 3 mM, du KCl à 2,5 mM, du MgCl₂ à 2 mM, du NaH₂PO₄ à 0,8 mM et du D-glucose à 10 mM, équilibrés avec 95% d'O₂ à 5% de CO₂. L'électrode de masse et la microélectrode sont connectées à un générateur de tension isolé (Axoparator 800A, Molecular Devices). Sous guidage visuel, la micropipette est positionnée par un micromanipulateur trois axes près du corps cellulaire des neurones de CA3 sélectionnés. La pression est contrôlée pour avoir un joint lâche entre la micropipette et la membrane plasmique. Lorsque la résistance d'accès de la pipette surveillée atteint 25-40 MΩ, j'active l'envoi d'un train d'impulsions de -12 V pendant 500 ms (largeur d'impulsion: 0,5 ms, fréquence: 50 Hz). Chaque culture organotypique a subi une procédure de SCE pour 8 à 10 neurones sélectionnés pendant un temps limité de 30 min et a ensuite été transférée dans l'incubateur.

2.2 Application des mAbs

Des mAbs (monoclonal Antibodies) recombinants anti-LGI1 ont été obtenus *in vitro* par clonage vectoriel à partir de l'ADN des cellules B humaines activées comme décrit dans Ramberger et al. 2020. Des IgGs polyclonales purifiées à partir de sérum total humain sain (Protein G Sepharose 4 Fast Flow, 17-0618-01, Cytiva) ont été utilisées comme contrôle (Healthy Control : HC). L'effet électrophysiologique du mAb01 recombinant anti-LRR et celui du mAb6212 recombinant anti-EPTP a été évalué individuellement dans les neurones pyramidaux de CA3 issus de cultures organotypiques d'hippocampe de rat. Des IgGs HC et des mAbs anti-LGI1 ont été appliqués chaque jour à une concentration finale de 4 ng/μl dans le milieu de culture, en contact direct avec les cultures organotypiques hippocampiques, de DIV4 jusqu'au jour de l'expérience (DIV7-DIV8).

3. Electrophysiologie

Les enregistrements en patch-clamp ont été effectués en configuration cellule-entière dans les neurones pyramidaux de CA3 issus de cultures organotypiques de souris KO-Lgi1, souris WT ou rats Wistar. Dans chaque cas, des pipettes de patch (7–10 M Ω) ont été remplies d'une solution de patch contenant: du K-gluconate à 120 mM, du KCl à 20 mM, de l'Hepes à 10 mM, de l'EGTA à 0,5 mM, du MgCl₂ à 2 mM, du Na₂ATP à 2 mM et du NaGTP à 0,3 mM (pH 7,4). Tous les enregistrements ont été effectués à 29 °C dans une chambre d'enregistrement à température contrôlée (Luigs & Neumann) perfusée avec la même solution d'ACSF que pour la SCE.

3.1 Enregistrement de l'excitabilité intrinsèque

3.1.1 Neurones électroporés dans les cultures organotypiques de souris KO-Lgi1

Après trois jours d'incubation des cultures électroporées avec la doxycycline suivant la SCE, les neurones électroporés ont pu être identifiés par l'expression de la GFP. Les neurones ont été enregistrés en courant-imposé ou en voltage-imposé avec un amplificateur Multiclamp 700B (Axon Instruments, Molecular Devices). L'excitabilité a été mesurée en délivrant une gamme de longues impulsions de courant dépolarisant (1 s) (10 à 250 pA, par incréments de 10 pA) et en comptant le nombre de potentiels d'action évoqués. Lors de ces expériences, les récepteurs ionotropiques du glutamate et du GABA étaient bloqués par l'ajout de 2 à 4 mM de kynurénate et 100 μ M de picrotoxine respectivement. Des courbes entrée-sortie ont été déterminées pour chaque neurone et trois paramètres ont été examinés: la rhéobase (le courant minimal nécessaire pour induire au moins un potentiel d'action), le gain (le facteur de linéarité obtenu sur chaque cellule par la mesure du nombre de PA en fonction de l'impulsion de courant) et la latence du premier PA (temps de dépolarisation avant que le premier PA soit évoqué par un courant de rhéobase n'induisant qu'un seul PA). La sensibilité à la dendrotoxine K (DTx-K), bloqueur sélectif de la sous-unité Kv1.1 du canal potassique dépendant du voltage, a été déterminée par enregistrement en courant-imposé avant et après l'application de la DTX-K (100

nM) dans le bain. Les protocoles de voltage imposé pour mesurer le courant médié par les canaux contenant la sous-unité Kv1.1 consistaient en une série de sauts de potentiel à partir d'un potentiel maintenu à -90 mV (pas de -80 à +10 mV par incréments de 10 mV). Pour bloquer les courants Ca^{2+} et Na^{+} dépendants du voltage, 200 μM de Ni^{2+} , 50 μM de Cd^{2+} et 0,5 μM de TTX ont été ajoutés à la solution extracellulaire d'ACSF. L'isolement algébrique du courant potassique de type I_D porté par les Kv1.1 a été réalisé en soustrayant les courants évoqués en présence de la DTX-K, aux courants évoqués dans la solution d'ACSF contrôle. La conductance de type D a été calculée à partir du pic maximal de courant sensible à la DTx-k obtenu et du gradient électrochimique du potassium dans nos conditions d'enregistrement (potentiel d'équilibre du potassium $E_{K^+} = -105,09$ mV). Dans toutes les expériences de voltage imposé, la soustraction du courant de fuite et de capacitance a été effectuée en utilisant un protocole p/n ($n = 4$). Pour chaque enregistrement, l'acquisition du signal a été réalisée avec une fréquence d'échantillonnage de 10 kHz à l'aide du logiciel pClamp10 (Axon Instruments). Les données ont été analysées à l'aide des logiciels ClampFit (Axon Instruments) et IgorPro6 (Wavemetrics). Les données groupées sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM et l'analyse statistique a été réalisée à l'aide du test U de Mann-Whitney, du test de Wilcoxon et du test de Kruskal-Wallis et Mann-whitney en post-hoc pour les multi-comparaison.

3.1.2 Cultures de rats traités avec les IgGs

Les enregistrements des neurones de CA3 issus des cultures organotypiques de rat Wistar traités avec les IgGs ont été réalisés à DIV7 et DIV8 dans une limite de 6 h après la dernière application. Les cultures ont été brièvement rincées avec la solution externe d'ACSF dans la chambre d'enregistrement puis les neurones ont été enregistrés en courant-imposé et l'excitabilité a été mesurée de la même manière que dans les neurones électroporés des souris KO-Lgi1. Les courbes entrée/sortie, la rhéobase, la latence du premier PA et la sensibilité de ces paramètres à la DTx-K ont été obtenus.

3.2 Induction de la plasticité à court terme (d-ADF)

La facilitation analogue-digitale a été utilisée comme outil pour mesurer l'effet de l'inactivation des canaux Kv1 dans les neurones KO-Lgi1 et WT. L'enregistrement de paires de neurones a été effectué dans CA3 entre DIV11 et DIV14 pour augmenter la probabilité d'une connexion entre les deux neurones. Au cours de l'enregistrement, le neurone présynaptique est enregistré en courant-imposé et son potentiel de membrane est maintenu entre -70mV et -75mV. Deux PA sont évoqués dans le neurone présynaptique par l'induction de rapides créneaux de courant dépolarisant (5 ms) dont l'intensité varie selon l'excitabilité du neurone présynaptique. A la différence du premier PA induit à partir d'un potentiel de membrane basal, le second PA est évoqué à la suite d'une longue dépolarisation sous-seuil de 10 s. L'intensité du courant dépolarisant de 10 s est modulé de sorte que le potentiel de membrane du neurone n'atteigne pas le seuil de déclenchement du PA (-45mV/-50mV). Le neurone post-synaptique est enregistré en voltage-imposé. Les EPSC évoqués dans le neurone post-synaptique par chaque PA émis dans le neurone présynaptique sont moyennés sur 40 à 70 traces après alignement des PA présynaptiques et l'amplitude est mesurée. Le 2^{em}EPSC évoqué est normalisé en fonction du 1^{er}EPSC évoqué de sorte que les valeurs d'amplitude au-delà de 100% indiquent une facilitation de la transmission synaptique.

4. Immunohistochimie

4.1 Protocole d'immunomarquage des Kv1.1 et de la D₂-LGI1

Les cultures organotypiques de souris KO-Lgi1 ont été fixées dans une solution contenant 4% de paraformaldéhyde dans du PBS pendant 15 min à 4°C, 3 jours après la SCE dans le cas de la quantification des canaux Kv1.1 à l' AIS et 7 jours après la SCE pour visualiser clairement la sécrétion de la protéine D₂-LGI1 par le neurone électroporé. Les cultures ont ensuite été incubées dans du NH₄Cl à 50 mM dilué dans du PBS pendant 15 min à température ambiante (RT) dans le but d'éliminer le bruit de fond causée par le PFA. Les sites non spécifiques ont été bloqués une nuit à 4°C dans une solution contenant 5% de sérum de chèvre (Normal Goat Serum, NGS,

Vector laboratories) et 0,5% de Triton X-100 dans du PBS. Après ce processus, les cultures organotypiques ont été incubées (24h; 4°C) avec des anticorps primaires dans une solution contenant 0,5% de triton X-100 et 2% de NGS dans du PBS. Les anticorps suivants ont été utilisés: anti-ankG de cochon d'inde (1:400, Synaptic Systems, 386005, RRID: AB_2737033), anti-GFP de lapin (1:500, Synaptic Systems, 132003, RRID: AB_1834147), anti-Kv1.1 de souris (1:200, Antibodies Incorporated, 75-105, RRID: AB_10673166) ou anti-ankG de souris (1:400, Antibodies integrated, 75-147, RRID: AB_10675130), anti-Dendra2 de lapin (1: 200, Antibodies online, ABIN361314, RRID: AB_10789591). Ensuite, les cultures organotypiques ont été lavées 4 fois pendant 20 min dans du PBS contenant 0,5% de Triton X-100 puis incubées avec les anticorps secondaires appropriés pendant 2h (RT) dans une solution contenant 0,5% de Triton X-100 et 2% NGS dans du PBS. Les anticorps suivants ont été utilisés: Alexa Fluor 647 chèvre anti-cochon d'Inde (1:150, Jackson Immunoresearch), Alexa Fluor 488 chèvre anti-lapin (1:200, Jackson Immunoresearch) et Alexa Fluor 594 chèvre anti-souris (1:200, Jackson Immunoresearch) ou Alexa Fluor 488 chèvre anti-lapin (1:200, Jackson Immunoresearch), Alexa Fluor 594 âne anti-poulet (1:400, Jackson Immunoresearch), Alexa Fluor 647 âne anti-souris (1:400, Molecular Probes). Par la suite, les cultures ont été lavées 3 fois pendant 20 min dans du PBS 0,5% Triton X-100. Les noyaux ont été colorés en utilisant du DAPI à une concentration finale de 1,5 $\mu\text{g/ml}$ dans du PBS pendant 10 min et lavés dans du PBS pendant 15 min. Les tranches ont ensuite été montées dans du milieu de montage anti atténuation (Vectashield, Vector laboratories). Des sections optiques en “Z-stacks” (image à plusieurs plans focal) ont été acquises sur un microscope confocal à balayage LSM780 (Zeiss).

4.2 Traitement d'images et quantification.

Le logiciel ImageJ (NIH) a été utilisé pour l'analyse des images et la quantification des différents marquages. Afin de mesurer l'immunoréactivité de Kv1.1 à l'ALS, une soustraction du bruit de fond a été effectuée sur les images à l'aide du “rolling ball algorithm”, un paramètre estimant l'intensité de fond d'une image en niveau de gris en cas d'exposition inégale. Ensuite,

les AIS ont été identifiés en utilisant le plugin “3D object counter” dans ImageJ sur le signal AnkG (Bolte and Cordelières, 2006). Le seuil pour la détection du signal des AIS a été choisi en fonction de l’intensité du signal de l’AnkG et cette même valeur a été gardé pour toutes les cultures issues de la même expérience. La détection des AIS par le plugin “3D object counter” a permis de créer un masque 3D représentant le contour des AIS détectés. Ce masque a été appliqué sur le signal Kv1.1, et le plugin “ROI 3D Manager” (Ollion et al., 2013) a été utilisé pour sélectionner les AIS individuels dans le champ de vision du signal Kv1.1. L’intensité d’immunoréactivité Kv1.1 a été collecté sous forme de moyenne des valeurs de gris. Pour chaque condition, l’immunoréactivité des Kv1.1 à l’AIS a été normalisée par rapport à l’immunoréactivité des Kv1.1 à l’AIS des neurones KO loin du neurone électroporé avec Lgi1.

Résultat

1. Restauration de l'excitabilité intrinsèque dans les neurones dépourvus de LGI1

Abstract

Leucine-rich Glioma Inactivated 1 (LGI1) is a glycoprotein secreted by neurons, the deletion of which leads to Autosomal Dominant Lateral Temporal Lobe Epilepsy. Recently, we showed that LGI1 deficiency decreases Kv1.1 channel density at the axon initial segment (AIS) and at presynaptic terminals, thus enhancing both intrinsic excitability and synaptic strength. Here we show that selective expression of LGI1 in *Lgi1*^{-/-} neurons with the use of single-cell electroporation reduces intrinsic excitability, and increases both the Kv1.1 mediated D-type current and Kv1.1 immunostaining at the AIS. In addition, we reveal a spatial gradient of both intrinsic excitability and Kv1.1 immunostaining that is centred on the electroporated neuron. We conclude that expression of LGI1 restores normal excitability through the expression of functional Kv1 channels at the AIS.

Rescue of intrinsic neuronal excitability in LGI1-deficient neurons

Johanna Extrémet¹, Jorge Ramirez-Franco¹, Norah Boumedine-Guignon¹, Norbert Ankril¹,
Oussama El Far¹, Dominique Debanne^{1*} & Michaël Russier^{1*}

¹UNIS, UMR1072, INSERM, Aix-Marseille Université, Marseille France

*Correspondance : dominique.debanne@inserm.fr or michael.russier@univ-amu.fr

20 pages, 4 figures, 1 supplementary figure

Key words: LGI1, Kv1 channels, epilepsy, excitability, hippocampus

Introduction

LGII (Leucine-rich glioma inactivated) is a secreted protein expressed primarily in the central nervous system (CNS) composed of a Leucine Rich Repeat (LRR) domain and an Epitempin (EPTP) domain. Several genes coding for proteins with EPTP domain are found in genomic regions associated with epilepsy (Staub et al., 2002). Indeed, the deletion of LGII protein induces Autosomal Dominant Lateral and Temporal Lobe Epilepsy (ADLTE), a pathology characterised by epileptic seizures with auditory disorders (Kalachikov et al., 2002). ADLTE can be induced by homozygous deletion of LGII in mice (Lgi1 Knock-Out mice or KO mice). LGII functionality requires the binding with the disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 22 (ADAM22), a non-catalytic metalloprotease-like protein which acts as a receptor for LGII. In fact, most of LGII mutations prevent LGII secretion while mutations allowing its secretion have been shown to disrupt the interaction between its EPTP domain and its receptor ADAM22 (Yamagata et al., 2018; Yokoi et al., 2015). Subsequent loss of LGII function in these mice induces epileptiform activities, seizures and premature death (Chabrol et al., 2010).

The mechanisms by which the epileptic phenotype occurs in *Lgi1*^{-/-} mice involve changes in excitatory synaptic transmission (Boillot et al., 2016; Fukata et al., 2010, 2006; Lovero et al., 2015), synapse maturation (Lovero et al., 2015; Thomas et al., 2018; Zhou et al., 2009), and also changes in intrinsic excitability (Schulte et al., 2006; Seagar et al., 2017; Zhou et al., 2018). In Kv1.4/Kv1.1 channels, LGII prevents N-type inactivation by the Kvβ1 subunit (Schulte et al., 2006). Addition of recombinant LGII decreases intrinsic excitability in rat CA3 neurons whereas CA3 neurons of *Lgi1*^{-/-} mice are more excitable (Seagar et al., 2017). The role of LGII in modulating neuronal excitability was mediated by changes in voltage-gated Kv1.1-containing potassium channels density in CA3 neurons. Specifically, Kv1.1-containing channels membrane expression was reduced in the axon initial segment (AIS) of CA3 pyramidal neurons of *Lgi1*^{-/-} mice (Seagar et al., 2017). Accordingly, a strong co-localization of LGII with its receptor ADAM22 was found in the AIS of dissociated hippocampal neurons affecting the Kv1 potassium

channel localization in this compartment (Hivert et al., 2019). Moreover, Kv1.1-containing channels present in the AIS have been shown to regulate intrinsic excitability of CA3 neurons (Rama et al., 2017). Consistent with a decrease in Kv1.1 density in CA3 neuron of *Lgi1*^{-/-} mice, the conductance of the voltage-gated D-type potassium current carried by the Kv1 channels family was found to be reduced in *Lgi1*^{-/-} mice (Seagar et al., 2017). The slowly inactivating D-type current (I_D) dampens action potential firing, and subsequently reduces network synchronization (Robert H. Cudmore et al., 2010).

Understanding the mechanisms generating epileptic phenotypes when LGI1 is deleted is still under investigation. Rescue experiments were often carried out to clarify synaptic mechanisms (Fukata et al., 2010; Lovero et al., 2015). However, the rescue strategy has not been used to confirm the role of LGI1 in the control of intrinsic excitability. In particular, it is unclear whether the rescue of *Lgi1* gene in a single neuron is able to restore D-type potassium conductance.

We thus examined whether intrinsic excitability is restored by LGI1 expression in selected CA3 neurons from *Lgi1*^{-/-} mice. We show here that selective expression of LGI1 in *Lgi1*^{-/-} neurons using single-cell electroporation reduces intrinsic excitability, and increases both the Kv1.1 mediated D-type current and Kv1.1 immunostaining at the AIS. In addition, we reveal a spatial gradient of both intrinsic excitability and Kv1.1 immunostaining that is centred on the electroporated neuron. Thus, the expression of LGI1 restores normal excitability through the expression of functional Kv1 channels at the AIS.

Results

Reduced intrinsic excitability in KO neuron electroporated with Lgi1-encoding gene.

To investigate the involvement of LGI1 protein in shaping neuronal excitability, we rescued the expression of LGI1 protein in selected CA3 neurons from mice knocked-out for the Lgi1 gene (KO neurons) using single cell electroporation of an Lgi1-encoding gene in organotypic slice cultures (KO/Lgi1 neurons) (**Figure 1A**). A vector allowing expression of the green-fluorescence protein (GFP) only was used as a control to confirm that changes in intrinsic excitability were not due to the single cell electroporation procedure itself (KO/GFP neurons). CA3 pyramidal neurons were recorded in current-clamp and the number of action potentials for each increment of injected current was counted to establish input-output curves. Excitability parameters (first spike latency, rheobase and gain) were measured. No significant difference was observed between KO neurons and KO/GFP neurons (**Figure 1B**) for the first spike latency (671 ± 54 ms $n = 22$ vs. 630 ± 50 ms $n = 17$, $p=0.64$; **Figure 1C**), for the rheobase (81 ± 9 pA $n = 22$ vs. 75 ± 11 pA $n = 17$, $p = 0.65$; **Figure 1C**), nor for the gain (0.11 ± 0.012 $n = 22$ vs. 0.12 ± 0.008 $n = 17$, $p = 0.22$; **Figure 1C**). We therefore chose KO/GFP neurons as a control to describe our next results.

In contrast to KO/GFP neurons, KO/Lgi1 neurons expressed a clear ramp-and-delay phenotype (**Figure 1B**). This feature resembles to the phenotype observed in WT CA3 neurons (Robert H. Cudmore et al., 2010; Seagar et al., 2017). According to this characteristic, we measured an increase in the latency of the first spike in CA3 KO/Lgi1 neurons compared to KO/GFP neurons (630 ± 50 ms $n = 17$ in control vs. 844 ± 27 ms $n = 17$ in neurons electroporated with Lgi1-encoding gene, $p < 0.001$; **Figure 1C**).

Strikingly, increase of the first spike latency in CA3 KO/Lgi1 neurons corroborate with others excitability parameters. In fact, compared to control KO/GFP neurons, the input-output curve of CA3 KO/Lgi1 neurons displayed a rightward shift (**Figure 1B**) with a significant increase in the rheobase (75 ± 11 pA $n = 17$ vs. 136 ± 7 pA $n = 17$, $p < 0.001$; **Figure 1C**), and a

significant reduction in the gain (0.12 ± 0.008 $n = 17$ vs. 0.08 ± 0.008 $n = 17$, $p < 0.001$; **Figure 1C**). Furthermore, the voltage threshold of the action potential was found to be significantly depolarized in KO/Lgi1 neurons compared to KO or KO/GFP neurons (-33 ± 0.5 mV, $n = 17$ in KO/Lgi1 neurons vs. -36 ± 0.5 mV, $n = 17$ in KO/GFP neurons and -35 ± 0.5 mV, $n = 22$ in KO neurons; **Figure 1D**). Taken together, these data indicate that intrinsic excitability is reduced in CA3 KO/Lgi1 neurons compared to KO/GFP.

Increased sensitivity to DTx-k in KO/Lgi1 neurons.

The ramp-and-delay phenotype observed before the evoked spike is a hallmark of slow inactivating D-type current (Cudmore et al., 2010). As this feature was observed in WT and KO/Lgi1 neurons, we examined the contribution of the D-type current to the electrophysiological phenotype after electroporation, by measuring the sensitivity to DTx-k in current-clamp. Only a slight difference was observed in the depolarization preceding the evoked spike (**Figure 2A**) with no significant difference of the first spike latency in KO/GFP neurons after DTx-k application ($n = 6$, $p = 0.52$; **Figure 2C**). In contrast, in KO/Lgi1 neurons, bath application of DTx-k induced a loss of the ramp-and-delay phenotype (**Figure 2B**) and a significant decrease of the latency to the first spike ($n = 6$, $p = 0.03$; **Figure 2C**). According to the input-output curves (**Figure 2A**), a slight increase in intrinsic excitability was noticed in KO/GFP neurons after application of DTx-k. Clearly, the input-output curve of KO/Lgi1 neuron showed a more robust increase of intrinsic excitability after adding DTx-k (**Figure 2B**). While DTx-k did not induce changes in the rheobase of KO/GFP neurons ($n = 6$, $p = 0.44$; **Figure 2C**), the rheobase of KO/Lgi1 neurons was significantly decreased after DTx-k application ($n = 6$, $p = 0.03$; **Figure 2C**). To quantify this effect, we subtracted the rheobase measured after application of DTx-k to the rheobase before adding DTx-k. Compared to the control, a fourfold increase of this rheobase difference was observed in KO/Lgi1 neurons (16.7 ± 6.8 pA $n = 6$ vs. 67.2 ± 8.7 pA $n = 6$, $p = 0.004$; **Suppl. Figure 1**) confirming a higher sensitivity to DTx-k in neuron rescued with LGI1.

Recovery of the D-type current and Kv1.1 channels at the AIS of KO/Lgi1 neurons.

To confirm the recovery of D-type current in KO/Lgi1, we recorded neurons in voltage-clamp to obtain D-type conductance. For the same voltage step, the outward DTx-k-sensitive current evoked was weak in KO/GFP neurons but highly increased in KO/Lgi1 neurons (**Figure 3A**). The D-type conductance was more than twofold in KO/Lgi1 neurons compared to the control (1.1 ± 0.4 nS $n = 6$ in KO/GFP neurons vs. 2.8 ± 0.5 nS $n = 8$ in KO/Lgi1 neurons, $p = 0.029$; **Figure 3B**). The value of DTx-k-sensitive conductance reported in KO/Lgi1 neurons was similar to that found in WT neurons (WT = 2.5 ± 0.2 nS, $n = 15$) (Seagar et al., 2017).

In KO neurons, Kv1.1-containing channels were shown to be depleted mainly in the AIS (Seagar et al., 2017). We then evaluated Kv1.1-containing channel expression at the ankyrin G-positive AIS of KO/GFP neurons and KO/Lgi1 neurons (**Figure 3C, 3D**). The Kv1.1 staining was colocalised with that of Ank G and was predominant at the AIS of KO/Lgi1 neuron but not in KO/GFP neuron (**Figure 3C**). Overall, compared to KO/GFP neurons, immunostaining of Kv1.1-containing channel at the AIS was significantly increased in KO/Lgi1 neurons (1.0 ± 0.1 au $n = 17$ in KO/GFP neurons vs. 1.4 ± 0.1 au $n = 19$ in KO/Lgi1 neurons, $p = 0.01$; **Figure 3D**), confirming that Lgi1 expression in CA3 neurons induced a D-type conductance recovery through a Kv1.1-containing channel rescue at the AIS.

LGI protein expressed by an electroporated neuron can modulate the excitability of adjacent neuron.

It is well known that LGI1 is a protein extracellularly secreted by neurons in the CNS (Fukata et al., 2006; Hivert et al., 2019; Lovero et al., 2015; Senechal et al., 2005). In order to check whether LGI1 secreted by a neuron could spread and affect the excitability of other neurons, single cell electroporation of CA3 neurons from KO mice were performed with a tagged Dendra2-LGI1 encoding-gene. Dendra2 tag was used to be targeted by antibodies as pathogenic antibodies from patients with limbic encephalitis could induce internalization of LGI1

(Ramberger et al., 2020). To reliably evaluate the extracellular labelling of D₂-LGI1 protein, antibodies against Dendra2 were applied on living organotypic cultures before fixation and permeabilisation. In these conditions, the D₂-LGI1 protein immunostaining was extracellular, confirming the ability of LGI1 to be secreted by CA3 neurons (**Figure 4A**). LGI1 was located very concentrated around the soma and mostly at the ankyrin G-positive AIS of the KO/D₂-Lgi1 neuron. Moreover, we could follow the labelling of secreted D₂-LGI1 protein all along the axon, which cross the pyramidal layer near and in parallel to the longitudinal shape of the KO/D₂-Lgi1 neuron. The proximal basal and apical dendrites were also enriched in secreted D₂-LGI1 so that dots of secreted D₂-LGI1 form a cloud around the soma. The further we were from the KO/D₂-Lgi1 neuron, the lesser the presence of D₂-LGI1. No D₂-LGI1 was detected around distant neurons more than 200 μm from the electroporated neuron. Remarkably, D₂-LGI1 was also highly detected along the AIS of neurons adjacent to the AIS and basal dendrites of the KO/D₂-Lgi1 neuron (**Figure 4A**). To confirm that adjacent neurons of the electroporated neuron (nearby neurons) were targeted by the D₂-LGI1, we quantified D₂-LGI1 immunostaining at their AIS. D₂-LGI1 immunostaining at the AIS of nearby neurons did not reach that of KO/D₂-Lgi1 neuron (196.9 au in KO/D₂-Lgi1 neurons vs. 32.3 au in nearby AIS and 17.9 au in nearby dendrites; **Figure 4B**). However, in comparison to AIS of a distant neuron, D₂-LGI1 immunostaining was more than 7 fold higher at the AIS of a nearby neuron overlapping the AIS of the KO/D₂-Lgi1 neuron (4.3 au in distant neuron vs. 32.3 au in nearby AIS) and 4 fold higher at the AIS of a nearby neuron overlapping basal dendrites of the KO/D₂-Lgi1 neuron (4.3 au in distant neuron vs 17.9 au in nearby AIS; **Figure 4B**).

We then checked whether non tagged-LGI1 extracellularly secreted by KO/Lgi1 neurons could affect the intrinsic excitability of nearby neurons (**Figure 4C**). Randomly chosen KO neurons were recorded in current clamp within a 150 μm wide field around the KO/Lgi1 neurons. KO neurons recorded at a distance of more than 200 μm from the KO/Lgi1 neurons were chosen as a control. Intrinsic excitability of these distant KO neurons was similar to that of KO neurons recorded in non-electroporated organotypic cultures (Rheobase = 81 ± 9 pA n =

22 vs 73 ± 3 pA n = 22, p = 0.5; **Figure 1C and Figure 4C**). This confirm that these neurons were far enough away to be not impacted by LGII secretion from the KO/Lgi1 neuron as predicted by the results of D₂-LGII immunostaining (**Figure 4A, B**). However, the input-output curve of nearby neurons presents a right shift that almost reach the curve of KO/Lgi1 neurons (**Figure 4C**). Interestingly, rheobase of nearby neurons was significantly increased compared to the distant KO neurons (100 ± 7.0 pA n = 25 vs. 73.4 ± 3.3 pA n = 22, p = 0.003; **Figure 4C**) but also significantly decreased compared to KO/Lgi1 neurons (100 ± 7.0 pA n = 25 vs. 129.0 ± 8.3 pA n = 29, p = 0.01; **Figure 4C**). This confirm the modulation by secreted LGII of intrinsic excitability of nearby neurons.

As LGII protein rescued in KO/Lgi1 neurons allowed Kv1.1-containing channel recovery at the AIS, we measured Kv1.1 immunostaining at the AIS of nearby and distant neurons from KO/Lgi1 neurons. As expected, Kv1.1 immunostaining was significantly increased in KO/Lgi1 neuron compared to controls (1.48 ± 0.10 pA n = 19 vs. 0.99 ± 0.1 au n = 25, p = 0.002; **Figure 4E**). However, although Kv1.1 labelling at the AIS of nearby neurons looks increased compared to that of distant neurons for some cases (**Figure 4D**), supported by a trend in the quantification of Kv1.1 immunostaining (**Figure 4E**), no significant difference was measured (1.29 ± 0.15 pA n = 25 vs. 0.99 ± 0.10 au n = 25, p = 0.14; **Figure 4E**). Nevertheless, quantification also revealed no significant difference between nearby and KO/Lgi1 neurons (1.29 ± 0.15 pA n = 25 vs. 1.48 ± 0.10 au n = 19, p = 0.07; **Figure 4E**). Then, the level of Kv1.1 at the AIS of nearby neurons changed enough to be comparable to the one of KO/Lgi1 neurons, suggesting that modulation of Kv1.1-containing channel expression tuning intrinsic excitability of adjacent neurons from KO/Lgi1 neurons may not be ruled out.

Discussion

We show here that rescuing the *Lgi1* gene in CA3 pyramidal neurons lacking LGI1 protein reduces intrinsic neuronal excitability and increases both the DTx-k-sensitive D-type current and the density of Kv1.1 channels at the AIS. KO/*Lgi1* neurons displayed a higher voltage AP threshold and a higher rheobase that was similar to that found in WT neurons (Seagar et al., 2017). In addition, the sensitivity to DTx-k that is absent in KO/GFP neurons was rescued in KO/*Lgi1* neurons. As LGI1 is an extracellular protein released by neurons, we also addressed here the spatial extent of the changes in excitability and Kv1 channel expression using the labelling of LGI1 with D₂. We reveal a gradient of excitability centred on the KO/*Lgi1* neuron.

LGI1 determines intrinsic excitability through Kv1.1 channels

So far, the effects of *Lgi1* gene deletion have been extensively explored on both cellular excitability and Kv1 channel expression. In fact, a reduction in both the D-type current and Kv1.1 channels at the AIS has been reported in KO CA3 pyramidal neurons (Seagar et al., 2017). In KO-*Lgi1* pyramidal neurons of the cortex, cellular excitability is increased due to a reduction in the number of Kv1.2 (Zhou et al., 2018). Furthermore, the reduction in *Lgi1* expression using RNA silencing methods has also revealed an increase in neuronal excitability in dentate granule cells (Lugarà et al., 2020). We confirm here the link between LGI1 expression and reduction in Kv1 channel-dependent intrinsic excitability by showing that the rescue of *Lgi1* gene reduces neuronal excitability through an elevation in the density of Kv1.1 channels and an enhancement of the DTx-k-sensitive D-type current.

Three lines of evidence support the fact that Kv1.1 channels are rescued in KO/*Lgi1* neurons. First, the density of Kv1.1 channels was found to increase by 40% in KO/*Lgi1* neurons. Second, the D-type current was increased by a factor 2 in KO/*Lgi1*. Third, the excitability was reduced and the sensitivity to DTx-k was restored. Taken together, our data indicate that LGI1 determines intrinsic excitability by the expression of Kv1.1 channels at the AIS.

Kv1 channels are not only located at the AIS where they determine intrinsic excitability but they are also located at presynaptic terminals where they reduce transmitter release (Boudkkazi et al., 2011; Maarten H. P. Kole et al., 2007). Interestingly, the up-regulation of intrinsic neuronal activity comes with a loss of Kv1 channel function at the presynaptic terminal (Seagar et al., 2017).

Spatial extent of paracrine release of LGI1

As LGI1 is a protein released by neurons, we used a D₂-Lgi1 construct to show that LGI1 is mainly located at the AIS of the electroporated neuron and weakly present on the AIS of adjacent neurons. The excitability of neurons adjacent to the electroporated cell reveals a significant elevation of the rheobase in these neurons compared to that of more distant neurons. However, a non-significant increase in the Kv1.1 channel density was observed in KO neurons adjacent to KO/Lgi1 neurons, suggesting that electrophysiological analysis is more sensitive than immunostaining. Presynaptic and postsynaptic paracrine effects of LGI1 have been reported on synaptic transmission (Lovero et al., 2015). AMPA/NMDA ratio recorded in KO-Lgi1 neurons neighbouring a neuron transfected with Lgi1 was similar to WT neurons. Furthermore, the AMPA/NMDA ratio recorded in KO-Lgi1 neurons that receive inputs from CA3 neurons that were previously transfected with LGI1-expressing lentivirus, was identical to that of WT neurons (Lovero et al., 2015). However, in this study the spatial extent of the paracrine release of LGI1 was not tested.

Methods

Production of KO-Lgi1 Mice

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 (D13055-08, Préfecture des Bouches du Rhône). Heterozygous *Lgi1*^{+/-} mice were crossed to generate *Lgi1*^{-/-} (i.e. knock out, KO), *Lgi1*^{+/-}, and *Lgi1*^{+/+} (wild type, WT) littermates. WT and KO mice were selected by analysing the amplification profile from Polymerase Chain Reaction (PCR). After sampling from 7 days old mice, DNA were denatured by temperature variations with a mix of 0.5 μ l of DNA release diluted in 20 μ l of dilution buffer (Master mix, ThermoFisher). 1 μ l of DNA extraction from each sample was amplified with 0.25 μ l of primer (final concentration of 0.3 μ M for each primer: WT F, WT R, KO F, KO R; **Table 1**), 10 μ l of Phire containing DNA polymerase (Master mix, ThermoFisher) and 8.75 of water in the Thermal Cycler (ProFlex PCR system, life technologies). PCR products were migrating in agarose gel (2%) and the resulting migration bands were visualised at 120 pb (WT band) and 200 pb (KO band) with a biomarker band as a reference.

Hippocampal slice cultures

Slices cultures were prepared as described previously (Debanne et al., 2008). Young *Lgi1* KO mice (P7–P10) were killed by decapitation, the brain was removed, and each hippocampus dissected. Hippocampal slices (350 μ m) were obtained using a Vibratome (Leica, VT1200S). They 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 d 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, and 8.95 sterile H₂O.

Single cell electroporation

Electroporation-mediated transfection was carried out in organotypic slice cultures of rat hippocampus at 4 days in vitro. Using this technique (Rathenberg et al., 2003), we integrated plasmid DNA expression constructs of 9227 pb (pIND-LGI1-Tet-IRES-eGFP) to ensure that the selected neurons express the protein LGI1 and GFP (Green Fluorescent Protein) (Lgi1-encoding gene). The plasmid was composed of a cytomegalovirus promotor which activation level depend on the tetracycline inducible Tet operator system. In control condition, we used plasmid DNA expression constructs of 7556 pb (pIND-Tet-IRES-eGFP) to express only GFP in electroporated neurons (GFP-encoding gene). To target extracellular LGI1, we used a plasmid DNA expression constructs of 8577 pb (pIND- Δ -IRES-Dendra2-LGI1) to express Dendra2-tagged Lgi1 (D₂-Lgi1-encoding gene). We also used a plasmid DNA construct of 5442 pb (pTomato) allowing dtTomato expression to identify the morphology of the electroporated neuron. Before electroporation procedure, plasmid solution was centrifuged at 10000 g for 5 minutes to avoid obstruction of the micropipette. In each conditions, doxycycline was applied in the cell culture medium to a final concentration of 0.3 μ g/ml immediately after single-cell electroporation procedure (**Figure 1A**). As an artificial tetracycline, the doxycycline allowed activation of cytomegalovirus promotor to induce Lgi1 or D₂-Lgi1 gene expression. Lgi1-encoding gene and GFP-encoding gene were expressed for 3 days, and D₂-Lgi1-encoding gene and dtTomato-encoding gene for 6 days.

For single cell eletroporation, the microscope chamber was consisting of a sterile 60-mm Petri dishes. The plasmid DNA constructs was diluted to a final concentration of 33 ng/ μ l in the internal solution containing (in mM): K-gluconate 120, KCl 20, Hepes 10, EGTA 0.5, MgCl₂ 2, Na₂ATP 2, and NaGTP 0.3 (pH 7.4). Micropipettes (7–10 M Ω) were filled with this DNA preparation after filtration with a sterile Acrodisc Syringe Filter (0.2 μ m pore diameter).

During the SCE procedure, slice culture (DIV4-5) was positioned in the 60-mm Petri dishes and covered with pre-warmed and filtered external solution containing (in mM): 125 NaCl, 26 NaHCO₃, 3 CaCl₂, 2.5 KCl, 2 MgCl₂, 0.8 NaH₂PO₄, and 10 D-glucose, equilibrated

with 95% O₂–5% CO₂. The ground electrode and the microelectrode were connected to an isolated voltage stimulator (Axoprotector 800A, Molecular Devices). Under visual guidance, the micropipette was positioned by a three-axis micromanipulator near the cell body of selected CA3 neurons. Pressure was controlled to have a loose-seal between the micropipette and the plasma membrane. When the resistance monitored reached 25 - 40 MΩ, we induced a train of -12V pulses during 500 ms (pulse width: 0.5 ms, frequency: 50 Hz). Each organotypic slice culture underwent SCE procedure for 8-10 selected neurons during a limited time of 30 min and was then back transferred to the incubator.

Electrophysiology

After three days in the presence of doxycycline, whole-cell recordings were obtained from electroporated CA3 neurons, which were identified by GFP expression. Patch pipettes (7 – 10 MΩ) were filled with the internal solution containing (in mM): K-gluconate 120, KCl 20, Hepes 10, EGTA 0.5, MgCl₂ 2, Na₂ATP 2, and NaGTP 0.3 (pH 7.4). All recordings were made at 29 °C in a temperature-controlled recording chamber (Luigs & Neumann) perfused with the same external solution as for SCE. Liquid junction potential (~-12 mV) was not compensated in the data reported. Neurons were recorded in current clamp or voltage clamp with a Multiclamp 700B Amplifier (Axon Instruments, Molecular Devices). Excitability was measured by delivering a range of long (1 s) depolarizing current pulses (10 – 250 pA, by increments of 10 pA) and counting the number of action potentials. Ionotropic glutamate and GABA receptors were blocked with 2 - 4 mM kynurenic acid and 100 μM picrotoxin respectively. Input-output curves were determined for each neuron and three parameters were examined: the rheobase (the minimal current eliciting at least one action potential), the gain (measured on each cell as the linear fit of the spike number as a function of current pulse) and the latency of the first spike (depolarising time before the evoked spike under rheobase current eliciting only 1 spike). Sensitivity to Kv1-channel blocker dendrotoxin K (DTX-K) was determined by current-clamp

recording before and after bath application of the DTX-K (100nM). Voltage-clamp protocols to measure Kv1-channel mediated currents consisted of a family of voltage-step commands from a holding potential of -90 mV (step from -80 to +10 mV in 10-mV increments). To block voltage dependent Ca²⁺ and Na⁺ currents, 200 μM Ni²⁺, 50 μM Cd²⁺, and 0.5 μM TTX were added to the extracellular solution. Algebraic isolation of the D-type potassium current was done by subtracting the currents evoked in the presence of the selective blocker of Kv1.1-containing channel DTX-K, from currents evoked in control solution. The D-type conductance was calculated from the maximal peak of the DTX-k-sensitive current obtained and the driving force of potassium in our recording conditions (electrochemical potential of potassium $E_{K^+} = -105.09$ mV). In all voltage-clamp experiments, leak and capacitance subtraction was performed using a p/n (n = 4) protocol. The voltage and current signals were low-pass filtered (3 - 0.4 kHz respectively), and acquisition was performed at 10 kHz with pClamp10 (Axon Instruments). Data were analysed with ClampFit (Axon Instruments) and Igor (Wavemetrics).

Immunohistochemistry

Organotypic cultures from *Lgi1*^{-/-} mice were fixed in a solution containing 4% of paraformaldehyde in PBS for 15 min at 4°C, incubated in 50mM NH₄Cl in PBS for 15 min at room temperature (RT), and blocked overnight at 4°C in a solution containing 5% Normal Goat Serum (NGS, Vector laboratories) and 0.5% Triton X-100 in PBS. After blocking, slices were incubated (24h; 4°C) with primary antibodies in a solution containing 0.5% triton X-100 and 2% NGS in PBS. The following antibodies were used: guinea pig anti-AnkG (1:400, Synaptic Systems, 386005, RRID: AB_2737033), rabbit anti-GFP (1:500, Synaptic Systems, 132003, RRID: AB_1834147), mouse anti-Kv1.1 (1:200, Antibodies Incorporated, 75-105, RRID: AB_10673166) or mouse anti-AnkG (1:400, Antibodies incorporated, 75-147, RRID: AB_10675130), rabbit anti-Dendra2 (1:200, Antibodies online, ABIN361314, RRID: AB_10789591), chicken anti-tdTomato (1:500, ThermoFisher, TA150089). The slices were then washed 4 times for 20 min each time in PBS 0.5% Triton X-100 and then incubated with the

appropriate secondary antibodies for 2h at RT in a solution containing 0.5% Triton X-100 and 2%NGS in PBS. The following antibodies were used: Alexa Fluor 647 goat anti-guinea pig (1:150, Jackson ImmunoResearch), Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (1:200, Jackson ImmunoResearch), Alexa Fluor 594 goat anti-mouse (1:200, Jackson ImmunoResearch) or Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (1:200, Jackson ImmunoResearch), Alexa Fluor 594 donkey anti-chicken (1:400, Jackson ImmunoResearch), Alexa Fluor 647 donkey anti-mouse (1:400, Molecular Probes). Subsequently, sections were washed 3 times for 20 min in PBS 0.5% Triton X-100. Nuclei were stained using DAPI at a final concentration of 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS for 10 min and washed in PBS for 15 min. Slices were then mounted in Vectashield mounting medium (Vector laboratories). Z-stacks of confocal sections were acquired on a LSM780 confocal scanning microscope (Zeiss).

Image processing and quantification

ImageJ (NIH) was used for image analysis and quantification. In order to measure Kv1.1 immunostaining at the AIS, rolling ball background subtraction was performed over the images. Then, object identification was done by using 3D object counter plugin in ImageJ over AnkG signal (Bolte and Cordelieres, 2006). After object detection, this 3D mask was applied over Kv1.1 signal or D2-Lgi1 signal, and the 3D ROI manager (Ollion et al., 2013) was used to undoubtedly identify individual AISs within the field of view. Kv1.1 or D2-Lgi1 Immunostaining levels were collected as average grey values. For each condition, Kv1.1 immunostaining at the AIS was normalized to KO neurons away from the neuron electroporated with LGI1.

For some example images, contrast was slightly modified for GFP signal between 2 comparable conditions. As it only used for the identification of the electroporated neurons, we overcame the effect of variations in cellular machinery.

Statistics:

Pooled data are presented as mean \pm SEM and statistical analysis was performed using the Mann–Whitney U test or Wilcoxon rank signed test and Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney post-hoc test for multi-comparison. Data were considered statistically significant at $P \leq 0.05$ except for Mann-Whitney post-hoc test in which significant is reached at $P \leq 0.016$ (0.05/3).

For some conditions in electrophysiology and in immunohistochemistry, a resampling was carried out by using the bootstrap method to have a comparable workforce between distant KO neuron, nearby KO neuron, KO/Lgi1 neurons and KO/GFP neurons.

Figures:

Table 1:

LGII LOX WT F	5'-ATT TCC TTA GTG CCC CTG TTT TTA-3'
LGII LOX WT R	5'-TGT CTG GAT TCA ATG CTG TCT TAG A-3'
LGII KO 2 F	5'-ACA TTT CCT TAG TGC CCC TGT TT-3'
LGII KO 2 R	5'-CCT CTT AGC CAC TGA GGC ATC T-3'

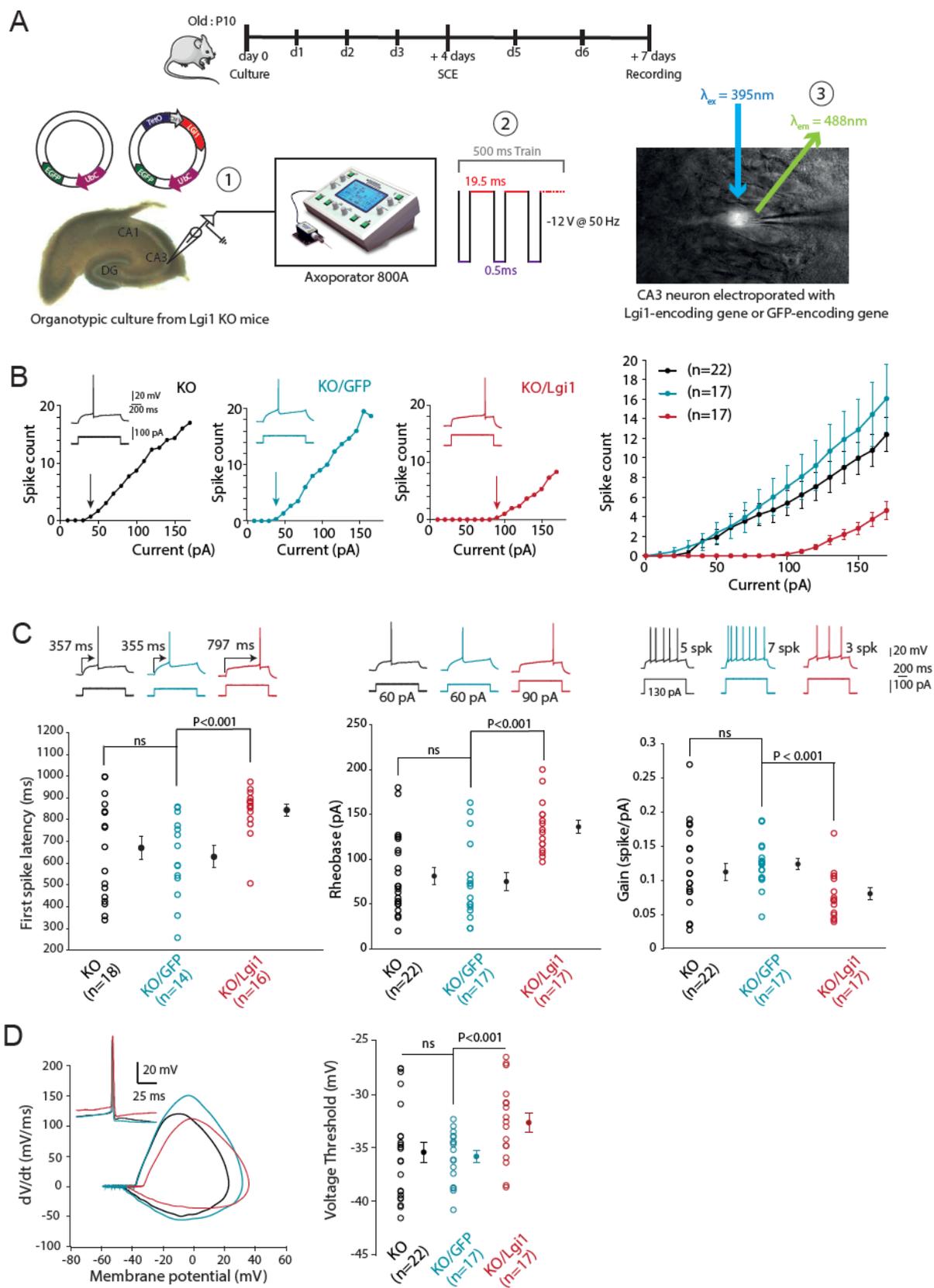


Figure 1. Intrinsic excitability of hippocampal CA3 neurons from KO-Lgi1 mice was rescued using SCE of an Lgi1-encoding gene. (A) Scheme of single-cell electroporation procedure. Top, the time course of the experiments (d0...d7 = age of organotypic slices in culture), (1) simplified representation of plasmid DNA constructs (UbC = eGFP constitutive promoter), (2) SCE

protocol and (3) resulting fluorescent electroporated cell. λ_{ex} = excitation wavelength, λ_{em} = emission wavelength. (B) Input-output curves showing the number of spike according to depolarising current increments and corresponding traces of representative neurons from organotypic culture of KO-Lgi1 mice (black), electroporated with GFP-encoding gene (blue) or electroporated with Lgi1-encoding gene (red). Arrows indicate the rheobase. Right, averaged input-output curves. (C) Left, first spike latency obtained at rheobase current. Middle, rheobase. Right, gain. (D) Changes in spike threshold. Left, phase plot of action potentials recorded in a KO neuron (black), electroporated with GFP (blue) and Lgi1 (red). Right, pooled data. Error bars represent SEM. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test and significance was obtained at $P < 0.05$.

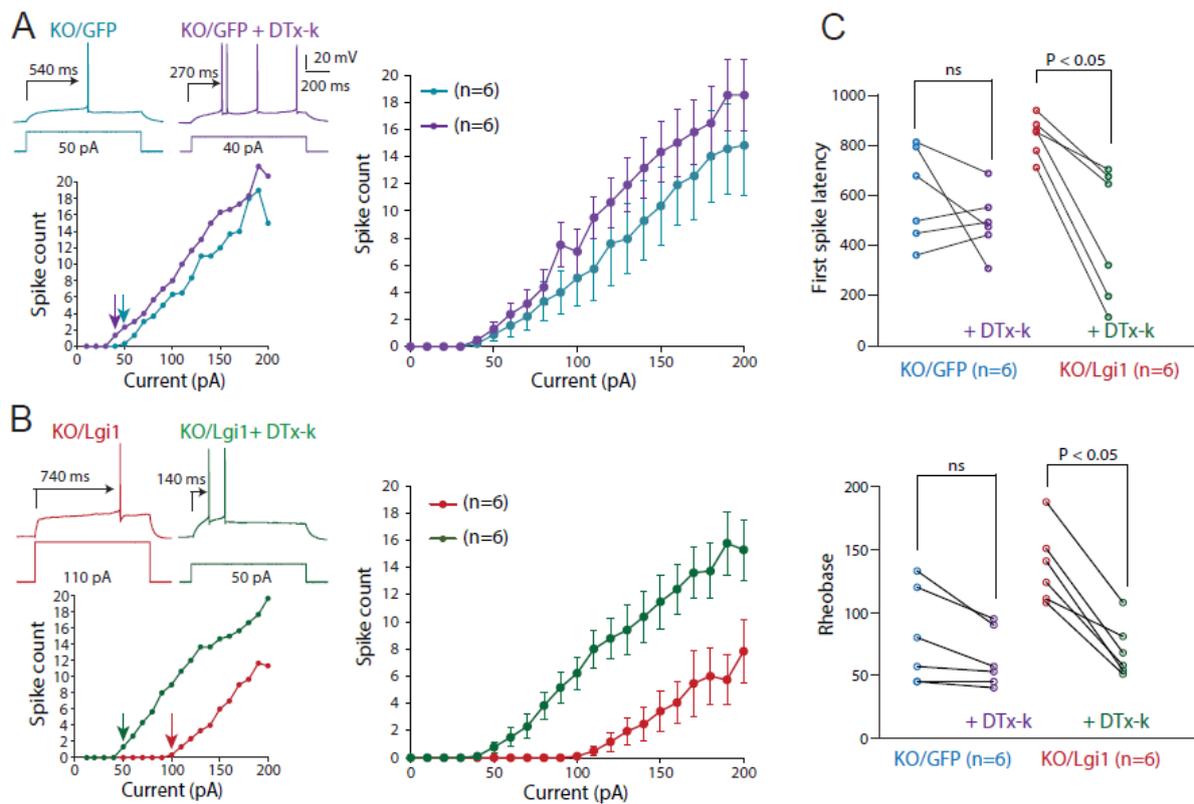


Figure 2. Sensitivity to DTx-k was higher in CA3 neurons electroporated with Lgi1 gene. (A) left, Input-output curves with corresponding traces of KO/GFP (blue) and representative neurons. DTx-k (100 nM) was bath applied on KO/GFP neurons (purple). Rheobase is indicated on graphs by arrows. Right, Averaged input-output curves before and after bath application of DTx-k were obtained. (B) left, Input-output curves and corresponding traces of KO/Lgi1 representative neurons and right, averaged input-output curves between (red) and after (green) bath application of DTx-k. (C) Top, first spike latency obtained at rheobase current. Bottom, rheobase changes. Error bars represent SEM. Statistical analysis was performed using the Wilcoxon rank-signed test.

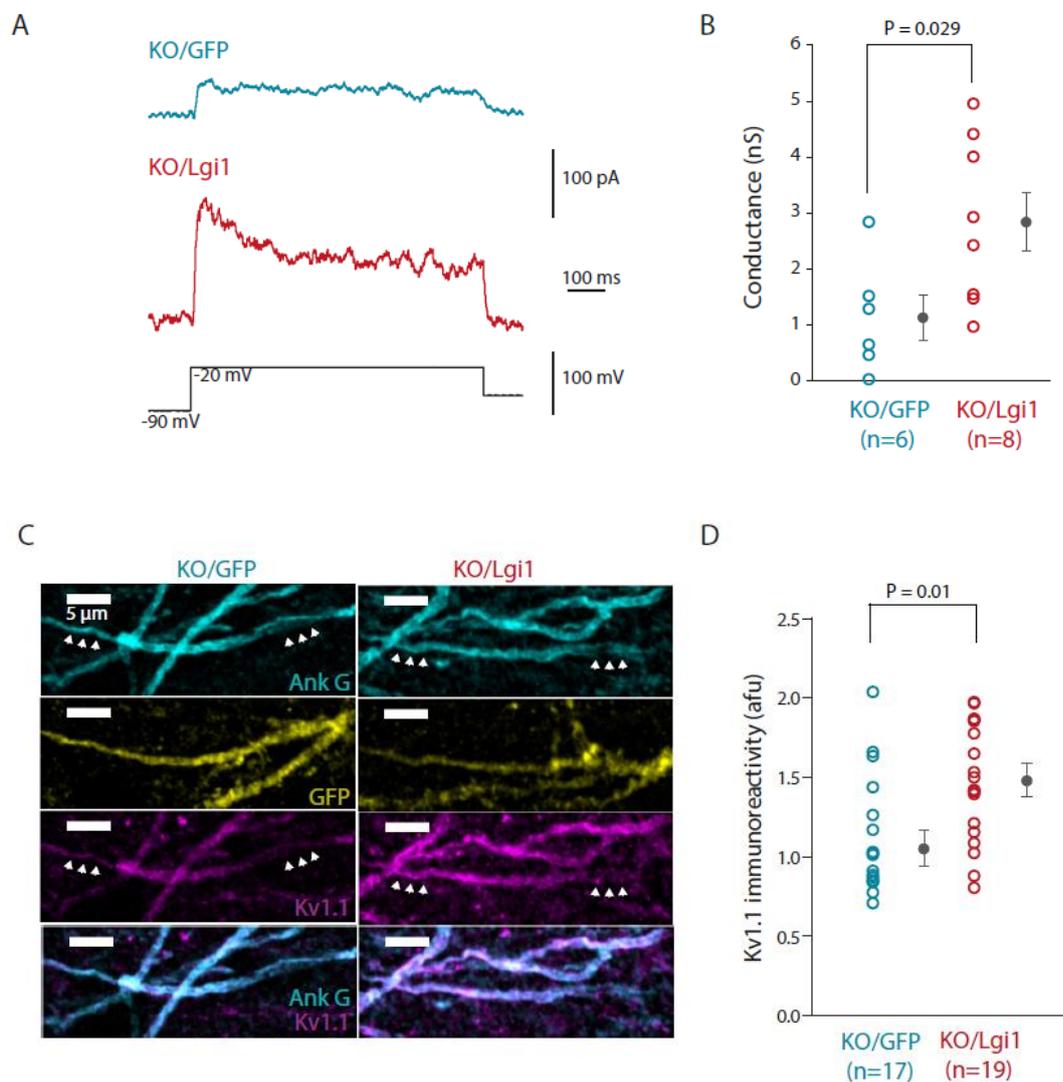


Figure 3. D-type current is larger in CA3 neurons electroporated with Lgi1 gene. (A) Representative traces of D-type current evoked by a voltage step from -90 mV to -20 mV in CA3 KO/GFP (top, blue) and KO/Lgi1 (bottom, red) neurons. (B) D-type conductance obtained in these two conditions. (C) Immunostaining of Ank G (cyan), GFP (yellow) and Kv1.1 (magenta) at the AIS of KO/GFP and KO/Lgi1 represented in column. Overlapping of Ank G and Kv1.1 labelling appear in white on the merge images (last row). Arrows indicate both ends of the AIS to follow its trajectory. (D) Quantification of Kv1.1 immunoreactivity at the AIS of KO/GFP and KO/Lgi1 neurons. Error bars represent SEM. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test.

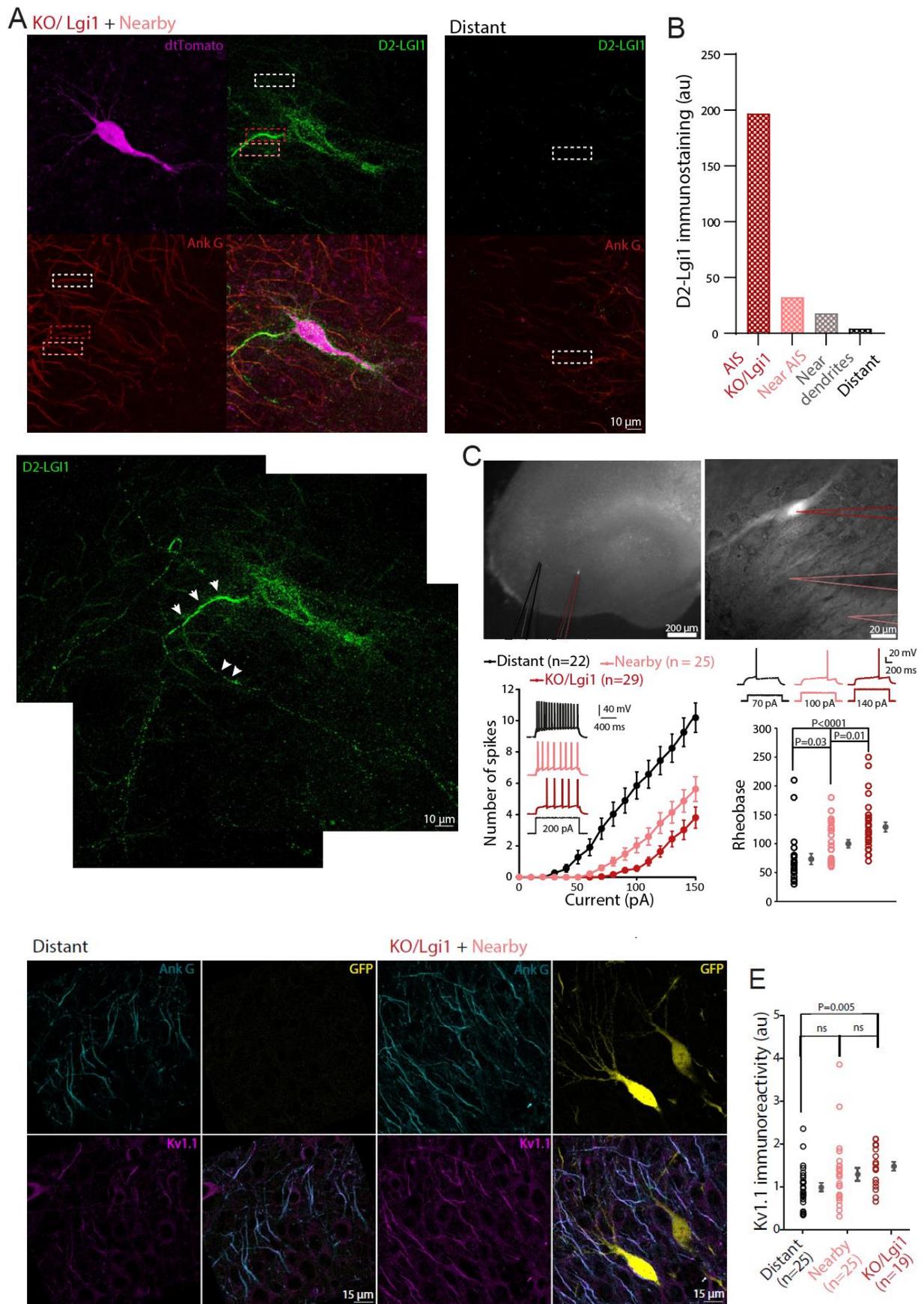
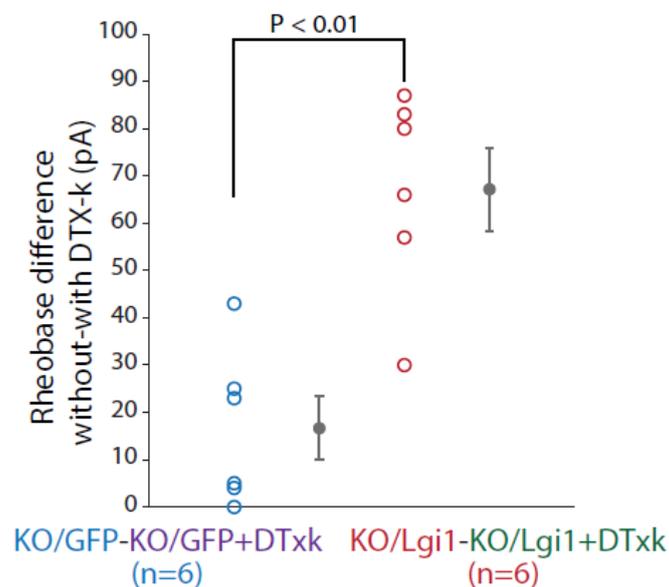


Figure 4. LGI1 rescued by the KO/Lgi1 neuron induce a paracrine effect of intrinsic excitability in nearby neurons. (A) Immunostaining of Dendra₂-LGI1 in organotypic culture with KO/D₂-Lgi1

neurons. dtTomato (magenta), Ank G (red) and D₂-LGI1 (green) labelling were represented, with merge at the bottom right corner for the field of view containing the KO/D₂-Lgi1. A field of view at around 200 μm away from the KO/D₂-Lgi1 (right) includes distant neurons from KO/D₂-Lgi1. Dotted frames indicates AIS chosen for the quantification. Secreted D₂-LGI1 in a wide plan was represented at the bottom with arrows that follow AIS and axon that cross pyramidal layer. (B) Quantification of the D₂-LGI1 immunoreactivity at the AIS of the KO/D₂-Lgi1 (red), nearby KO/D₂-Lgi1 AIS (pink), nearby KO/D₂-Lgi1 dendrites (gray) and distant (black) neurons. (C) Hippocampal organotypic culture with a KO/Lgi1 neuron (left) and field of view of the KO/Lgi1 (right) with schematic pipettes corresponding to distant (black), nearby (pink) and KO/Lgi1 (red) recorded neurons. Average input-output curves with corresponding traces and rheobase of the 3 conditions (bottom). (D) Immunostaining of Ank G (cyan), GFP (yellow) and Kv1.1 (magenta) were represented in the field of view of distant and KO/Lgi1 neurons. (E) Quantification of Kv1.1 immunoreactivity at the AIS of distant, nearby and KO/Lgi1 neurons. Error bars represent SEM. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney in post-hoc test to Kruskal-wallis test and significance was obtained at P<0.016.



Supplementary Figure 1. Effect of DTx-k on rheobase. The DTx-k effect was obtained by subtraction of the rheobase after adding DTx-k to the rheobase before DTx-k and compared between KO/GFP and KO/Lgi1. Error bars represent SEM. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test and significance was obtained at P<0.05.

References

- Boillot, M., Lee, C.-Y., Allene, C., Leguern, E., Baulac, S., and Rouach, N. (2016). LGI1 acts presynaptically to regulate excitatory synaptic transmission during early postnatal development. *Sci Rep* 6, 21769.
- Boudkkazi, S., Fronzaroli-Molinieres, L., and Debanne, D. (2011). Presynaptic action potential waveform determines cortical synaptic latency. *J. Physiol. (Lond.)* 589, 1117–1131.
- Chabrol, E., Navarro, V., Provenzano, G., Cohen, I., Dinocourt, C., Rivaud-Péchoux, S., Fricker, D., Baulac, M., Miles, R., Leguern, E., et al. (2010). Electroclinical characterization of epileptic seizures in leucine-rich, glioma-inactivated 1-deficient mice. *Brain* 133, 2749–2762.
- 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.
- Debanne, D., Boudkkazi, S., Campanac, E., Cudmore, R.H., Giraud, P., Fronzaroli-Molinieres, L., Carlier, E., and Caillard, O. (2008). Paired-recordings from synaptically coupled cortical and hippocampal neurons in acute and cultured brain slices. *Nat Protoc* 3, 1559–1568.
- Fukata, Y., Adesnik, H., Iwanaga, T., Brecht, D.S., Nicoll, R.A., and Fukata, M. (2006). Epilepsy-related ligand/receptor complex LGI1 and ADAM22 regulate synaptic transmission. *Science* 313, 1792–1795.
- Fukata, Y., Lovero, K.L., Iwanaga, T., Watanabe, A., Yokoi, N., Tabuchi, K., Shigemoto, R., Nicoll, R.A., and Fukata, M. (2010). Disruption of LGI1-linked synaptic complex causes abnormal synaptic transmission and epilepsy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 3799–3804.
- Hivert, B., Marien, L., Agbam, K.N., and Faivre-Sarrailh, C. (2019). ADAM22 and ADAM23 modulate the targeting of the Kv1 channel-associated protein LGI1 to the axon initial segment. *J Cell Sci* 132, jcs219774.

Kalachikov, S., Evgrafov, O., Ross, B., Winawer, M., Barker-Cummings, C., Martinelli Boneschi, F., Choi, C., Morozov, P., Das, K., Teplitskaya, E., et al. (2002). Mutations in LGI1 cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features. *Nat Genet* 30, 335–341.

Kole, M.H.P., Letzkus, J.J., and Stuart, G.J. (2007). Axon initial segment Kv1 channels control axonal action potential waveform and synaptic efficacy. *Neuron* 55, 633–647.

Lovero, K.L., Fukata, Y., Granger, A.J., Fukata, M., and Nicoll, R.A. (2015). The LGI1-ADAM22 protein complex directs synapse maturation through regulation of PSD-95 function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, E4129-4137.

Lugarà, E., Kaushik, R., Leite, M., Chabrol, E., Dityatev, A., Lignani, G., and Walker, M.C. (2020). LGI1 downregulation increases neuronal circuit excitability. *Epilepsia* 61, 2836–2846.

Rama, S., Zbili, M., Fékété, 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.

Ramberger, M., Berretta, A., Tan, J.M.M., Sun, B., Michael, S., Yeo, T., Theorell, J., Bashford-Rogers, R., Paneva, S., O’Dowd, V., et al. (2020). Distinctive binding properties of human monoclonal LGI1 autoantibodies determine pathogenic mechanisms. *Brain* 143, 1731–1745.

Rathenberg, J., Nevian, T., and Witzemann, V. (2003). High-efficiency transfection of individual neurons using modified electrophysiology techniques. *J Neurosci Methods* 126, 91–98.

Schulte, U., Thumfart, J.-O., Klöcker, N., Sailer, C.A., Bildl, W., Biniossek, M., Dehn, D., Deller, T., Eble, S., Abbass, K., et al. (2006). The epilepsy-linked Lgi1 protein assembles into presynaptic Kv1 channels and inhibits inactivation by Kvbeta1. *Neuron* 49, 697–706.

Seagar, M., Russier, M., Caillard, O., Maulet, Y., Fronzaroli-Molinieres, L., De San Feliciano, M., Boumedine-Guignon, N., Rodriguez, L., Zbili, M., Usseglio, F., et al. (2017). LGI1 tunes intrinsic excitability by regulating the density of axonal Kv1 channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114, 7719–7724.

Senechal, K.R., Thaller, C., and Noebels, J.L. (2005). ADPEAF mutations reduce levels of secreted LGI1, a putative tumor suppressor protein linked to epilepsy. *Hum Mol Genet* 14, 1613–1620.

Staub, E., Pérez-Tur, J., Siebert, R., Nobile, C., Moschonas, N.K., Deloukas, P., and Hinzmann, B. (2002). The novel EPTP repeat defines a superfamily of proteins implicated in epileptic disorders. *Trends Biochem Sci* 27, 441–444.

Thomas, R.A., Gibon, J., Chen, C.X.Q., Chierzi, S., Soubannier, V.G., Baulac, S., Séguéla, P., Murai, K., and Barker, P.A. (2018). The Nogo Receptor Ligand LGI1 Regulates Synapse Number and Synaptic Activity in Hippocampal and Cortical Neurons. *ENeuro* 5, ENEURO.0185-18.2018.

Yamagata, A., Miyazaki, Y., Yokoi, N., Shigematsu, H., Sato, Y., Goto-Ito, S., Maeda, A., Goto, T., Sanbo, M., Hirabayashi, M., et al. (2018). Structural basis of epilepsy-related ligand-receptor complex LGI1-ADAM22. *Nat Commun* 9, 1546.

Yokoi, N., Fukata, Y., Kase, D., Miyazaki, T., Jaegle, M., Ohkawa, T., Takahashi, N., Iwanari, H., Mochizuki, Y., Hamakubo, T., et al. (2015). Chemical corrector treatment ameliorates increased seizure susceptibility in a mouse model of familial epilepsy. *Nat Med* 21, 19–26.

Zhou, L., Zhou, L., Su, L., Cao, S.-L., Xie, Y.-J., Wang, N., Shao, C.-Y., Wang, Y.-N., Zhou, J.-H., Cowell, J.K., et al. (2018). Celecoxib Ameliorates Seizure Susceptibility in Autosomal Dominant Lateral Temporal Epilepsy. *J Neurosci* 38, 3346–3357.

Zhou, Y.-D., Lee, S., Jin, Z., Wright, M., Smith, S.E.P., and Anderson, M.P. (2009). Arrested maturation of excitatory synapses in autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy. *Nat Med* 15, 1208–1214.

2. Un autoanticorps anti-LGI1 à épitope spécifique issus de patients potentialise l'excitabilité neuronale en modulant les canaux Kv1.1

Abstract

Leucine-rich Glioma Inactivated protein 1 (LGI1) is expressed in the central nervous and genetic loss of function is associated with epileptic disorders. Also, patients with LGI1-directed autoantibodies have frequent focal seizures as a key feature of their disease. LGI1 is composed of a Leucine Rich Repeat (LRR) and an Epitempin (EPTP) domain. These domains are reported to interact with different aspects of the transsynaptic complex formed by LGI1 at excitatory synapses, including presynaptic Kv1 potassium channels. Patient-derived mAbs are ideal reagents to study whether domain-specific LGI1-autoantibodies induce epileptiform activities in neurons, and their downstream mechanisms. To address this question, we measured the intrinsic excitability of CA3 pyramidal neurons in organotypic cultures from rat hippocampus treated with either a LRR- or an EPTP- reactive patient-derived mAb. The antibodies induced changes in neuronal intrinsic excitability which led us to measure their effects on Kv1-type potassium currents. We found an increase of intrinsic excitability correlated with a reduction of the sensitivity to a selective Kv1.1-channel blocker in neurons treated with the LRR mAb compared to the control, but not in neurons treated with the EPTP mAb. Our findings suggest LRR mAbs are able to modulate neuronal excitability that could account for epileptiform activities observed in patients.

An epitope specific patient-derived LGI1- autoantibody enhances neuronal excitability by modulating the Kv1.1 channel.

Johanna Extrémet¹, Oussama El Far¹, Sarosh R Irani², Dominique Debanne¹ & Michael Russier^{1*}

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

² Oxford Autoimmune Neurology Group, Nuffield Department of Clinical Neurosciences,
University of Oxford, UK

Correspondence to Michael Russier: michael.russier@univ-amu.fr

Introduction

Autoantibodies directed against Leucine-rich Glioma-Inactivated protein 1 (LGI1) are found in patients with limbic encephalitis (LE) who have frequent focal seizures and hippocampal atrophy as hallmarks of their disease (Aurangzeb et al., 2017; Irani et al., 2011; Thompson et al., 2018). Hyperexcitability and epileptiform activities have been recorded in the hippocampi of mice and rats treated with serum from patients with LGI1-autoantibodies, suggesting their direct pathogenicity (Lalic et al., 2011; Petit-Pedrol et al., 2018). LGI1 is a soluble molecule composed of a Leucine-Rich Repeat (LRR) and an Epitempin (EPTP) domain. The LRR domain is reported to mediate transsynaptic homo-oligomerisation whereas the EPTP domain allows LGI1 to dock on its pre- and post-synaptic receptors, ADAM23 and ADAM22, respectively (Yamagata and Fukai, 2020). Serum LGI1-antibodies have been shown to target both the LRR and EPTP domains of LGI1. Sera have been shown to cause both a down-regulation of two interaction partners of LGI1: the presynaptic voltage-gated potassium channel Kv1 and the postsynaptic AMPA receptors (Kornau et al., 2020; Lalic et al., 2011; Petit-Pedrol et al., 2018; Ramberger et al., 2020). Furthermore, polyclonal serum antibodies can prevent the interaction of LGI1 with ADAM22 and potentiate excitatory glutamatergic synapses (Kornau et al., 2020; Ohkawa et al., 2013; Ramberger et al., 2020).

More recent reports aimed to better characterize the relative pathogenic roles of domain-specific antibodies by studying monoclonal LGI1-autoantibodies (mAb) derived from patient B cells (Kornau et al., 2020; Ramberger et al., 2020). mAbs targeting the LRR domain were shown to internalise the LGI1 protein after it docked to ADAM22/ADAM23 receptors (Ramberger et al., 2020). In contrast, EPTP-mAbs operated by competing with LGI1 for binding to ADAM22 (Kornau et al., 2020; Ramberger et al., 2020). Both mAb categories were shown to modulate neuronal excitability, but LRR-mAbs induced more robust effects and behavioural deficits (Kornau et al., 2020; Ramberger et al., 2020).

In order to directly compare the electrophysiological effects of LRR- and EPTP-mAbs, we measured intrinsic excitability of CA3 neurons after their application. As LGI1 can alter the inactivation gating of the Kv1 channels (Schulte et al., 2006) which tune neuronal excitability in CA3 pyramidal neurons (Rama et al., 2017), we tested whether the blocking the Kv1.1 subunit with a specific antagonist, dendrotoxin-k (DTx-k), affected intrinsic excitability which could be abrogated by the mAbs.

Materials & Methods

Rat hippocampal slice cultures: All experiments were carried out according to the European and Institutional guidelines for the care and use of laboratory animals and approved by the local health authority (D13055-08, Préfecture des Bouches-du-Rhône). Slice cultures were prepared as described previously (Debanne et al., 2008). In brief, young Wistar rats (P7–P10) were anesthetized with isoflurane and killed by decapitation, the brain was removed, and each hippocampus was dissected. Hippocampal slices (350 μ m) were obtained using a Vibratome (Leica, VT1200S). They 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 d in an incubator at 34°C, 95% O₂–5% CO₂. The culture medium contained 25ml MEM, 12.5ml HBSS, 12.5ml horse serum, 0.5ml penicillin/streptomycin, 0.8ml glucose (1 M), 0.1ml ascorbic acid (1 mg/mL), 0.4ml HEPES (1 M), 0.5ml B27, and 8.95ml sterile H₂O. To limit glial proliferation, 5 μ M Ara-C was added to the culture medium starting at 4 d in vitro (DIV).

Application of the mAbs: LGI1-specific mAbs were expressed in HEK293T cells, as described in Ramberger et al. 2020. Polyclonal IgGs purified from total healthy human serum (Protein G Sepharose 4 Fast Flow, 17-0618-01, Cytiva) were used as a control (Human Control: HC). The electrophysiological effect of one recombinant LRR-mAb (mAb01, Ramberger et al., 2020) and one EPTP-mAb (mAb6212) were assessed individually in rat CA3 pyramidal neurons. HC IgGs

and LGI1-mAbs were applied daily from DIV4 until the day of the experiment, at a final concentration of 4 ng/ μ l in culture medium, in direct contact with the hippocampal organotypic cultures.

Electrophysiology: Whole-cell recordings were obtained from CA3 neurons in organotypic cultures at DIV7 and DIV8. Recordings were carried out in a limit of 6 h after the last application of the IgGs. The external solution contained: 125mM NaCl, 26mM NaHCO₃, 3mM CaCl₂, 2.5mM KCl, 2mM MgCl₂, 0.8mM NaH₂PO₄, and 10mM D-glucose, and was equilibrated with 95% O₂–5% CO₂. Patch pipettes (7–10 M Ω) were filled with a solution containing (mM): K-gluconate 120, KCl 20, Hepes 10, EGTA 0.5, MgCl₂ 2, Na₂ATP 2, and NaGTP 0.3 (pH 7.4). Organotypic cultures were quickly washed in the perfused recording chamber with the external solution by increasing the speed of perfusion pumps to facilitate the patch-clamp procedure. All recordings were made at 29°C in a temperature-controlled recording chamber (Luigs & Neumann). Neurons were recorded in current clamp with a Multiclamp 700B Amplifier (Axon Instruments, Molecular Devices). Excitability was measured by delivering a range of long (1 s) depolarizing current pulses (10–250 pA, by increments of 10 pA) and counting the number of action potentials. Ionotropic glutamate and GABA receptors were blocked with 2–4 mM kynurenate and 100 μ M picrotoxin, respectively. Input–output curves corresponding to the number of action potential elicited by each increment of injected current were determined for each neuron and two parameters were examined; the rheobase (the minimal current eliciting at least one action potential) and the first spike latency (depolarising time before the first spike obtained under rheobase current).

Sensitivity of intrinsic excitability to the selective Kv1.1-channel blocker, dendrotoxin-K (DTx-k) was determined by current-clamp recording before and after 5 minutes of bath application of DTx-K (100 nM). Acquisition was performed at 10 kHz with pClamp10 (Axon Instruments).

Data were analysed with ClampFit (Axon Instruments) and IgorPro (Wavemetrics). Pooled data are presented as mean \pm SEM and statistical analysis was performed using the Mann–Whitney U test or Wilcoxon rank signed test.

Results

The LRR-mAb, but not the EPTP-mAb, increases intrinsic excitability in CA3 pyramidal neurons

To assess the effect of the two mAbs on neuronal excitability, we performed current-clamp recordings from CA3 pyramidal neurons in treated organotypic cultures of rat hippocampus. A significant decrease in the rheobase was observed after treatment with the LRR-mAb (HC IgGs: 100.1 ± 7.8 pA $n = 13$ vs. LRR-mAb: 75.4 ± 7.5 pA $n = 14$, Mann-Whitney, $p = 0.035$) but not with the EPTP-mAb (HC IgGs: 100.1 ± 7.8 pA $n = 13$ vs. EPTP-mAb: 110.2 ± 15.6 pA $n = 12$, Mann-Whitney, $p = 0.96$) (Figure 1A). In addition, CA3 neurons treated with the LRR-mAb showed a leftward shift of the input-output curve compared to neurons treated with HC IgGs, whereas input-output curves were not different between neurons treated with the EPTP-mAb and HC IgGs (Figure 1B). These data suggest LRR-mAbs could induce an increase in intrinsic excitability in rat CA3 neurons without differences in passive properties of recorded neurons (input resistance: 225.85 ± 7.37 M Ω $n = 13$ vs. LRR-mAb: 222.45 ± 13.09 M Ω , $n = 14$; Mann-Whitney, $p = 0.45$ or capacitance: 337.85 ± 14.11 pF $n = 13$ vs. LRR-mAb: 329.92 ± 20.45 pF $n = 14$, Mann-Whitney, $p = 0.68$, data not shown).

The LRR-mAb increases intrinsic excitability through the modulation of the Kv1 potassium current

Recordings of HC IgGs-treated neurons showed a characteristic ramp-and-delay profile preceding the evoked spike, strikingly observed at rheobase current (Figure 2A). This feature also found in untreated control neurons was characterized as the hallmark of fast-activating slow offset conductance of the D-type current carried by the voltage-gated potassium Kv1 channel

(R. H. Cudmore et al., 2010; Seagar et al., 2017). Interestingly, this profile was replaced by a rapid depolarization eliciting the first spike in CA3 neurons treated with the LRR-mAb (Figure 2A). To evaluate this difference, we measured the latency to the first spike. CA3 neurons treated with the LRR-mAb showed a reduced first spike latency compared to HC IgGs treated neurons (494 ± 42 ms $n = 14$ vs 728 ± 43 ms $n = 13$, Mann-Whitney, $p = 0.001$; Figure 2A) without significant difference between neurons treated with HC IgGs or EPTP-mAb (728 ± 43 ms $n = 13$ vs. 762 ± 57 ms $n = 12$, Mann-Whitney, ns; Figure 2A).

Based on these findings, we asked whether changes in the D-type potassium current could account for the change in intrinsic excitability by measuring the sensitivity to DTx-k after LRR-mAb treatment. In contrast to HC IgG treated neurons (rheobase = 107 ± 10 pA vs. 58 ± 6 pA $n = 7$, Wilcoxon, $p = 0.016$; Figure 2B), or neurons treated with the EPTP-mAb (rheobase = 115 ± 23 pA vs. 63 ± 12 pA $n = 9$, Wilcoxon, $p = 0.009$; data not shown) which displayed a robust decrease in rheobase after bath application of DTx-k, a modestly significant effect of DTx-k was observed in neurons treated with the LRR-mAb (74 ± 11 pA vs. 61 ± 8 pA $n = 8$, Wilcoxon, $p = 0.035$; Figure 2B). Moreover, bath application of DTx-k induced a loss of the ramp-and-delay phenotype only in neurons treated with HC IgGs whereas no difference was observed in neurons treated with the LRR-mAb (Figure 2B). Taken together, these data suggest that the increase of intrinsic excitability measured in CA3 neurons treated with the LRR-mAb may be mediated by a reduction of D-type current. To confirm this, we calculated the effect of LRR-mAb on sensitivity to DTx-k with the rheobase difference before and after adding DTx-k. Whereas no significant difference was observed between neurons treated with HC IgGs or EPTP-mAb (49 ± 8 pA $n = 7$ vs. 52 ± 16 pA $n = 9$ respectively, Wilcoxon, $p = 0.56$; data not shown), we found a 5 fold decrease in rheobase difference in neurons treated with the LRR-mAb compared to HC IgGs (14 ± 5 pA $n = 8$ vs. 49 ± 8 pA $n = 7$, respectively Mann-Whitney, $p = 0.003$; Figure 2B). These data confirm that a loss of a D-type current induced by the LRR-mAb contributes significantly to the observed increase in intrinsic excitability.

Discussion

In our study, we investigated whether two patients-derived mAbs directed against different epitopes on LGI1 perturb neuronal excitability. From rat hippocampal organotypic cultures, input-output curves and rheobase currents showed an increase in intrinsic excitability after application of the LRR-mAb but not with the EPTP-mAb. Further, treatment with the LRR-mAb, but not the EPTP-mAb, prevented the effect of DTX-k, a blocker of the Kv1.1 voltage-gated potassium channel. LRR-mAbs have been shown to promote LGI1-ADAM complex internalisation (Ramberger et al., 2020) which may lead to a reduction in Kv1 channel expression at the cell membrane. This mechanism is supported by genetic deletion of LGI1 which decreases Kv1.1 density and D-type currents by more than 50% (Seagar et al., 2017). This decrease in D-type currents is likely to increase neuronal excitability.

The molecular mechanism by which EPTP-mAbs mediate their effect is likely to occur through the prevention of LGI1 binding to its native receptors. Very weak binding of anti-EPTP mAbs to human LGI1 expressed with ADAM22/ADAM23 in HEK293T and rat hippocampal cultures or on mouse brain sections has been reported (Kornau et al., 2020; Ramberger et al., 2020). Even if differences in peptide sequences between rat LGI1 and its human homologue could determine the ability of the antibody to have a functional effect, a lack of epitope availability by a competition between EPTP antibodies and ADAM22/ADAM23 in these systems could be an hypothesis to explore (Ohkawa et al., 2013; Ramberger et al., 2020). In our study, EPTP epitope of endogenous LGI1 could be occupied by its receptors which could prevent EPTP-mAb to have a functional effect. Further experiments are needed to elucidate these questions.

Acknowledgments:

This work was supported by INSERM, CNRS, ANR (ANR-17-CE16-0022 LoGiK to DD and OEF).

Author contribution:

OEF, MR and DD designed research; JE performed the experiments; SI provided the antibodies; JE, DD & MR analysed the data; JE, DD, OEF & MR wrote the paper, which was approved by all the authors.

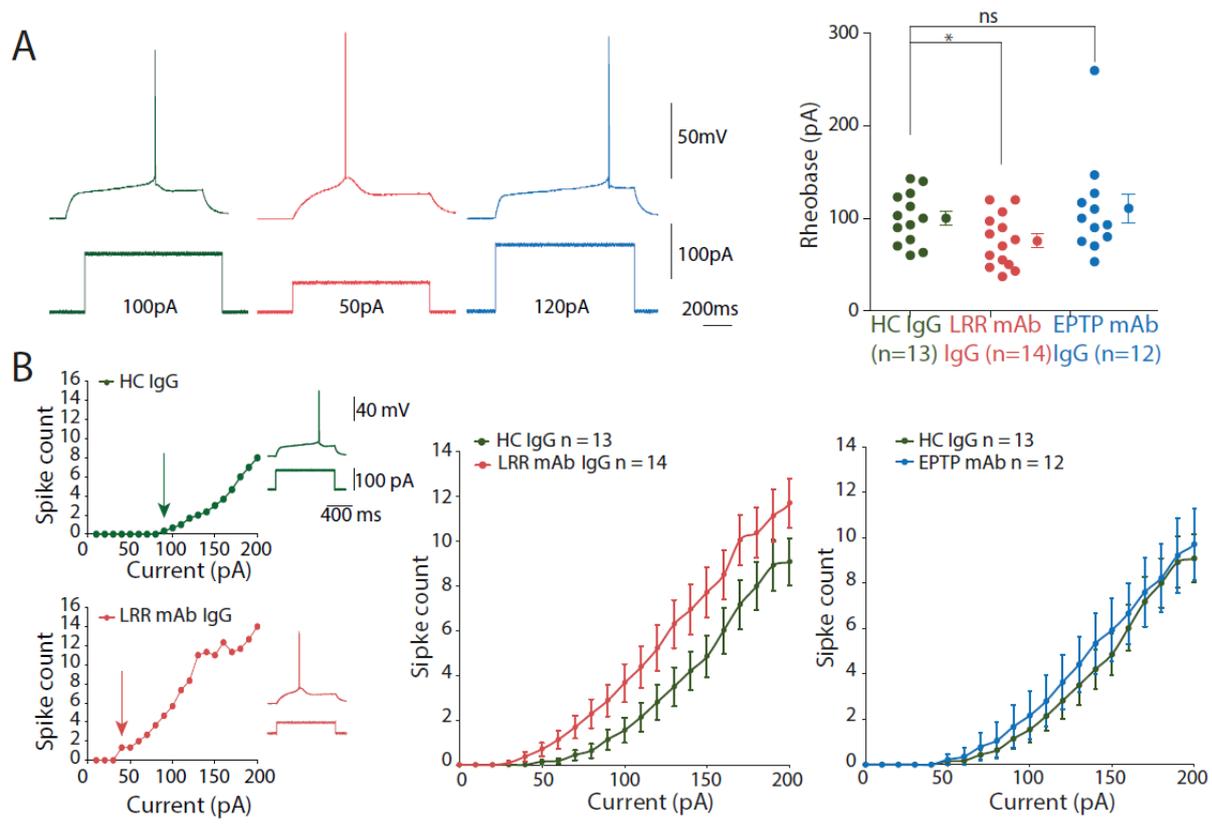


Fig. 1 Application of patient-derived LRR-mAb increases intrinsic excitability of hippocampal CA3 neurons. (A, Left) Traces illustrate the rheobase current of neurons from rat hippocampal organotypic cultures treated with the HC IgGs (green), LRR-mAb (red) and EPTP-mAb (blue). (A, Right) Graph of rheobase current is represented with the mean value for each condition. (B, Left) Input-output curves showing the number of spikes according to depolarising current increments and corresponding traces of representative neurons treated with the HC IgG (Top) and LRR-mAb (Bottom) recorded in current clamp. The rheobase is indicated by arrows and illustrated by the traces. (B, Right) Averaged input-output curves of the two mAbs are compared to control IgGs. Error bars represent SEM. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test (graph A) and significance was obtained at $P < 0.05$.

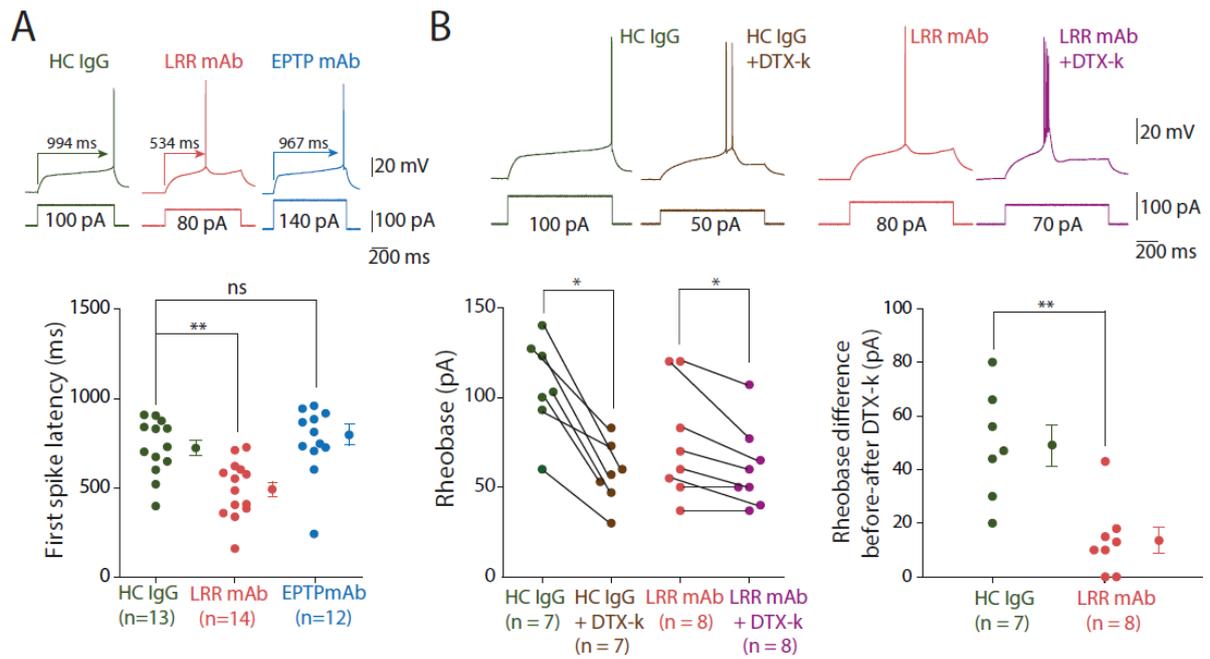


Fig. 2 LRR-mAb-mediated increase of intrinsic excitability in hippocampal CA3 neurons is induced by a decrease of D-type current. (A) The latency to the first spike is illustrated by the traces at the rheobase current and values are reported in the graph for neurons treated with HC IgGs (green), LRR-mAb (red) and EPTP-mAb (blue). (B, Left) Graph and traces shows the rheobase current before and after bath application of DTX-k (100 nM) after HC IgGs treatment (green and brown) and after LRR-mAb treatment (red and purple). (B, Right) Graph highlighting the effect of DTX-k by the subtraction of the rheobase after adding DTX-k to the rheobase before DTX-k, after each antibody treatment. Error bars represent SEM. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test (A and B Right) and the Wilcoxon rank-signed test (B Left) and significance was obtained at $P < 0.05$.

References:

- Aurangzeb, S., Symmonds, M., Knight, R., Kennett, R., Wehner, T., Irani, S., 2017. LGII-antibody encephalitis is characterised by frequent, multifocal clinical and subclinical seizures. *Seizure* 50. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2017.05.017>
- 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. *Journal of Neuroscience* 30, 12885–12895. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0740-10.2010>
- Debanne, D., Boudkkazi, S., Campanac, E., Cudmore, R.H., Giraud, P., Fronzaroli-Molinieres, L., Carlier, E., Caillard, O., 2008. Paired-recordings from synaptically coupled cortical and hippocampal neurons in acute and cultured brain slices. *Nat Protoc* 3, 1559–1568. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.147>
- Irani, S.R., Michell, A.W., Lang, B., Pettingill, P., Waters, P., Johnson, M.R., Schott, J.M., Armstrong, R.J.E., S. Zagami, A., Bleasel, A., Somerville, E.R., Smith, S.M.J., Vincent, A., 2011. Faciobrachial dystonic seizures precede Lgi1 antibody limbic encephalitis. *Ann Neurol*. 69, 892–900. <https://doi.org/10.1002/ana.22307>
- Kornau, H.-C., Kreye, J., Stumpf, A., Fukata, Y., Parthier, D., Sammons, R.P., Imbrosci, B., Kurpjuweit, S., Kowski, A.B., Fukata, M., Prüss, H., Schmitz, D., 2020. Human Cerebrospinal Fluid Monoclonal LGII Autoantibodies Increase Neuronal Excitability. *ANNALS of Neurology* 87, 14.
- Lalic, T., Pettingill, P., Vincent, A., Capogna, M., 2011. Human limbic encephalitis serum enhances hippocampal mossy fiber-CA3 pyramidal cell synaptic transmission: Limbic Encephalitis in the Hippocampus. *Epilepsia* 52, 121–131. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2010.02756.x>
- Ohkawa, T., Fukata, Y., Yamasaki, M., Miyazaki, T., Yokoi, N., Takashima, H., Watanabe, M., Watanabe, O., Fukata, M., 2013. Autoantibodies to Epilepsy-Related LGII in Limbic Encephalitis Neutralize LGII-ADAM22 Interaction and Reduce Synaptic AMPA Receptors. *Journal of Neuroscience* 33, 18161–18174. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3506-13.2013>
- Petit-Pedrol, M., Sell, J., Planagumà, J., Mannara, F., Radosevic, M., Haselmann, H., Ceanga, M., Sabater, L., Spatola, M., Soto, D., Gasull, X., Dalmau, J., Geis, C., 2018. LGII antibodies alter Kv1.1 and AMPA receptors changing synaptic excitability, plasticity and memory. *Brain*. <https://doi.org/10.1093/brain/awy253>
- Rama, S., Zbili, M., Fékété, A., Tapia, M., Benitez, M.J., Boumedine, N., Garrido, J.J., Debanne, D., 2017. The role of axonal Kv1 channels in CA3 pyramidal cell excitability. *Sci Rep* 7, 315. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00388-1>
- Ramberger, M., Berretta, A., Tan, J.M.M., Sun, B., Michael, S., Yeo, T., Theorell, J., Bashford-Rogers, R., Paneva, S., O'Dowd, V., Dedi, N., Topia, S., Griffin, R., Ramirez-Franco, J., El Far, O., Baulac, S., Leite, M.I., Sen, A., Jeans, A., McMillan, D., Marshall, D., Anthony, D., Lightwood, D., Waters, P., Irani, S.R., 2020. Distinctive binding properties of human monoclonal LGII autoantibodies determine pathogenic mechanisms. *Brain* 143, 1731–1745. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa104>

Schulte, U., Thumfart, J.-O., Klöcker, N., Sailer, C.A., Bildl, W., Biniossek, M., Dehn, D., Deller, T., Eble, S., Abbass, K., Wangler, T., Knaus, H.-G., Fakler, B., 2006. The Epilepsy-Linked Lgi1 Protein Assembles into Presynaptic Kv1 Channels and Inhibits Inactivation by Kv β 1. *Neuron* 49, 697–706. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.01.033>

Seagar, M., Russier, M., Caillard, O., Maulet, Y., Fronzaroli-Molinieres, L., De San Feliciano, M., Boumedine-Guignon, N., Rodriguez, L., Zbili, M., Usseglio, F., Formisano-Tréziny, C., Youssouf, F., Sangiardi, M., Boillot, M., Baulac, S., Benitez, M.J., Garrido, J.-J., Debanne, D., El Far, O., 2017. LGI1 tunes intrinsic excitability by regulating the density of axonal Kv1 channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, 7719–7724. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618656114>

Thompson, J., Bi, M., Murchison, A.G., Makuch, M., Bien, C.G., Chu, K., Farooque, P., Gelfand, J.M., Geschwind, M.D., Hirsch, L.J., Somerville, E., Lang, B., Vincent, A., Leite, M.I., Waters, P., Irani, S.R., Faciobrachial Dystonic Seizures Study Group, Dogan-Onugoren, M., Rae-Grant, A., Illes, Z., Szots, M., Malter, M., Widman, G., Surges, R., Archibald, N., Reid, J., Duncan, C., Richardson, A., Lilleker, J., Iorio, R., Blaabjerg, M., Abeler, K., Shin, Y., 2018. The importance of early immunotherapy in patients with faciobrachial dystonic seizures. *Brain* 141, 348–356. <https://doi.org/10.1093/brain/awx323>

Yamagata, A., Fukai, S., 2020. Insights into the mechanisms of epilepsy from structural biology of LGI1–ADAM22. *Cell. Mol. Life Sci.* 77, 267–274. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03269-0>

3. Analyse spatiale des mécanismes liés à la régulation des canaux Kv1.1 par LGII

Les deux articles présentés dans ma thèse montrent que LGII contrôle l'excitabilité des neurones de CA3 par la régulation des canaux potassiques comportant la sous-unité Kv1.1. Nos résultats concernant la restauration de l'expression de LGII montrent que la récupération des Kv1.1 fonctionnels à l'AIS est primordiale pour retrouver une excitabilité intrinsèque de type sauvage dans les neurones pyramidaux de CA3. Nous avons ensuite voulu identifier plus largement si LGII favorise l'expression et l'adressage des Kv1.1 fonctionnels le long de l'axone.

Nous avons utilisé la facilitation analogique digitale de la transmission synaptique induite par la dépolarisation (dépolarisation induced analog-digital facilitation, d-ADF ; Zbili and Debanne, 2019) comme outil pour déterminer si l'augmentation de l'excitabilité des neurones KO-Lgi1 de CA3 était due à une perte de fonction des Kv1.1 axonaux et non somato-dendritiques.

En effet, une dépolarisation sous-seuil (jusqu'aux environs de -45mV) de longue durée dans le soma facilite la transmission synaptique entre les cellules pyramidales de CA3 (Bialowas et al., 2015). Cette longue dépolarisation sous-seuil provoque un élargissement du PA dans l'axone due à l'inactivation des Kv1.1, ce qui augmente la libération de glutamate par la terminaison présynaptique. Cette facilitation à court terme est observable pour les connexions locales comme CA3-CA3 et favorisée en fonction la durée de dépolarisation (Rama et al., 2015)

Ainsi, nous avons comparé la réponse synaptique induite par un PA présynaptique après une longue dépolarisation sous seuil du neurone présynaptique avec celle induite par un PA présynaptique déclenché à partir du potentiel de repos, dans les neurones WT et les neurones KO-Lgi1 (**Figure 14**). Sachant que 50% des Kv1.1 restent fonctionnels dans les neurones KO-Lgi1 (Seagar et al., 2017), la d-ADF est toujours possible mais devrait l'être à moins forte échelle que dans les neurones WT.

La d-ADF est potentialisée lorsque la dépolarisation du neurone présynaptique dépasse 6s (Bialowas et al., 2015). Dans le cas présent, j'ai induit une dépolarisation de 10 s avant le déclenchement du PA dans le neurone présynaptique. Pour s'affranchir des changements du seuil des PA régulé par Lgi1, j'ai ajusté la dépolarisation de -50 mV à -45 mV. Dans chaque cas, j'ai fait en sorte de toujours garder une amplitude de dépolarisation de 25mV.

Les enregistrements de paires de neurones WT montrent une augmentation de la réponse post-synaptique lorsque le PA présynaptique est évoqué après la dépolarisation de 10 s (WT = $115.3 \pm 4.9 \%$ n = 12 ; **Figure 15**). Cette facilitation de la transmission synaptique n'est pas observée dans les paires de neurones KO-Lgi1 (KO = $100.3 \pm 8.9 \%$ n = 12 ; **Figure 15**). Bien que la différence ne soit pas significative entre les EPSC normalisés KO et WT compte tenu de la variabilité et du faible effectif des paires de neurones enregistrés, il semble se dégager une tendance qui suggérerait un blocage de la d-ADF par une perte de fonction des canaux Kv1 axonaux dans les neurones KO-Lgi1

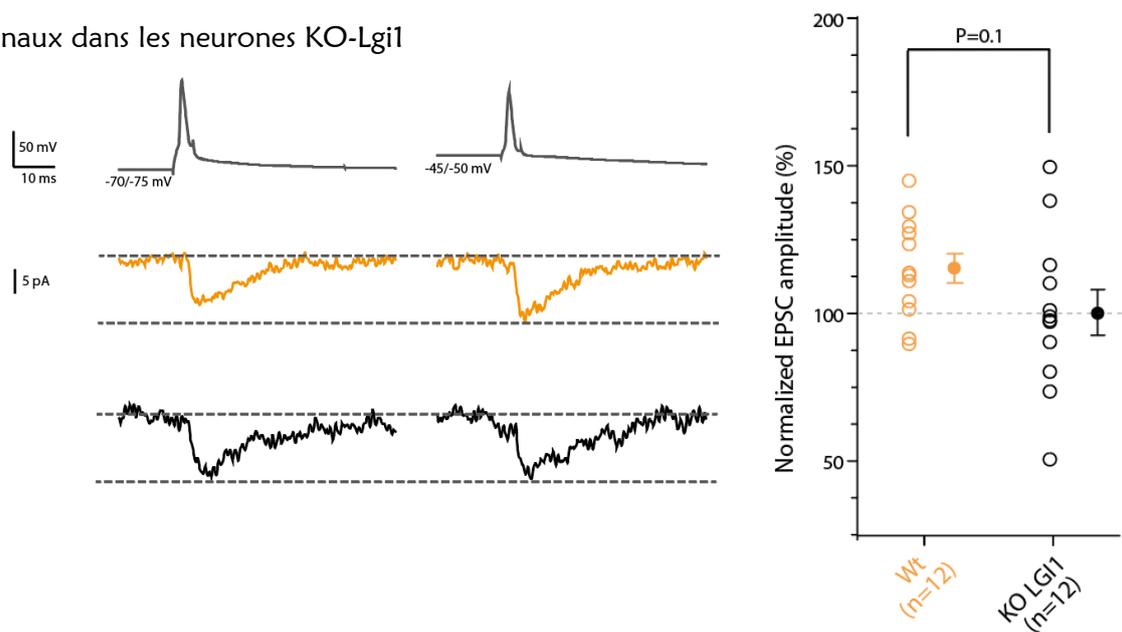


Figure 15. Facilitation analogue digitale de la transmission synaptique induite par la dépolarisation dans les paires de neurones WT et KO-Lgi1. Traces représentatives du PA évoqué en courant imposé dans le neurone présynaptique (haut, gauche) au potentiel de repos (-70/-75 mV) et après une dépolarisation de 10 s (-45/-50 mV) avec les réponses post-synaptiques d'un neurone WT (jaune) et d'un neurone KO-Lgi1 (noir). Le graphique prend en compte les valeurs d'amplitude des EPSC évoqués après la longue dépolarisation sous-seuil du neurone présynaptique en pourcentage de celle des EPSC évoqués par un PA présynaptique à partir du potentiel de repos (droite).

Au cours des enregistrements, l'absence de bloqueurs synaptiques a révélé la présence d'activités épileptiformes dans les cultures organotypiques (**Figure 16 et 17**). Ce phénomène est initié par une bouffée de PA spontanés à fréquence élevée dont l'amplitude diminue progressivement. Après cette bouffée de PA, les neurones restent fortement dépolarisés (**Figure 16**). L'activité épileptiforme peut durer de 3 s à 10 s, puis le potentiel de membrane retourne à des valeurs hyperpolarisées (-80 mV-100 mV) et atteint progressivement son potentiel de repos.

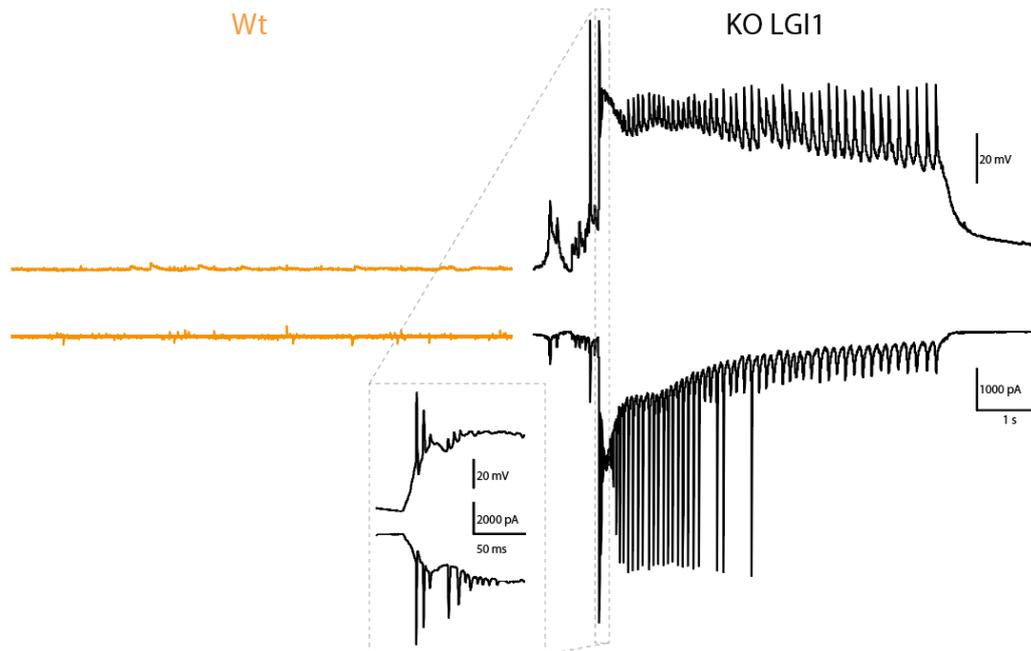


Figure 16. Activités épileptiformes enregistrées dans les neurones WT et KO-Lgi1. Un exemple représentatif de traces électrophysiologiques de l'enregistrement du potentiel de membrane (en haut) et du courant transmembranaire (en bas) en absence de toute stimulation des neurones WT (jaune) et KO (noir). Les traces présentes dans le cadre correspondent aux premières 100 ms de l'activité épileptiforme dans le neurone pré- et post- synaptique KO-Lgi1.

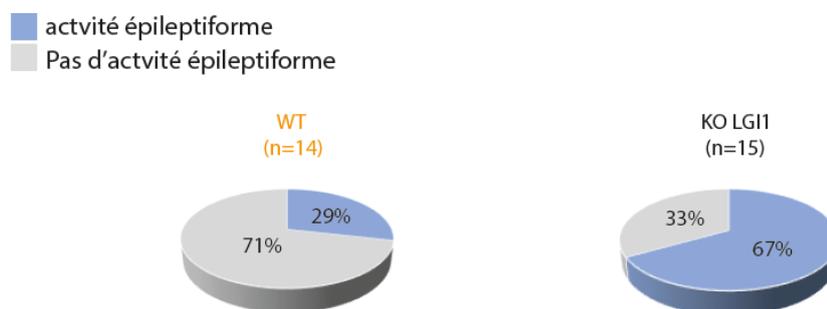


Figure 17. Pourcentage de neurones exprimant de l'activité épileptiforme dans les paires de neurones WT et les paires de neurones KO.

Cette activité épileptiforme a été retrouvée dans 29% des paires de neurones WT et 67% des paires de neurones KO-Lgi1 (**Figure 17**).

L'absence d'activité épileptiforme dans 33% des neurones KO-Lgi1 (**Figure 17**) et la forte variabilité des résultats (**Figure 16**) m'ont conduit à m'interroger sur l'homogénéité de la régulation de l'expression des canaux Kv1.1 par LGI1 le long de l'axe dorso-ventral de l'hippocampe. J'ai donc évalué la contribution des canaux Kv1.1 à la modulation de l'excitabilité intrinsèque dans l'hippocampe dorsal et ventral de neurones de CA3 WT et KO-Lgi1. Pour cela, les tranches d'hippocampes ont été triées le jour de la mise en culture et la morphologie de la structure a été vérifiée visuellement.

L'étude de l'excitabilité le long de l'axe dorso-ventral de l'hippocampe a récemment été étudié dans les neurones de CA3 issus de tranches aigües d'hippocampe (Sun et al., 2020). Dans cette étude, CA3 est partagée en 3 subdivisions selon l'axe proximo-distal de l'hippocampe. L'analyse des courbes E/S a démontré une augmentation d'excitabilité des neurones de CA3c et CA3b dorsal par rapport au versant ventral de l'hippocampe (**Figure 18**). Au cours de mes expériences, j'ai sélectionné les neurones de façon hétérogène dans la zone CA3b et la zone CA3a dans chaque catégorie pour les enregistrements.

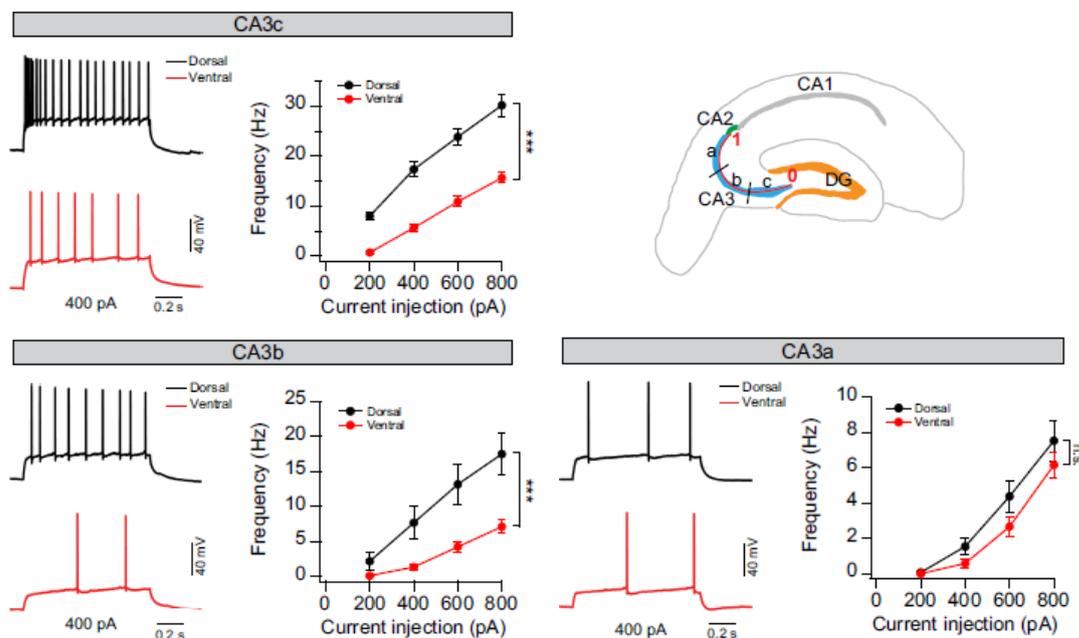


Figure 18. L'excitabilité des neurones pyramidaux de CA3 est augmentée dans l'hippocampe dorsal par rapport à l'hippocampe ventrale. Les courbes E/S et le profil de décharge des neurones dans la partie dorsal (noir) et la partie ventrale (rouge) de l'hippocampe ont été obtenu pour CA3a, CA3b et CA3c. (Sun et al., 2020)

L'analyse de mes résultats a montré qu'il n'y a pas de différence significative entre les courbes E/S des neurones WT dorsaux (WT D) et des neurones WT ventraux (WT V) ni dans les mesures de rhéobase (WT D = 117.2 ± 18.6 pA n = 9 vs WT V 127.4 ± 15.1 pA n = 11, $p=0.27$; **Figure 19**). Bien qu'une tendance suggère une augmentation de l'excitabilité intrinsèque dans les neurones WT D, je n'ai pas retrouvé l'hétérogénéité de l'excitabilité intrinsèque le long de l'axe dorso-ventral observée dans l'étude de Sun et al., 2020.

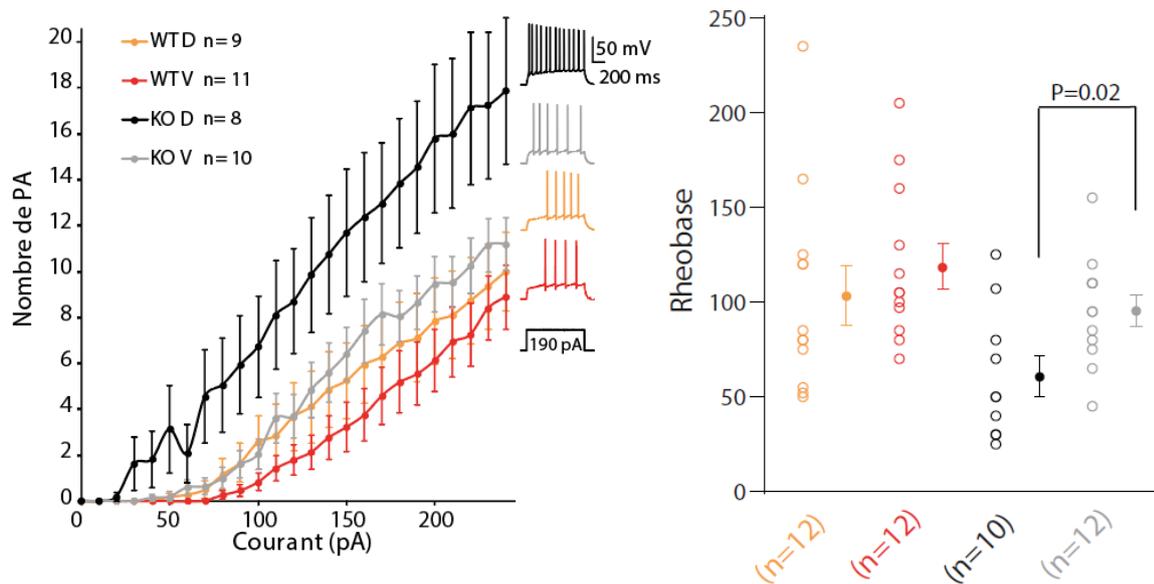


Figure 19. Excitabilité des neurones WT et KO-Lgil selon l'axe dorso-ventral. Courbes E/S (gauche) représentant le nombre de PA en fonction de créneaux de courant dépolarisant croissant dans les neurones WT dorsaux (jaune) et ventraux (rouge) et les neurones KO dorsaux (noir) et ventraux (gris). Rhéobase (droite).

De façon surprenante, la courbe E/S obtenue pour les neurones KO dorsaux (KO D) est décalée vers la gauche par rapport aux neurones WT D et WT V mais également par rapport aux neurones KO ventraux (KO V) (**Figure 19**). Comme attendu, la rhéobase des KO D est significativement plus faible par rapport aux WT D (KO D = 67.1 ± 12.6 pA n = 10 vs WT D = 117.2 ± 18.6 pA n = 12, $p=0.02$) et par rapport aux WT V (WT V = 127.4 ± 15.1 pA n = 12, $p=0.003$) (**Figure 19**). Cependant, la rhéobase des neurones KO V n'est pas significativement différente de celle des neurones WT V (KO V = 91.5 ± 9.4 pA n = 12 vs WT V = 127.4 ± 15.1

pA n = 12, p=0.19), et de celle des WT D (WT D = 117.2 ± 18.6 pA n = 12, p=0.97), mais une diminution significative de la rhéobase de KO D par rapport au KO V est observable (KO D = 67.1 ± 12.6 pA n = 10 vs KO V = 91.5 ± 9.4 pA n = 12, p= 0.02) (**Figure 5**). Ensemble, ces données montrent que l'augmentation d'excitabilité intrinsèque des neurones KO comparée aux neurones WT déjà démontrée (Seagar et al., 2017) est seulement observable dans la partie dorsale de l'hippocampe mais pas dans la partie ventrale.

Nous avons donc examiné la contribution du courant I_D porté par les Kv1.1 dans la différence d'excitabilité intrinsèque observée selon l'axe dorso-ventral des neurones KO-Lgi1.

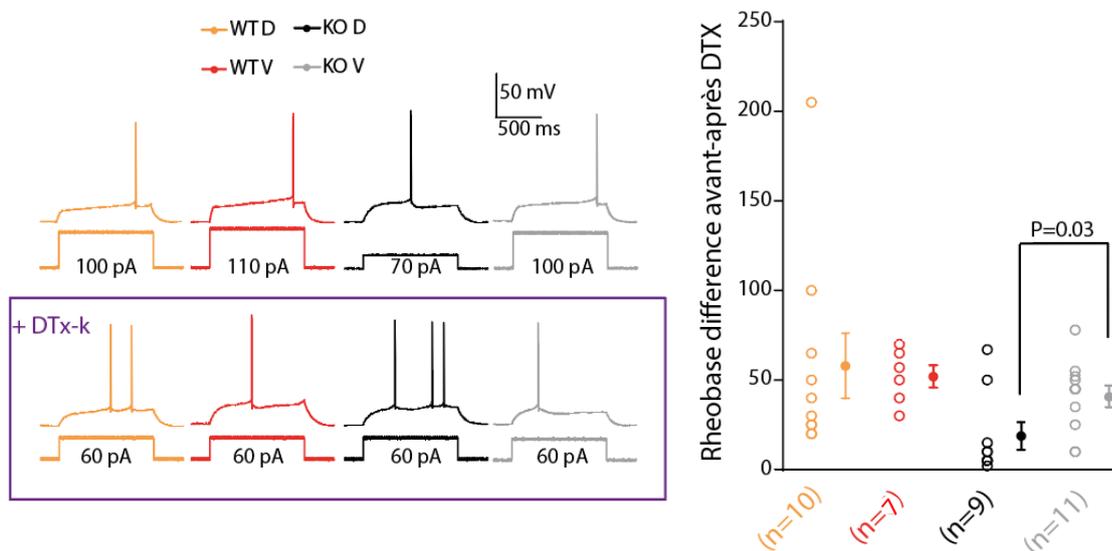


Figure 20. Figure 6 : Sensibilité à la DTx-k des neurones WT et KO-Lgi1 selon l'axe dorso-ventral. Traces représentatives (gauche) des neurones WT dorsaux (jaune) et ventraux (rouge) et des neurones KO dorsaux (noir) et ventraux (gris). Différence de rhéobase avant-après application de DTx-k dans la chambre d'enregistrement (droite).

Pour cela, nous avons évalué la sensibilité à la DTx-k dans les neurones WT D, WT V, KO D et KO V. En effet, la différence de rhéobase avant-après application de DTx-K sur les cultures organotypiques est similaire entre les neurones WT D et les neurones WT V (WT D = 58±18.1 pA n = 10 vs WT V = 54.6±5.8 pA n = 7, p=0.35 ; **Figure 20**). Cependant, la sensibilité à la DTx-k dans les neurones KO V est significativement plus élevée par rapport au KO D (KO V = 40.9±6 pA n = 11 vs KO D = 18.8±7.7 pA n = 9, p=0.03 ; **Figure 20**) et pas significativement

différente des WT V (WT V = 54.6 ± 5.8 pA n = 7, $p=0.26$; **Figure 20**) et des WT D (WT D = 58 ± 18.1 pA n = 10, $p=0.99$; **Figure 20**) suggérant la présence persistante de Kv1.1 fonctionnels dans les neurones KO V contrairement à une nette réduction dans les neurones KO D.

Ces résultats suggèrent que LGI1 contrôle l'excitabilité des neurones de CA3 par la régulation de l'expression de Kv1.1 fonctionnels dans la partie dorsale mais pas dans la partie ventrale de l'hippocampe.

Globalement, mes résultats montrent une restauration de l'excitabilité dans les neurones de souris KO-Lgi1 électroporés avec un gène codant pour la LGI1 en régulant l'expression des canaux Kv1.1 à l' AIS des neurones de CA3. LGI1 affecte également l'excitabilité intrinsèque des neurones adjacents des neurones électroporés. J'ai observé une augmentation d'excitabilité intrinsèque des neurones de CA3 de rat dans les cultures organotypiques traitées avec un anticorps anti-LRR mais pas dans celles traitées avec un anticorps anti-EPTP. L'inactivation des Kv1.1 par une dépolarisation de 10 s dans les neurones présynaptiques, facilite la réponse post-synaptique dans les neurones WT mais pas dans les neurones KO. En cohérence avec une diminution des Kv1.1 fonctionnels dans l'axone, et d'une excitabilité augmentée des neurones KO de l'aire CA3, la majorité des neurones présentent de l'activité épileptiforme. Finalement, le mode d'action de LGI1 dans la régulation de l'excitabilité intrinsèque des neurones de CA3 s'est révélé hétérogène selon l'axe dorso-ventral.

Discussion

Comprendre les mécanismes qui induisent des phénotypes épileptiques lors de la perte de fonction de LGI1 par mutation génétique chez les patients ADLTE ou via son blocage par des auto-anticorps de patient LE, est crucial pour déterminer de nouvelles options thérapeutiques. L'implication de LGI1 dans ces pathologies a souvent fait l'objet de recherches dans la perturbation des mécanismes de maturation du réseau neuronal (Owuor et al., 2009; Thomas et al., 2018; Zhou et al., 2009) ou de régulation de la force synaptique dans l'hippocampe (Boillot et al., 2016; Fukata et al., 2010, 2006; Yuko Fukata et al., 2021). Ces dernières années, la découverte du rôle de LGI1 dans le contrôle de l'excitabilité des neurones pyramidaux de CA3 dans l'hippocampe (Seagar et al., 2017) et des neurones pyramidaux du cortex (Zhou et al., 2018) par la régulation de canaux potassique Kv1 contenant la sous-unité Kv1.1 et Kv1.2 a été une avancée primordiale pour comprendre comment le réseau neuronal peut développer une activité anarchique à l'origine des crises d'épilepsie dans l'ADLTE. Ainsi, la restauration de l'expression des Kv1.2 dans les neurones pyramidaux du cortex comme cible thérapeutique pour empêcher l'occurrence des crises épileptiques d'un modèle murin ADLTE a fait ses preuves en prolongeant l'espérance de vie de l'animal (Zhou et al., 2018). Dans nos études, nous nous sommes focalisés sur la modulation de l'expression et de l'adressage des canaux Kv1.1 par LGI1 pour comprendre comment une dérégulation peut induire des changements d'excitabilité associé à un phénotype épileptique. Dans cette partie je discuterai de mes résultats qui ont permis de déceler de nouvelles caractéristiques du mode d'action de LGI1 dans la régulation de l'excitabilité.

1. Restauration du phénotype électrophysiologique de type sauvage

Des expériences de type « rescue » selon le terme anglais, permettent le sauvetage de l'expression d'une protéine par l'utilisation de techniques de transfections adaptées dans un modèle animal d'un génotype dépourvu du gène codant pour cette protéine. Ce mode de recherche est intéressant pour clarifier le rôle de la protéine d'intérêt.

Au cours de son étude, LGI1 a fait l'objet de multiples expériences de sauvetage qui ont permis de :

- Découvrir des propriétés propres à LGI1 nécessaires à l'absence de conséquences pathologiques liées à l'ADLTE telle que l'importance de son interaction avec ADAM22 (Fukata et al., 2010)
- Identifier une nouvelle mutation de LGI1 (Feng et al., 2019)
- Comprendre comment LGI1 est impliquée dans la neurotransmission médiée par les récepteurs AMPA et NMDA dans l'hippocampe (Lovero et al., 2015)

Par contre, aucune expérience de sauvetage n'avait été utilisée pour comprendre le rôle de LGI1 dans le contrôle de l'excitabilité intrinsèque.

Dans notre étude, nous avons restauré l'expression de LGI1 dans les neurones pyramidaux de CA3 dans des cultures organotypiques d'hippocampe de souris KO-Lgi1. La technique d'électroporation sur cellule unique nous a permis de choisir spécifiquement les neurones cibles pour la restauration de LGI1. Ainsi, cette restauration a permis de retrouver une excitabilité intrinsèque de type sauvage dans les neurones de CA3 de souris KO-Lgi1 en restaurant le courant I_D porté par les Kv1.1 et la réexpression de cette sous-unité à l'AIS.

Il a déjà été proposé que LGI1 participerait au processus d'adressage ou de recyclage des canaux Kv1.1 et Kv1.2 puisque leurs transcrits ARNm sont augmentés dans les souris KO-Lgi1 (Seagar et al., 2017). LGI1 aurait également un rôle de régulation de la cinétique du courant I_D en ralentissant l'inactivation du canal potassique Kv1.1/Kv1.4 (Schulte et al., 2006). La restauration de l'excitabilité intrinsèque par la récupération totale de l'expression du courant I_D que nous avons observée dans les neurones KO dans l'aire CA3 après électroporation avec le gène codant pour LGI1, serait davantage en faveur d'une régulation de l'adressage ou du recyclage des Kv1.1 à la membrane des neurones puisque l'expression des Kv1.1 a été restauré dans l'AIS.

La technique de restauration de l'expression de LGI1 permet également de tester l'effet aigu de cette protéine sur l'excitabilité des neurones. En effet, en supprimant l'expression du gène *Lgi1* dans tout le génome dès le stade embryonnaire, il est difficile d'interpréter les conséquences pathologiques sans prendre en compte les effets neurodéveloppementaux. En effet, Il a été montré que la perte de fonction de LGI1 induit des modifications morphologiques des épines dendritiques lors du stade de maturation synaptique et perturbe la croissance et migration axonale (Boillot et al., 2014; Owuor et al., 2009; Zhou et al., 2009). Ces modifications morphologiques pourraient participer à la modulation du phénotype électrophysiologique des neurones touchés dans l'hippocampe. Ici, la restauration aigüe du courant I_b et de l'expression des Kv1.1 à l' AIS par le sauvetage de LGI1 montre que sa régulation dans l'excitabilité intrinsèque est indépendante de modifications neurodéveloppementales.

2. Effet paracrine

La technique d'électroporation sur cellule unique a permis de cibler les neurones de CA3 de façon spécifique non seulement pour l'étude de la restauration de leur phénotype électrophysiologique mais également pour évaluer l'effet paracrine de LGI1 sur la restauration de l'excitabilité de cellules voisines. Il est bien établi que LGI1 est sécrétée par les neurones du SNC et libérée dans la matrice extracellulaire (Fukata et al., 2006; Hivert et al., 2018; Lovero et al., 2015; Senechal et al., 2005). Nous avons observé que l'étendue de sa libération dans le milieu extracellulaire était focalisée autour du neurone électroporé KO/*Lgi1* affectant l'excitabilité intrinsèque et le niveau d'expression des Kv1.1 de cellules voisines. L'effet observé était partiel, suggérant que la LGI1 sécrétée n'était pas capable de restaurer la totalité du phénotype électrophysiologique.

L'effet paracrine de LGI1 sur la régulation de la réponse synaptique a déjà été évalué (Lovero et al., 2015). L'expression des récepteurs AMPA/NMDA a été restaurée dans les neurones adjacents mais pas dans les neurones transfectés avec un gène codant pour LGI1. De façon

surprenante, cette restauration était possible dans CA1 après injection d'un lentivirus permettant l'expression de LGI1 dans CA3. Ces résultats montrent un effet paracrine de LGI1 sur la transmission synaptique pour de longues distances. Au contraire, notre étude ne montre pas d'effet paracrine de LGI1 sur l'excitabilité intrinsèque des neurones enregistrés à plus de 200 μm des neurones KO/Lgi1 dans CA3. Dans l'étude de Lovero et al., l'étendue de sécrétion de LGI1 n'a pas été évaluée, mais il n'est pas à exclure que la modulation observée au niveau post-synaptique dans CA1 soit le résultat d'une restauration de l'excitabilité du neurone présynaptique dans CA3. En effet, la diminution du ratio des récepteurs AMPA/NMDA dans les neurones KO-Lgi1 (Fukata et al., 2010) pourrait résulter d'une régulation homéostatique (Petit-Pedrol et al., 2018; Seagar et al., 2017).

Finalement, l'étude de l'immunomarquage de la D₂-LGI1 sécrétée a montré une forte concentration au niveau des AIS des neurones KO/D₂-Lgi1 et des AIS des neurones voisins. Ces résultats suggèrent que l'affinité de LGI1 à ses récepteurs présents à l'AIS est plus élevée que celle dans les autres compartiments neuronaux. Cette hypothèse conforte l'implication de LGI1 dans la restauration de l'expression des Kv1.1 spécifiquement dans l'AIS pour réguler l'excitabilité intrinsèque des neurones de CA3.

3. Anticorps de patients atteints de LE

L'encéphalite limbique associée aux auto-anticorps anti-LGI1 partage des similitudes phénotypiques avec l'ADLTE telle que l'activité épileptiforme dans les neurones de l'hippocampe (Chabrol et al., 2010a; Lalic et al., 2011). L'effet de la perte de fonction de LGI1 par l'action d'anticorps ou par mutation dans les perturbations de la transmission synaptique et la dérégulation d'expression des récepteurs AMPA et des canaux Kv1 semblent également commun (Fukata et al., 2010 ; Petit-Pedrol et al., 2018). Découvrir l'implication des domaines spécifiques de LGI1 dans les conséquences pathologiques induits par des anticorps de patient LE peut également permettre de comprendre les mécanismes associés à l'ADLTE

Afin d'identifier le mode d'action des anticorps monoclonaux dans la LE, j'ai évalué l'effet fonctionnel d'un anticorps anti-LRR et d'un anticorps anti-EPTP dans les neurones de CA3. Lors de l'élaboration du protocole, nous avons pris en compte que le temps d'application avec les anticorps anti-LGI1 peut faire varier les conséquences phénotypiques, puisque chez le patient LE, des troubles cognitifs suivent la survenue des FBDS (Thompson et al., 2018). Nous avons ainsi décidé de traiter les cultures organotypiques avec les anticorps de façon chronique pendant 4 jours pour maximiser leurs effets et favoriser le turnover des récepteurs ADAM22, pouvant masquer le site d'interaction des anticorps anti-EPTP (Ramberger et al., 2020). J'ai observé une augmentation de l'excitabilité intrinsèque corrélée à une diminution de la sensibilité à la DTx-k dans les neurones traités avec l'anticorps anti-LRR mais pas avec l'anticorps anti-EPTP. Il serait possible que l'application chronique des anticorps ne soit pas suffisante pour rendre l'épitope de LGI1 disponible pour les anticorps anti-EPTP, si l'induction d'un effet fonctionnel dépend d'une compétition entre ADAM22 et les anticorps anti-EPTP.

4. Analyse spatiale des mécanismes liés à la régulation des canaux Kv1.1 par LGI1

J'ai vérifié si la d-ADF était occlue par la perte de fonction de canaux Kv1.1 axonaux dans les neurones KO-Lgi1. Les résultats ont révélé une forte variabilité dans les neurones KO-Lgi1, qui n'a pas été observée dans les neurones WT. Cette variabilité pourrait être la conséquence de la diversité d'expression des Kv1.1 selon les neurones choisis puisqu'environ 50% des canaux Kv1.1 restant sont encore exprimés dans les neurones KO-Lgi1.

De façon intéressante, l'analyse par immunofluorescence de l'expression de LGI1 endogène dans les souris WT montre l'existence d'un gradient dorso-ventral avec une expression environ 50% fois plus faible dans l'hippocampe ventral (Jorge Ramirez-Franco et al., en préparation). De plus, l'hétérogénéité morphologique et fonctionnelle des cellules de CA3 (Sun et al., 2020; Witter, 2007) engage à reconsidérer la manière d'interpréter les résultats

initialement obtenus sans classification dorso-ventrale des neurones. Comme l'expression des canaux Kv1.1 est régulée par LGI1 dans les neurones de CA3, la variation d'expression de LGI1 dans l'hippocampe m'a conduit à vérifier l'hypothèse d'une hétérogénéité d'expression des canaux Kv1.1 dans les neurones KO-Lgi1 selon l'axe dorso-ventral.

Contrairement à ce qui a été observé précédemment (Sun et al., 2020), je n'ai pas obtenu de différence d'excitabilité intrinsèque entre les neurones WT ventraux et les neurones WT dorsaux. Les conditions expérimentales tels que l'âge plus avancé des souris, le tri cellulaire selon les subdivisions CA3a, CA3b et CA3c, et l'absence de bloqueurs synaptiques dans cette étude de Sun et al., pourrait expliquer cette différence.

Dans les neurones KO dorsaux, la délétion de Lgi1 induit une augmentation de l'excitabilité intrinsèque corrélée à une diminution de la sensibilité à la DTx-k par rapport aux neurones WT dorsaux et ventraux, conformément à l'expression élevée de LGI1 dans l'hippocampe dorsal. Cependant, la perte de la faible concentration de LGI1 dans l'hippocampe ventral n'affecte pas l'excitabilité intrinsèque. De plus, la sensibilité à la DTx-k des neurones KO ventraux est équivalente à celle des neurones WT, suggérant que les canaux Kv1.1 contrôlant l'excitabilité ne sont pas régulés par LGI1 dans les neurones CA3 de l'hippocampe ventral.

Perspectives

1. Anticorps monoclonaux anti-EPTP

Les mécanismes par lesquels les auto-anticorps de patient LE anti-LRR bloquent la fonction de LGI1 et induisent des conséquences pathologiques ont récemment été élucidés. Ces anticorps favoriseraient l'internalisation du complexe LGI1-ADAM22 (Ramberger et al., 2020). Au contraire, le mode d'action des anticorps anti-EPTP soulève encore des questionnements. Notamment, il est difficile de concevoir que ces anticorps puissent avoir un effet pathologique, sachant que les mAb anti-EPTP ne se fixent pas à LGI1-ADAM22/ADAM23 dans les cultures d'hippocampe, les systèmes hétérologues, et sur des tranches de cerveau de souris (Kornau et al., 2020; Ramberger et al., 2020). Il serait intéressant de confirmer que la compétition de ADAM22 avec les anticorps anti-EPTP déterminerait la capacité de l'anticorps à avoir un effet dans la perturbation de l'excitabilité associée à un phénotype pathologique, expliquant également son absence d'effet *in vitro* et *in vivo*. La pré-incubation de LGI1 soluble avec les anticorps anti-EPTP empêche l'interaction de LGI1 avec ADAM22 et ADAM23 (Ohkawa et al., 2013; Ramberger et al., 2020). Cependant, aucune expérience n'a permis d'explorer si le blocage de LGI1 par les anticorps anti-EPTP avant la fixation de LGI1 à ses récepteurs serait capable d'empêcher une excitabilité neuronale normale.

Une expérience dites de « sauvetage » permettrait de répondre à cette problématique. L'objectif serait de vérifier si l'application d'une protéine LGI1 recombinante pré-incubée avec un anticorps anti-EPTP sur des cultures organotypiques de souris KO-Lgi1 serait capable de restaurer l'excitabilité intrinsèque des neurones de CA3. Comme l'apport exogène de LGI1 par application de LGI1 recombinante sur des cultures organotypique de rat diminue l'excitabilité intrinsèque des neurones de CA3 (Seagar et al., 2017), l'application de LGI1 recombinante non pré-incubée sur les cultures organotypique de souris KO-Lgi1 serait utilisé comme contrôle.

On s'attendrait à avoir une diminution d'excitabilité intrinsèque dans les neurones KO-Lgi1 traités avec la LGI1 non pré-incubée. Au contraire, la LGI1 recombinante pré-incubée avec l'anticorps anti-EPTP serait incapable de moduler l'excitabilité des neurones de CA3 dans les

cultures organotypiques de souris KO-Lgi1, démontrant que les anticorps anti-EPTP peuvent potentiellement avoir un effet fonctionnel responsable de conséquences pathologiques dans le cadre de l'encéphalite limbique.

2. Régulation des canaux Kv1.1 indépendante de LGI1

A ce jour, les profils d'expression de LGI1 et des canaux Kv1.1 le long de l'axe dorso-ventral de l'hippocampe ne sont pas connus. J'ai observé que la régulation des canaux Kv1.1 par LGI1 est hétérogène dans l'hippocampe. De plus, au cours de l'étude de la restauration de LGI1 dans les neurones CA3 KO-Lgi1, j'ai constaté la présence de neurones exprimant un taux élevé d'immunoréactivité des Kv1.1 dans le soma et l'axone (**Figure 21**). Ces neurones émettent leurs prolongements de façon perpendiculaire aux AIS des neurones pyramidaux de la couche moléculaire de l'aire CA3. Dans ce type de neurones qui selon leurs caractéristiques morphologiques, pourraient être associée à des interneurons, il semble que la régulation de l'expression des canaux Kv1.1 soit indépendante de LGI1.

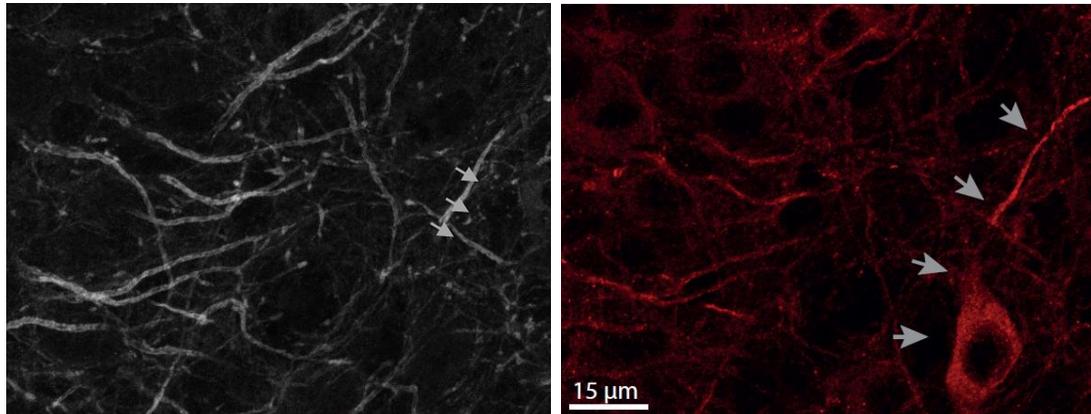


Figure 21. Immunohistochimie d'une culture organotypique de souris KO-Lgi1. Immunomarquage de l'AnkG (gauche) et des canaux Kv1.1 (droite). Les flèches indiquent l'AIS (gauche) et le neurone à expression persistante des Kv1.1 (droite).

L'étude des interneurons GABA dans l'ADLTE indique qu'ils ne sont pas impliqués dans les conséquences pathologiques observées (Boillot et al., 2014). La vérification que les neurones KO-Lgi1 exprimant les canaux Kv1.1 de façon persistante soient des interneurons inhibiteurs GABA permettrait de confirmer que l'expression des Kv1.1 dans les neurones est déterminante pour l'initiation d'un phénotype épileptique associé à l'ADLTE. Une immunohistochimie des

cultures organotypiques de souris KO-Lgi1 évaluant l'immunoréactivité des canaux Kv1.1 et de l'enzyme de synthèse de GABA (GAD : Glutamic Acid Decarboxylase) permettrait de confirmer cette hypothèse.

Il est également possible que la régulation des Kv1.1 dans ces neurones soit identique à celle des neurones pyramidaux de l'aire CA3 dans l'hippocampe ventral. Ainsi, il serait intéressant de déterminer s'il existe une protéine partenaire des canaux Kv1.1 dans ces deux cas de figure, remplaçant la fonction de LGI1 dans la régulation de leur expression.

Cet objectif nécessite l'étude de l'interactome des canaux Kv1.1 dans la partie ventrale et dans la partie dorsale de façon indépendante. L'immunoprécipitation des lysats des parties dorsales et ceux des parties ventrales de l'hippocampe de souris par des anticorps anti-Kv1.1 permettrait de collecter les complexes protéiques associés aux canaux Kv1.1 issus de chaque partie. Les membres des complexes identifiés par spectrométrie de masse seraient comparés entre ceux retrouvés dans la partie dorsale et ceux de la partie ventrale. S'il existe des partenaires protéiques des Kv1.1 retrouvés davantage dans les lysats d'hippocampe ventraux, nous sélectionnerions ceux ayant une classification fonctionnelle cohérente avec un rôle de régulation d'expression des canaux Kv1.1. L'expression de ces protéines serait également évaluée par immunohistochimie dans les neurones pyramidaux de CA3 ventraux et dorsaux et dans les neurones KO-Lgi1 exprimant les Kv1.1 de façon persistante. Un modèle de délétion de ces protéines permettrait ensuite de vérifier leur nécessité pour l'expression des canaux Kv1.1 dans ces neurones.

3. Rôle de LGI1 dans la synapse

La délétion de Lgi1 augmente la libération de glutamate dans les synapses excitatrices de l'aire CA3, par la perte de fonction des canaux Kv1.1 présynaptiques (Seagar et al., 2017). Cette observation conduit à l'hypothèse que les changements synaptiques observés dans l'hippocampe de souris KO-Lgi1 sont une conséquence des modulations de l'excitabilité.

Les études sur l'implication de la perte de fonction de LGII dans la modulation de la force synaptique présentent des contradictions (Boillot et al., 2016; Fukata et al., 2010; Lovero et al., 2015; Yu et al., 2010). Souvent, les modèles d'études diffèrent selon l'âge et l'espèce de l'animal, le type de mutation ou le support utilisés et les conditions expérimentales changent selon les équipes de recherche.

Afin de comprendre comment la perte de fonction de LGII peut conduire à une diminution de l'expression et du courant médié par les récepteurs AMPA dans le neurone post-synaptique (Fukata et al., 2010) et à l'augmentation de la libération de glutamate sans changement dans le neurone post-synaptique (Boillot et al., 2016), l'étude de ce processus dans un modèle et des conditions expérimentales identiques est nécessaire.

Il serait possible que la perte de fonction de LGII mette en jeu un processus séquentiel de la régulation des récepteurs AMPA et NMDA au cours du développement dans un contexte ADLTE, en fonction des conséquences induites par les crises épileptiques. Selon cette hypothèse, la délétion de *Lgi1* augmenterait la libération de glutamate présynaptique à un stade développemental précoce ou avant la fin de la maturation totale des synapses (Boillot et al., 2016), conduisant à une diminution homéostatique de l'expression des récepteurs AMPA dans le versant post-synaptique (Fukata et al., 2010; Lovero et al., 2015). Ensuite, l'apparition de crises d'épilepsies répétées augmenterait de nouveau la réponse de l'élément post-synaptique (Yu et al., 2010; Zhou et al., 2009).

Pour tester ces hypothèses, l'enregistrement des réponses EPSC médié par AMPA serait enregistrée dans les neurones pyramidaux de CA1 après stimulation de la collatérale de Schaffer dans des tranches aigües d'hippocampe de souris KO-*Lgi1* à différent temps : P6 (stade précoce), P9 (lors du début de la maturation synaptique, avant l'occurrence des crises épileptiques) et P14 (après les premières crises épileptiques).

Conclusion

L'implication de LGI1 dans l'épilepsie autosomique dominante du lobe temporal latéral et l'encéphalite limbique (LE) fait l'objet de nombreuses études qui attribuent à la perte de fonction de LGI1 la perturbation des mécanismes conduisant aux crises épileptiques. Par l'étude de modèles murins pour ces pathologies, de nombreuses avancées ont démontré que la mutation de LGI1 ou son blocage par des anticorps de patient LE est la cause d'un défaut de maturation des réseaux neuronaux, de régulation de la force synaptique et de régulation de l'excitabilité des neurones de l'hippocampe. Ces perturbations entraîneraient une activité accrue et synchrone du réseau neuronal de l'hippocampe, caractéristique de l'expression de crises d'épilepsie. Mon travail s'est focalisé sur le rôle de LGI1 dans le contrôle de l'excitabilité intrinsèque des neurones pyramidaux de CA3 par la régulation des canaux potassiques dépendant du voltage composés de la sous-unité Kv1.1. J'ai montré que l'excitabilité intrinsèque des neurones KO-Lgi1 de CA3 est restaurée par l'expression des canaux Kv1.1 fonctionnels dans l'ALS après restauration de l'expression de LGI1. Cette découverte met l'accent sur la capacité de LGI1 à réguler l'adressage ou le recyclage des canaux Kv1.1 indépendamment des effets développementaux pouvant être induits dans les neurones KO-Lgi1. Le traitement de cultures organotypiques avec des auto-anticorps ciblant la partie LRR de LGI1 augmente l'excitabilité intrinsèque des neurones de CA3 et diminue le nombre de Kv1.1 fonctionnels, ce qui n'est pas le cas avec ceux dirigés contre la partie EPTP. J'ai ainsi relevé une différence de mode d'action des auto-anticorps anti-LRR et anti-EPTP dans le contexte de la LE. Mes données préliminaires montrent l'analyse spatiale des mécanismes qui mettent en jeu la régulation des canaux Kv1.1 par LGI1. La perte d'expression des canaux Kv1.1 dans les neurones KO-Lgi1 semble se manifester tout au long de l'axone. A plus grande échelle, j'ai mis en évidence l'hétérogénéité de la régulation des Kv1.1 par LGI1 le long de l'axe dorso-ventral de l'hippocampe. Ces dernières données engagent à reconsidérer l'implication de LGI1 dans la régulation de l'expression et de l'adressage des canaux Kv1.1 dans l'hippocampe ventral. Ensemble, mes résultats ouvrent de nouveaux horizons pour la compréhension du rôle de LGI1 dans la régulation de l'excitabilité intrinsèque des neurones de CA3 dont la perturbation conduit au phénotype épileptique.

Bibliographie

- Aurangzeb, S., Symmonds, M., Knight, R., Kennett, R., Wehner, T., Irani, S., 2017. LGII-antibody encephalitis is characterised by frequent, multifocal clinical and subclinical seizures. *Seizure* 50. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2017.05.017>
- Bagetta, G., Nisticó, G., Dolly, J., 1992. Production of seizures and brain damage in rats by alpha-dendrotoxin, a selective K⁺ channel blocker. *Neuroscience letters* 139. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(92\)90851-w](https://doi.org/10.1016/0304-3940(92)90851-w)
- Bains, J.S., Longacher, J.M., Staley, K.J., 1999. Reciprocal interactions between CA3 network activity and strength of recurrent collateral synapses. *Nat Neurosci* 2, 720–726. <https://doi.org/10.1038/11184>
- Battye, R., Stevens, A., Perry, R.L., Jacobs, J.R., 2001. Repellent Signaling by Slit Requires the Leucine-Rich Repeats. *J. Neurosci.* 21, 4290–4298. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-12-04290.2001>
- Beck, H., Yaari, Y., 2008. Plasticity of intrinsic neuronal properties in CNS disorders. *Nat Rev Neurosci* 9, 357–369. <https://doi.org/10.1038/nrn2371>
- Berg, A.T., Berkovic, S.F., Brodie, M.J., Buchhalter, J., Cross, J.H., van Emde Boas, W., Engel, J., French, J., Glauser, T.A., Mathern, G.W., Moshé, S.L., Nordli, D., Plouin, P., Scheffer, I.E., 2010. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia* 51, 676–685. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2010.02522.x>
- Bernard, C., Anderson, A., Becker, A., Poolos, N.P., Beck, H., Johnston, D., 2004. Acquired Dendritic Channelopathy in Temporal Lobe Epilepsy. *Science* 305, 532–535. <https://doi.org/10.1126/science.1097065>
- Bialowas, A., Rama, S., Zbili, M., Marra, V., Fronzaroli-Molinieres, L., Ankri, N., Carlier, E., 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, 293–304. <https://doi.org/10.1111/ejn.12787>
- Boillot, M., Huneau, C., Marsan, E., Lehongre, K., Navarro, V., Ishida, S., Dufresnois, B., Ozkaynak, E., Garrigue, J., Miles, R., Martin, B., Leguern, E., Anderson, M.P., Baulac, S., 2014. Glutamatergic neuron-targeted loss of LGII epilepsy gene results in seizures. *Brain* 137, 2984–2996. <https://doi.org/10.1093/brain/awu259>
- Boillot, M., Lee, C.-Y., Allene, C., Leguern, E., Baulac, S., Rouach, N., 2016a. LGII acts presynaptically to regulate excitatory synaptic transmission during early postnatal development. *Scientific Reports* 6. <https://doi.org/10.1038/srep21769>
- Bolte, S., Cordelières, F., 2006. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of microscopy* 224. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x>
- Boudkazi, S., Fronzaroli-Molinieres, L., Debanne, D., 2011. Presynaptic action potential waveform determines cortical synaptic latency. *J. Physiol. (Lond.)* 589, 1117–1131. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.199653>
- Browne, D., Ganchar, S., Nutt, J., Brunt, E., Smith, E., Kramer, P., Litt, M., 1994. Episodic ataxia/myokymia syndrome is associated with point mutations in the human potassium channel gene, KCNA1. *Nature genetics* 8. <https://doi.org/10.1038/ng1094-136>

- Chabrol, E., Navarro, V., Provenzano, G., Cohen, I., Dinocourt, C., Rivaud-Péchéux, S., Fricker, D., Baulac, M., Miles, R., LeGuern, E., Baulac, S., 2010a. Electroclinical characterization of epileptic seizures in leucine-rich, glioma-inactivated 1-deficient mice. *Brain* 133, 2749–2762. <https://doi.org/10.1093/brain/awq171>
- Cudmore, Robert 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. *J. Neurosci.* 30, 12885–12895. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0740-10.2010>
- Cudmore, S.B., Gurd, J.W., 1991. Postnatal Age and Protein Tyrosine Phosphorylation at Synapses in the Developing Rat Brain. *J Neurochem* 57, 1240–1248. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1991.tb08285.x>
- Daoudal, G., Debanne, D., 2003. Long-Term Plasticity of Intrinsic Excitability: Learning Rules and Mechanisms. *Learn. Mem.* 10, 456–465. <https://doi.org/10.1101/lm.64103>
- Debanne, D., 2004. Information processing in the axon. *Nat Rev Neurosci* 5, 304–316. <https://doi.org/10.1038/nrn1397>
- Debanne, D., Boudkkazi, S., Campanac, E., Cudmore, R.H., Giraud, P., Fronzaroli-Molinieres, L., Carlier, E., Caillard, O., 2008. Paired-recordings from synaptically coupled cortical and hippocampal neurons in acute and cultured brain slices. *Nat Protoc* 3, 1559–1568. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.147>
- Debanne, D., Inglebert, Y., Russier, M., 2019. Plasticity of intrinsic neuronal excitability. *Current Opinion in Neurobiology* 54, 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.09.001>
- Desai, N.S., Rutherford, L.C., Turrigiano, G.G., 1999. Plasticity in the intrinsic excitability of cortical pyramidal neurons. *Nat Neurosci* 2, 515–520. <https://doi.org/10.1038/9165>
- Dodson, P., Billups, B., Rusznák, Z., Szűcs, G., Barker, M., Forsythe, I., 2003. Presynaptic rat Kv1.2 channels suppress synaptic terminal hyperexcitability following action potential invasion. *The Journal of physiology* 550. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.046250>
- Faivre-Sarrailh, C., Devaux, J.J., 2013. Neuro-glial interactions at the nodes of Ranvier: implication in health and diseases. *Front. Cell. Neurosci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00196>
- Feng, L., Chao, D., Xin, T., Yuanlin, M., Bei, Z., Yin, Y., Zijun, L., Peijia, L., Ruijiao, Z., Xuefeng, W., 2019. A novel LGI1 missense mutation causes dysfunction in cortical neuronal migration and seizures. *Brain Research* 1721, 146332. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146332>
- Fisher, R., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J., Elger, C., Engel, J., Forsgren, L., French, J., Glynn, M., Hesdorffer, D., Lee, B., Mathern, G., Moshé, S., Perucca, E., Scheffer, I., Tomson, T., Watanabe, M., Wiebe, S., 2014. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 55. <https://doi.org/10.1111/epi.12550>
- Foster, T.C., Fugger, H.N., Cunningham, S.G., 2000. Receptor blockade reveals a correspondence between hippocampal-dependent behavior and experience-dependent synaptic enhancement. *Brain Research* 871, 39–43. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02379-9](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02379-9)

- 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. *Journal of Neuroscience* 31, 15490–15498. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2752-11.2011>
- Frotscher, M., Jonas, P., Sloviter, R.S., 2006. Synapses formed by normal and abnormal hippocampal mossy fibers. *Cell Tissue Res* 326, 361–367. <https://doi.org/10.1007/s00441-006-0269-2>
- Fukata, Y., Adesnik, H., Iwanaga, T., Brecht, D.S., Nicoll, R.A., Fukata, M., 2006. Epilepsy-Related Ligand/Receptor Complex LGII and ADAM22 Regulate Synaptic Transmission. *Science* 313, 1792–1795. <https://doi.org/10.1126/science.1129947>
- Fukata, Y., Chen, X., Chiken, S., Hirano, Y., Yamagata, A., Inahashi, H., Sanbo, M., Sano, H., Goto, T., Hirabayashi, M., Kornau, H., Prüss, H., Nambu, A., Fukai, S., Nicoll, P., Fukata, M., 2021. LGII-ADAM22-MAGUK configures transsynaptic nanoalignment for synaptic transmission and epilepsy prevention. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2022580118>
- Fukata, Yuko, Hirano, Y., Miyazaki, Y., Yokoi, N., Fukata, M., 2021. Trans-synaptic LGII–ADAM22–MAGUK in AMPA and NMDA receptor regulation. *Neuropharmacology* 194, 108628. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108628>
- Fukata, Y., Lovero, K.L., Iwanaga, T., Watanabe, A., Yokoi, N., Tabuchi, K., Shigemoto, R., Nicoll, R.A., Fukata, M., 2010. Disruption of LGII–linked synaptic complex causes abnormal synaptic transmission and epilepsy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 3799–3804. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914537107>
- Fukata, Y., Yokoi, N., Miyazaki, Y., Fukata, M., 2017. The LGII–ADAM22 protein complex in synaptic transmission and synaptic disorders. *Neuroscience Research* 116, 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2016.09.011>
- Gadoth, A., Zekeridou, A., Klein, C., Thoreson, C., Majed, M., Dubey, D., Flanagan, E., McKeon, A., Jenkins, S., Lennon, V., Pittock, S., 2018. Elevated LGII-IgG CSF index predicts worse neurological outcome. *Annals of clinical and translational neurology* 5. <https://doi.org/10.1002/acn3.561>
- Grizel, A.V., Glukhov, G.S., Sokolova, O.S., 2014. Mechanisms of Activation of Voltage-Gated Potassium Channels. *Acta Naturae* 6, 10–26. <https://doi.org/10.32607/20758251-2014-6-4-10-26>
- Gu, C., Barry, J., 2011. Function and mechanism of axonal targeting of voltage-sensitive potassium channels. *Progress in Neurobiology* 94, 115–132. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.04.009>
- Gu, W., Wevers, A., Schröder, H., Grzeschik, K.-H., Derst, C., Brodtkorb, E., de Vos, R., Steinlein, O.K., 2002. The LGII gene involved in lateral temporal lobe epilepsy belongs to a new subfamily of leucine-rich repeat proteins. *FEBS Letters* 519, 71–76. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02713-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02713-8)
- Haselmann, H., Mannara, F., Werner, C., Planagumà, J., Miguez-Cabello, F., Schmidl, L., Grünewald, B., Petit-Pedrol, M., Kirmse, K., Classen, J., Demir, F., Klöcker, N., Soto, D., Dose, S., Dalmau, J., Hallermann, S., Geis, C., 2018. Human Autoantibodies against the

- AMPA Receptor Subunit GluA2 Induce Receptor Reorganization and Memory Dysfunction. *Neuron* 100, 91-105.e9. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.07.048>
- Head, K., Gong, S., Joseph, S., Wang, C., Burkhardt, T., Rossi, M.R., LaDuca, J., Matsui, S.-I., Vaughan, M., Hicks, D.G., Heintz, N., Cowell, J.K., 2007. Defining the expression pattern of the LGI1 gene in BAC transgenic mice. *Mamm Genome* 18, 328–337. <https://doi.org/10.1007/s00335-007-9024-6>
- Hivert, B., Marien, L., Agbam, K.N., Faivre-Sarrailh, C., 2019. ADAM22 and ADAM23 modulate the targeting of the Kv1 channel-associated protein LGI1 to the axon initial segment. *J Cell Sci* 132, jcs219774. <https://doi.org/10.1242/jcs.219774>
- Hivert, B., Marien, L., Agbam, K.N., Faivre-Sarrailh, C., 2018. ADAM22 and ADAM23 modulate the targeting of the Kv1 channel-associated protein LGI1 to the axon initial segment. *Journal of Cell Science* jcs.219774. <https://doi.org/10.1242/jcs.219774>
- Hochman, D.W., D'Ambrosio, R., Janigro, D., Schwartzkroin, P.A., 1999. Extracellular Chloride and the Maintenance of Spontaneous Epileptiform Activity in Rat Hippocampal Slices. *Journal of Neurophysiology* 81, 49–59. <https://doi.org/10.1152/jn.1999.81.1.49>
- Homma, N., Zhou, R., Naseer, M.I., Chaudhary, A.G., Al-Qahtani, M.H., Hirokawa, N., 2018. KIF2A regulates the development of dentate granule cells and postnatal hippocampal wiring. *eLife* 7, e30935. <https://doi.org/10.7554/eLife.30935>
- Irani, S.R., Alexander, S., Waters, P., Kleopa, K.A., Pettingill, P., Zuliani, L., Peles, E., Buckley, C., Lang, B., Vincent, A., 2010. Antibodies to Kv1 potassium channel-complex proteins leucine-rich, glioma inactivated 1 protein and contactin-associated protein-2 in limbic encephalitis, Morvan's syndrome and acquired neuromyotonia. *Brain* 133, 2734–2748. <https://doi.org/10.1093/brain/awq213>
- Irani, S.R., Michell, A.W., Lang, B., Pettingill, P., Waters, P., Johnson, M.R., Schott, J.M., Armstrong, R.J.E., S. Zagami, A., Bleasel, A., Somerville, E.R., Smith, S.M.J., Vincent, A., 2011. Faciobrachial dystonic seizures precede Lgi1 antibody limbic encephalitis. *Ann Neurol*. 69, 892–900. <https://doi.org/10.1002/ana.22307>
- Irani, S.R., Pettingill, P., Kleopa, K.A., Schiza, N., Waters, P., Mazia, C., Zuliani, L., Watanabe, O., Lang, B., Buckley, C., Vincent, A., 2012. Morvan syndrome: Clinical and serological observations in 29 cases. *Ann Neurol*. 72, 241–255. <https://doi.org/10.1002/ana.23577>
- Jung, S., Jones, T.D., Lugo, J.N., Sheerin, A.H., Miller, J.W., D'Ambrosio, R., Anderson, A.E., Poolos, N.P., 2007. Progressive Dendritic HCN Channelopathy during Epileptogenesis in the Rat Pilocarpine Model of Epilepsy. *Journal of Neuroscience* 27, 13012–13021. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3605-07.2007>
- Kalachikov, S., Evgrafov, O., Ross, B., Winawer, M., Barker-Cummings, C., Boneschi, F.M., Choi, C., Morozov, P., Das, K., Teplitskaya, E., Yu, A., Cayanis, E., Penchaszadeh, G., Kottmann, A.H., Pedley, T.A., Hauser, W.A., Ottman, R., Gilliam, T.C., 2002. Mutations in LGI1 cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features. *Nat Genet* 30, 335–341. <https://doi.org/10.1038/ng832>
- Kegel, L., Aunin, E., Meijer, D., Bermingham, J.R., 2013. LGI Proteins in the Nervous System. *ASN Neuro* 5, AN20120095. <https://doi.org/10.1042/AN20120095>

- Kesner, R.P., 2007. Behavioral functions of the CA3 subregion of the hippocampus. *Learning & Memory* 14, 771–781. <https://doi.org/10.1101/lm.688207>
- Khrestchatsky, M., Ferhat, L., Charton, G., Bernard, A., Pollard, H., Represa, A., Ben-Ari, Y., 1995. Molecular correlates between reactive and developmental plasticity in the rat hippocampus. *J. Neurobiol.* 26, 426–436. <https://doi.org/10.1002/neu.480260314>
- Kim, E., Niethammer, M., Rothschild, A., Jan, Y., Sheng, M., 1995. Clustering of Shaker-type K⁺ channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases. *Nature* 378. <https://doi.org/10.1038/378085a0>
- Kole, Maarten H.P., Letzkus, J.J., Stuart, G.J., 2007. Axon Initial Segment Kv1 Channels Control Axonal Action Potential Waveform and Synaptic Efficacy. *Neuron* 55, 633–647. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.07.031>
- Kornau, H.-C., Kreye, J., Stumpf, A., Fukata, Y., Parthier, D., Sammons, R.P., Imbrosci, B., Kurpjuweit, S., Kowski, A.B., Fukata, M., Prüss, H., Schmitz, D., 2020. Human Cerebrospinal Fluid Monoclonal LGII Autoantibodies Increase Neuronal Excitability. *ANNALS of Neurology* 87, 14.
- Kunapuli, P., Chitta, K.S., Cowell, J.K., 2003. Suppression of the cell proliferation and invasion phenotypes in glioma cells by the LGII gene. *Oncogene* 22, 3985–3991. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206584>
- Lai, M., Huijbers, M.G., Lancaster, E., Graus, F., Bataller, L., Balice-Gordon, R., Cowell, J.K., Dalmau, J., 2010. Investigation of LGII as the antigen in limbic encephalitis previously attributed to potassium channels: a case series. *The Lancet Neurology* 9, 776–785. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70137-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70137-X)
- Lalic, T., Pettingill, P., Vincent, A., Capogna, M., 2011. Human limbic encephalitis serum enhances hippocampal mossy fiber-CA3 pyramidal cell synaptic transmission: Limbic Encephalitis in the Hippocampus. *Epilepsia* 52, 121–131. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2010.02756.x>
- Leonardi, E., Andrezza, S., Vanin, S., Busolin, G., Nobile, C., Tosatto, S.C.E., 2011. A Computational Model of the LGII Protein Suggests a Common Binding Site for ADAM Proteins. *PLoS ONE* 6, e18142. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018142>
- Lovero, K.L., Fukata, Y., Granger, A.J., Fukata, M., Nicoll, R.A., 2015. The LGII–ADAM22 protein complex directs synapse maturation through regulation of PSD-95 function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, E4129–E4137. <https://doi.org/10.1073/pnas.1511910112>
- Lugarà, E., Kaushik, R., Leite, M., Chabrol, E., Dityatev, A., Lignani, G., Walker, M.C., 2020a. LGII downregulation increases neuronal circuit excitability. *Epilepsia* 61, 2836–2846. <https://doi.org/10.1111/epi.16736>
- Manganas, L.N., Trimmer, J.S., 2000. Subunit Composition Determines Kv1 Potassium Channel Surface Expression. *Journal of Biological Chemistry* 275, 29685–29693. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005010200>
- Martin, S.J., Morris, R.G.M., 2002. New life in an old idea: The synaptic plasticity and memory hypothesis revisited. *Hippocampus* 12, 609–636. <https://doi.org/10.1002/hipo.10107>

- Meiri, N., Ghelardini, C., Tesco, G., Galeotti, N., Dahl, D., Tomsic, D., Cavallaro, S., Quattrone, A., Capaccioli, S., Bartolini, A., Alkon, D.L., 1997. Reversible antisense inhibition of Shaker-like Kv1.1 potassium channel expression impairs associative memory in mouse and rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 4430–4434. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.9.4430>
- Michael, S., Waters, P., Irani, S.R., 2020. Stop testing for autoantibodies to the VGKC-complex: only request LGII and CASPR2. *Pract Neurol* 20, 377–384. <https://doi.org/10.1136/practneurol-2019-002494>
- Monaghan, M.M., Trimmer, J.S., Rhodes, K.J., n.d. Experimental Localization of Kv1 Family Voltage-Gated K⁺ Channel 11.
- Morgan, P.J., Bourboulou, R., Filippi, C., Koenig-Gambini, J., Epsztein, J., 2019. Kv1.1 contributes to a rapid homeostatic plasticity of intrinsic excitability in CA1 pyramidal neurons in vivo. *eLife* 8, e49915. <https://doi.org/10.7554/eLife.49915>
- Nakazawa, K., Sun, L.D., Quirk, M.C., Rondi-Reig, L., Wilson, M.A., Tonegawa, S., 2003. Hippocampal CA3 NMDA Receptors Are Crucial for Memory Acquisition of One-Time Experience. *Neuron* 38, 305–315. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00165-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00165-X)
- Nishino, J., Saunders, T.L., Sagane, K., Morrison, S.J., 2010. Lgi4 Promotes the Proliferation and Differentiation of Glial Lineage Cells throughout the Developing Peripheral Nervous System. *Journal of Neuroscience* 30, 15228–15240. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2286-10.2010>
- Nobile, C., Michelucci, R., Andreatza, S., Pasini, E., Tosatto, S.C.E., Striano, P., 2009. LGII mutations in autosomal dominant and sporadic lateral temporal epilepsy. *Hum. Mutat.* 30, 530–536. <https://doi.org/10.1002/humu.20925>
- Ogawa, Y., Horresh, I., Trimmer, J.S., Brecht, D.S., Peles, E., Rasband, M.N., 2008. Postsynaptic Density-93 Clusters Kv1 Channels at Axon Initial Segments Independently of Caspr2. *Journal of Neuroscience* 28, 5731–5739. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4431-07.2008>
- Ohkawa, T., Fukata, Y., Yamasaki, M., Miyazaki, T., Yokoi, N., Takashima, H., Watanabe, M., Watanabe, O., Fukata, M., 2013. Autoantibodies to Epilepsy-Related LGII in Limbic Encephalitis Neutralize LGII-ADAM22 Interaction and Reduce Synaptic AMPA Receptors. *Journal of Neuroscience* 33, 18161–18174. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3506-13.2013>
- Ovsepian, S.V., LeBerre, M., Steuber, V., O’Leary, V.B., Leibold, C., Oliver Dolly, J., 2016. Distinctive role of KV1.1 subunit in the biology and functions of low threshold K⁺ channels with implications for neurological disease. *Pharmacology & Therapeutics* 159, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.01.005>
- Owen, D., Hall, A., Stephens, G., Stow, J., Robertson, B., 1997. The relative potencies of dendrotoxins as blockers of the cloned voltage-gated K⁺ channel, mKv1.1 (MK-1), when stably expressed in Chinese hamster ovary cells. *British journal of pharmacology* 120. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701004>
- Owuor, K., Harel, N.Y., Englot, D.J., Hisama, F., Blumenfeld, H., Strittmatter, S.M., 2009. LGII-associated epilepsy through altered ADAM23-dependent neuronal morphology. *Molecular and Cellular Neuroscience* 42, 448–457. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2009.09.008>

- Ozkaynak, E., Abello, G., Jaegle, M., van Berge, L., Hamer, D., Kegel, L., Driegen, S., Sagane, K., Bermingham, J.R., Meijer, D., 2010. Adam22 Is a Major Neuronal Receptor for Lgi4-Mediated Schwann Cell Signaling. *Journal of Neuroscience* 30, 3857–3864. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6287-09.2010>
- Park, W.-J., Lim, Y.Y., Kwon, N.S., Baek, K.J., Kim, D.-S., Yun, H.-Y., 2010. Leucine-Rich Glioma Inactivated 3 Induces Neurite Outgrowth Through Akt and Focal Adhesion Kinase. *Neurochem Res* 35, 789–796. <https://doi.org/10.1007/s11064-010-0136-0>
- Petit-Pedrol, M., Sell, J., Planagumà, J., Mannara, F., Radosevic, M., Haselmann, H., Ceanga, M., Sabater, L., Spatola, M., Soto, D., Gasull, X., Dalmau, J., Geis, C., 2018. LGI1 antibodies alter Kv1.1 and AMPA receptors changing synaptic excitability, plasticity and memory. *Brain*. <https://doi.org/10.1093/brain/awy253>
- Quirk, M.C., Blum, K.I., Wilson, M.A., 2001. Experience-Dependent Changes in Extracellular Spike Amplitude May Reflect Regulation of Dendritic Action Potential Back-Propagation in Rat Hippocampal Pyramidal Cells. *J. Neurosci.* 21, 240–248. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-01-00240.2001>
- Rama, S., Zbili, M., Debanne, D., 2015. Modulation of spike-evoked synaptic transmission: The role of presynaptic calcium and potassium channels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1853, 1933–1939. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.11.024>
- Rama, S., Zbili, M., Fékété, A., Tapia, M., Benitez, M.J., Boumedine, N., Garrido, J.J., Debanne, D., 2017. The role of axonal Kv1 channels in CA3 pyramidal cell excitability. *Sci Rep* 7, 315. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00388-1>
- Ramberger, M., Berretta, A., Tan, J.M.M., Sun, B., Michael, S., Yeo, T., Theorell, J., Bashford-Rogers, R., Paneva, S., O'Dowd, V., Dedi, N., Topia, S., Griffin, R., Ramirez-Franco, J., El Far, O., Baulac, S., Leite, M.I., Sen, A., Jeans, A., McMillan, D., Marshall, D., Anthony, D., Lightwood, D., Waters, P., Irani, S.R., 2020. Distinctive binding properties of human monoclonal LGI1 autoantibodies determine pathogenic mechanisms. *Brain* 143, 1731–1745. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa104>
- Rasband, M.N., Park, E.W., Zhen, D., Arbuckle, M.I., Poliak, S., Peles, E., Grant, S.G.N., Trimmer, J.S., 2002. Clustering of neuronal potassium channels is independent of their interaction with PSD-95. *Journal of Cell Biology* 159, 663–672. <https://doi.org/10.1083/jcb.200206024>
- Rathenberg, J., Nevian, T., Witzemann, V., 2003. High-efficiency transfection of individual neurons using modified electrophysiology techniques. *J Neurosci Methods* 126, 91–98. [https://doi.org/10.1016/s0165-0270\(03\)00069-4](https://doi.org/10.1016/s0165-0270(03)00069-4)
- Ribeiro, P.A.O., Sbragia, L., Gilioli, R., Langone, F., Conte, F.F., Lopes-Cendes, I., 2008. Expression Profile of Lgi1 Gene in Mouse Brain During Development. *J Mol Neurosci* 35, 323–329. <https://doi.org/10.1007/s12031-008-9096-0>
- Robbins, C.A., Tempel, B.L., 2012. Kv1.1 and Kv1.2: Similar channels, different seizure models: Two Kv1s; Two Different Epilepsies. *Epilepsia* 53, 134–141. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2012.03484.x>
- Rolls, E.T., 2013. The mechanisms for pattern completion and pattern separation in the hippocampus. *Front. Syst. Neurosci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2013.00074>

- Romoli, M., Krashia, P., Sen, A., Franciotta, D., Gastaldi, M., Nobili, A., Mancini, A., Nardi Cesarini, E., Nigro, P., Tambasco, N., Mercuri, N., Parnetti, L., Di Filippo, M., D'Amelio, M., Irani, S., Costa, C., Calabresi, P., 2019. Hippocampal epileptogenesis in autoimmune encephalitis. *Annals of clinical and translational neurology* 6. <https://doi.org/10.1002/acn3.50919>
- Sagane, K., Ishihama, Y., Sugimoto, H., 2008. LGI1 and LGI4 bind to ADAM22, ADAM23 and ADAM11. *Int. J. Biol. Sci.* 387–396. <https://doi.org/10.7150/ijbs.4.387>
- Schulte, U., Thumfart, J.-O., Klöcker, N., Sailer, C.A., Bildl, W., Binossek, M., Dehn, D., Deller, T., Eble, S., Abbass, K., Wangler, T., Knaus, H.-G., Fakler, B., 2006. The Epilepsy-Linked Lgi1 Protein Assembles into Presynaptic Kv1 Channels and Inhibits Inactivation by Kv β 1. *Neuron* 49, 697–706. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.01.033>
- Scott, V., Muniz, Z., Sewing, S., Lichtinghagen, R., Parcej, D., Pongs, O., Dolly, J., 1994. Antibodies specific for distinct Kv subunits unveil a heterooligomeric basis for subtypes of alpha-dendrotoxin-sensitive K⁺ channels in bovine brain. *Biochemistry* 33. <https://doi.org/10.1021/bi00173a001>
- Seagar, M., Russier, M., Caillard, O., Maulet, Y., Fronzaroli-Molinieres, L., De San Feliciano, M., Boumedine-Guignon, N., Rodriguez, L., Zbili, M., Usseglio, F., Formisano-Tréziny, C., Youssouf, F., Sangiardi, M., Boillot, M., Baulac, S., Benitez, M.J., Garrido, J.-J., Debanne, D., El Far, O., 2017a. LGI1 tunes intrinsic excitability by regulating the density of axonal Kv1 channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, 7719–7724. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618656114>
- Senechal, K.R., Thaller, C., Noebels, J.L., 2005. ADPEAF mutations reduce levels of secreted LGI1, a putative tumor suppressor protein linked to epilepsy. *Human Molecular Genetics* 14, 1613–1620. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi169>
- Seppälä, E.H., Jokinen, T.S., Fukata, M., Fukata, Y., Webster, M.T., Karlsson, E.K., Kilpinen, S.K., Steffen, F., Dietschi, E., Leeb, T., Eklund, R., Zhao, X., Rilstone, J.J., Lindblad-Toh, K., Minassian, B.A., Lohi, H., 2011. LGI2 Truncation Causes a Remitting Focal Epilepsy in Dogs. *PLoS Genet* 7, e1002194. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002194>
- Shi, G., Nakahira, K., Hammond, S., Rhodes, K.J., Schechter, L.E., Trimmer, J.S., 1996. α Subunits Promote K⁺ Channel Surface Expression 10.
- 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* 104, 11453–11458. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702041104>
- Sirerol-Piquer, M.S., Ayerdi-Izquierdo, A., Morante-Redolat, J.M., Herranz-Pérez, V., Favell, K., Barker, P.A., Pérez-Tur, J., 2006. The epilepsy gene LGI1 encodes a secreted glycoprotein that binds to the cell surface. *Human Molecular Genetics* 15, 3436–3445. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl421>
- Smart, S.L., Lopantsev, V., Zhang, C.L., Robbins, C.A., Wang, H., Chiu, S.Y., Schwartzkroin, P.A., Messing, A., Tempel, B.L., 1998. Deletion of the KV1.1 Potassium Channel Causes Epilepsy in Mice. *Neuron* 20, 809–819. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81018-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81018-1)
- Smedfors, G., Olson, L., Karlsson, T.E., 2018. A Nogo-Like Signaling Perspective from Birth to Adulthood and in Old Age: Brain Expression Patterns of Ligands, Receptors and Modulators. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 11. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00042>

Staub, E., Pérez-Tur, J., Siebert, R., Nobile, C., Moschonas, N.K., Deloukas, P., Hinemann, B., 2002. The novel EPTP repeat defines a superfamily of proteins implicated in epileptic disorders. *Trends in Biochemical Sciences* 27, 441–444. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(02\)02163-1](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(02)02163-1)

Steinlein, O.K., 2004. Genetic mechanisms that underlie epilepsy. *Nat Rev Neurosci* 5, 400–408. <https://doi.org/10.1038/nrn1388>

Storm, J., 1988. Temporal integration by a slowly inactivating K⁺ current in hippocampal neurons. *Nature* 336. <https://doi.org/10.1038/336379a0>

Striano, P., Busolin, G., Santulli, L., Leonardi, E., Coppola, A., Vitiello, L., Rigon, L., Michelucci, R., Tosatto, S.C.E., Striano, S., Nobile, C., 2011. Familial temporal lobe epilepsy with psychic auras associated with a novel LGI1 mutation. *Neurology* 76, 1173–1176. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318212ab2e>

Sun, Q., Jiang, Y.-Q., Lu, M.C., 2020. Topographic heterogeneity of intrinsic excitability in mouse hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Journal of Neurophysiology* 124, 1270–1284. <https://doi.org/10.1152/jn.00147.2020>

Thomas, R., Favell, K., Morante-Redolat, J., Pool, M., Kent, C., Wright, M., Daignault, K., Ferraro, G.B., Montcalm, S., Durocher, Y., Fournier, A., Perez-Tur, J., Barker, P.A., 2010. LGI1 Is a Nogo Receptor 1 Ligand that Antagonizes Myelin-Based Growth Inhibition. *Journal of Neuroscience* 30, 6607–6612. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5147-09.2010>

Thomas, R.A., Gibon, J., Chen, C.X.Q., Chierzi, S., Soubannier, V.G., Baulac, S., Séguéla, P., Murai, K., Barker, P.A., 2018. The Nogo Receptor Ligand LGI1 Regulates Synapse Number and Synaptic Activity in Hippocampal and Cortical Neurons. *eneuro* 5, ENEURO.0185-18.2018. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0185-18.2018>

Thomas, R.A., Gibon, J., Chen, C.X.Q., Chierzi, S., Soubannier, V.G., Baulac, S., Séguéla, P., Murai, K., Barker, P.A., 2018c. The Nogo Receptor Ligand LGI1 Regulates Synapse Number and Synaptic Activity in Hippocampal and Cortical Neurons. *eneuro* 5, ENEURO.0185-18.2018. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0185-18.2018>

Thompson, J., Bi, M., Murchison, A.G., Makuch, M., Bien, C.G., Chu, K., Farooque, P., Gelfand, J.M., Geschwind, M.D., Hirsch, L.J., Somerville, E., Lang, B., Vincent, A., Leite, M.I., Waters, P., Irani, S.R., Faciobranchial Dystonic Seizures Study Group, Dogan-Onugoren, M., Rae-Grant, A., Illes, Z., Szots, M., Malter, M., Widman, G., Surges, R., Archibald, N., Reid, J., Duncan, C., Richardson, A., Lilleker, J., Iorio, R., Blaabjerg, M., Abeler, K., Shin, Y., 2018. The importance of early immunotherapy in patients with faciobranchial dystonic seizures. *Brain* 141, 348–356. <https://doi.org/10.1093/brain/awx323>

Tiffany, A.M., Manganas, L.N., Kim, E., Hsueh, Y.-P., Sheng, M., Trimmer, J.S., 2000. PSD-95 and SAP97 Exhibit Distinct Mechanisms for Regulating K₂ Channel Surface Expression and Clustering. *The Journal of Cell Biology* 148, 11.

Trimmer, J.S., 2015. Subcellular Localization of K⁺ Channels in Mammalian Brain Neurons: Remarkable Precision in the Midst of Extraordinary Complexity. *Neuron* 85, 238–256. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.042>

Trimmer, J.S., Rhodes, K.J., 2004. Localization of Voltage-Gated Ion Channels IN Mammalian Brain. *Annu. Rev. Physiol.* 66, 477–519. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.66.032102.113328>

- Wellmer, J., Su, H., Beck, H., Yaari, Y., 2002. Long-lasting modification of intrinsic discharge properties in subicular neurons following status epilepticus: Altered intrinsic firing after status epilepticus. *European Journal of Neuroscience* 16, 259–266. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02086.x>
- Wills, Z.P., Mandel-Brehm, C., Mardinly, A.R., McCord, A.E., Giger, R.J., Greenberg, M.E., 2012. The Nogo Receptor Family Restricts Synapse Number in the Developing Hippocampus. *Neuron* 73, 466–481. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.11.029>
- Witter, M.P., 2007. Intrinsic and extrinsic wiring of CA3: Indications for connectional heterogeneity. *Learning & Memory* 14, 705–713. <https://doi.org/10.1101/lm.725207>
- Yamagata, A., Fukai, S., 2020. Insights into the mechanisms of epilepsy from structural biology of LGI1–ADAM22. *Cell. Mol. Life Sci.* 77, 267–274. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03269-0>
- Yamagata, A., Miyazaki, Y., Yokoi, N., Shigematsu, H., Sato, Y., Goto-Ito, S., Maeda, A., Goto, T., Sanbo, M., Hirabayashi, M., Shirouzu, M., Fukata, Y., Fukata, M., Fukai, S., 2018. Structural basis of epilepsy-related ligand–receptor complex LGI1–ADAM22. *Nat Commun* 9, 1546. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03947-w>
- Yokoi, N., Fukata, Y., Kase, D., Miyazaki, T., Jaegle, M., Ohkawa, T., Takahashi, N., Iwanari, H., Mochizuki, Y., Hamakubo, T., Imoto, K., Meijer, D., Watanabe, M., Fukata, M., 2015. Chemical corrector treatment ameliorates increased seizure susceptibility in a mouse model of familial epilepsy. *Nature Medicine* 21, 19–26. <https://doi.org/10.1038/nm.3759>
- Yu, Y.E., Wen, L., Silva, J., Li, Z., Head, K., Sossey-Alaoui, K., Pao, A., Mei, L., Cowell, J.K., 2010. Lgi1 null mutant mice exhibit myoclonic seizures and CA1 neuronal hyperexcitability. *Human Molecular Genetics* 19, 1702–1711. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq047>
- Zbili, M., Debanne, D., 2019. Past and Future of Analog-Digital Modulation of Synaptic Transmission. *Frontiers in cellular neuroscience* 13. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00160>
- Zhang, W., Linden, D.J., 2003. The other side of the engram: experience-driven changes in neuronal intrinsic excitability. *Nat Rev Neurosci* 4, 885–900. <https://doi.org/10.1038/nrn1248>
- Zhou, Lin, Zhou, Liang, Su, L., Cao, S.-L., Xie, Y.-J., Wang, N., Shao, C.-Y., Wang, Y.-N., Zhou, J.-H., Cowell, J.K., Shen, Y., 2018. Celecoxib Ameliorates Seizure Susceptibility in Autosomal Dominant Lateral Temporal Epilepsy. *The Journal of Neuroscience* 38, 3346–3357. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3245-17.2018>
- Zhou, Y., Zhang, D., Ozkaynak, E., Wang, X., Kasper, E., Leguern, E., Baulac, S., Mp, 2012. Epilepsy gene LGI1 regulates postnatal developmental remodeling of retinogeniculate synapses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5191-11.2012>
- Zhou, Y.-D., Lee, S., Jin, Z., Wright, M., Smith, S.E.P., Anderson, M.P., 2009. Arrested maturation of excitatory synapses in autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy. *Nat Med* 15, 1208–1214. <https://doi.org/10.1038/nm.2019>